

Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch  
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

**Oligomerisierung von Milcheiweiß  
mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer  
Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen  
und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M.Sc. Beate Hiller  
aus Neu-Kaliß

Kiel, 2007.

---

Dekan:  
1. Berichterstatter:  
2. Berichterstatter:  
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. J. Krieter  
Priv.-Doz. Dr. P.-Chr. Lorenzen  
Prof. Dr. K. Schwarz  
14.02.2008

Gedruckt mit der Genehmigung  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

## Danksagung

Den zahlreichen helfenden Händen auf meinem Weg „Per Aspera Ad Astra“ möchte ich im Folgenden von Herzen danken.

Ich danke herzlichst Herrn Priv.-Doz. Dr. P.-Chr. Lorenzen für die interessante Themenstellung, seine Anregungen, Diskussionsfreudigkeit und Unterstützung. Durch sein Interesse, sein Vertrauen und seine Erfahrung trug er maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit und gemeinsamer Publikationen bei.

Ich danke Frau Prof. Dr. K. Schwarz für die Übernahme der zweiten Berichterstattung. Mein Dank gilt auch den weiteren Mitgliedern des Prüfungsausschusses, Herrn Prof. Dr. E. Schallenberger und Herrn Prof. Dr. F. Döring.

Gedankt sei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Herrn Priv.-Doz. Dr. P.-Chr. Lorenzen [Herrn P. Balkowski, Frau M. Böttcher, Herrn Dipl.-Ing. K. Einhoff, Herrn E. Johannsen, Frau G. Köpke, Frau S. Splitzer, Frau I. Spreckels, Frau Dr. D.A.B. Ströbel] für die Freundlichkeit, Kollegialität und Unterstützung.

Herrn Dipl.-Ing. K. Einhoff danke ich für die Organisation der sensorischen Prüfungen durch das Taste-Panel der BfEL Kiel.

Herrn E. Johannsen danke ich für die gemeinsame Herstellung von Joghurtprodukten, seine Unterstützung bei allen technischen Problemen und seine guten Ideen.

Frau S. Splitzer danke ich für die praktischen Hinweise und die gemeinsamen Stunden im Labor.

Frau I. Spreckels danke ich für ihre Hilfe, die Durchführung fotografischer Arbeiten, ihr Interesse und ihren seelisch-moralischen Beistand.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Chemie und Technologie der Milch der BfEL Kiel für die freundliche Aufnahme und kollegiale Zusammenarbeit.

Frau E. Jacobsen danke ich für die Durchführung der Aminosäurenanalyse.

Frau Dr.-Ing. K. Schrader danke ich für die Einarbeitung am Rheometer und die Durchführung elektronenmikroskopischer Arbeiten.

Ich danke der H. W. Schaumann Stiftung für die Unterstützung des Projekts (Juli - Dezember 2007).

Gedankt sei den Firmen, die für Untersuchungszwecke Enzympräparate (Novozymes; X-zyne; Mühlenchemie), Pflanzenextrakte (Kaden Biochemicals; DSM Nutritional Products) und technische Hilfsstoffe (Mühlenchemie) zur Verfügung gestellt haben.

Ich danke von Herzen meiner Familie für die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und Lebensbereichen.



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung und Problemstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>3</b>
2.1. Milcheiweiß .....	3
2.2. Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß .....	5
2.2.1. Enzyme (allgemein) .....	5
2.2.2. Transglutaminase .....	6
2.2.3. Lactoperoxidase .....	8
2.2.4. Laccase .....	10
2.2.5. Glucoseoxidase .....	12
2.3. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß .....	14
2.3.1. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion .....	14
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1. Material .....	18
3.2. Methoden .....	21
3.2.1. Methoden zur Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß .....	21
3.2.1.1. Standardinkubationsbedingungen .....	21
3.2.1.2. Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen .....	21
3.2.1.3. Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß .....	21
3.2.2. Methoden zur Herstellung von chemisch-physikalisch modifiziertem Milcheiweiß .....	22
3.2.2.1. Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen der <i>Maillard</i> -Reaktion .....	22
3.2.2.2. Herstellung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden .....	22
3.2.3. Chemisch-analytische Untersuchung von modifiziertem Milcheiweiß .....	23
3.2.3.1. Fast-Protein-Liquid-Chromatographie .....	23
3.2.3.2. SDS-PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen .....	24
3.2.3.3. Aminosäurenanalyse .....	25
3.2.3.4. Löslicher Aminostickstoff .....	25
3.2.3.5. SH-Gruppen .....	26
3.2.3.6. Hydroxymethylfurfural .....	27
3.2.4. Untersuchung der techno-funktionellen Eigenschaften von modifiziertem Milcheiweiß .....	27
3.2.4.1. Hitzestabilität .....	28
3.2.4.2. Oberflächenhydrophobizität .....	28
3.2.4.3. Oberflächenspannung .....	30
3.2.4.4. Schaumbildungseigenschaften .....	30
3.2.4.5. Emulgierereigenschaften .....	30
3.2.4.6. Viskosität .....	31
3.2.4.7. Antioxidative Eigenschaften .....	31
3.2.5. Untersuchung der in-vitro Proteolysierbarkeit von modifiziertem Milcheiweiß .....	32

3.2.6.	Methoden zur Herstellung von Magermilchjoghurt .....	33
3.2.6.1.	Herstellung von Magermilchjoghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch .....	33
3.2.6.2.	Herstellung von Magermilchjoghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch <i>Maillard</i> -Produkte .....	34
3.2.7.	Untersuchung von Magermilchjoghurt auf chemisch-physikalische und auf sensorische Eigenschaften.....	35
3.2.7.1.	Azidität .....	35
3.2.7.2.	Gelstärke.....	35
3.2.7.3.	Viskosität.....	35
3.2.7.4.	Gelstruktur .....	36
3.2.7.5.	Molkenlässigkeit.....	36
3.2.7.6.	Lactose .....	36
3.2.7.7.	Acetaldehyd .....	37
3.2.7.8.	Sensorische Eigenschaften von Joghurt.....	38
3.2.8.	Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse .....	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß .....	41
4.1.1.	Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase .....	41
4.1.1.1.	Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase.....	47
4.1.2.	Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase .....	52
4.1.2.1.	Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Laccase ...	58
4.1.3.	Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase.....	64
4.1.3.1.	Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase .....	69
4.1.4.	Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß .....	74
4.1.5.	Techno-funktionelle Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß.....	76
4.1.6.	In-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß .....	85
4.1.7.	Eigenschaften von Magermilchjoghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch .....	93
4.1.7.1.	Chemisch-analytische Eigenschaften .....	93
4.1.7.2.	Chemisch-physikalische Eigenschaften.....	96
4.1.7.3.	Sensorische Eigenschaften .....	100
4.2.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion ..	103
4.2.1.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> - Reaktion mit Sacchariden in Abhängigkeit von den Reaktions- bedingungen.....	103
4.2.2.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> - Reaktion mit Glucose .....	110
4.2.3.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> - Reaktion mit Lactose .....	117
4.2.4.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> - Reaktion mit Pektin.....	124

4.2.5.	Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> - Reaktion mit Dextran .....	131
4.2.6.	Herstellung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden .....	138
4.2.7.	Techno-funktionelle Eigenschaften von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden .....	139
4.2.8.	In-vitro Proteolysierbarkeit von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß .....	161
4.2.9.	Eigenschaften von Joghurt mit Trockenmasseerhöhung durch <i>Maillard</i> -Produkte .....	169
4.2.9.1.	Chemisch-analytische Eigenschaften .....	169
4.2.9.2.	Chemisch-physikalische Eigenschaften .....	171
4.2.9.3.	Sensorische Eigenschaften .....	174
<b>5.</b>	<b>Abschließende Bewertung .....</b>	<b>176</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>183</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>186</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>189</b>
<b>9.</b>	<b>Anlagen</b>	
9.1.	Zusätzliche Abbildungen .....	i
9.2.	Zusätzliche Tabellen .....	xxi
9.3.	Veröffentlichung .....	xxxii
	Hiller, B, Lorenzen, PC. Effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins. <i>LWT - Food Science and Technology</i> 41, 1140-1144, <b>2008</b> .	

**Abbildungsverzeichnis****Abbildungen in Kapitel 2: Theoretischer Hintergrund**

Abb. 2.1.	Übersicht über die Zusammensetzung von Milcheiweiß .....	3
Abb. 2.2.	Proteinvernetzungsprodukte der Lactoperoxidase.....	9
Abb. 2.3.	Vernetzung von Protein R <sub>1</sub> und Protein R <sub>2</sub> durch Laccase .....	11
Abb. 2.4.	Umsetzung von β-D-Glucose und Sauerstoff zu δ-D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid durch Glucoseoxidase .....	12
Abb. 2.5.	Additionsreaktion zwischen Protein und Saccharid im Anfangsstadium der <i>Maillard</i> -Reaktion .....	14

**Abbildungen in Kapitel 3: Material und Methoden**

Abb. 3.1.	Kalibriergerade Ellman-Test mit Standardsubstanz Glutathion .....	27
Abb. 3.2.	Kalibriergerade Oberflächenhydrophobizität mit Standardsubstanz SDS.....	29
Abb. 3.3.	Fließschema zur Herstellung von Magermilchjoghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch.....	33
Abb. 3.4.	Fließschema zur Herstellung von Magermilchjoghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch <i>Maillard</i> -Produkte .....	34

**Abbildungen in Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion**

Abb. 4.1.	Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von unbehandeltem und von lactoperoxidasebehandeltem Natriumcaseinat .....	41
Abb. 4.2.	Veränderung der Molmassenverteilung von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	49
Abb. 4.3.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung.....	50
Abb. 4.4.	Elektropherogramme von unbehandeltem und von laccasebehandeltem Milcheiweiß .....	52
Abb. 4.5.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von der Phenolquelle .....	59
Abb. 4.6.	Veränderung der Molmassenverteilung von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	61
Abb. 4.7.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung ....	62
Abb. 4.8.	Elektropherogramme von unbehandeltem und von glucoseoxidase-behandeltem Milcheiweiß .....	64
Abb. 4.9.	Veränderung der Molmassenverteilung von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Glucoseoxidase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	71
Abb. 4.10.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung.....	73
Abb. 4.11.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat, von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Lactoperoxidase.....	77



Abb. 4.12.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat, von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Laccase.....	78
Abb. 4.13.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat, von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Glucoseoxidase.....	79
Abb. 4.14.	Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat .....	85
Abb. 4.15.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten aus unbehandeltem und aus enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat .....	87
Abb. 4.16.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten aus unbehandeltem und aus enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat .....	90
Abb. 4.17.	Elektropherogramme von Joghurtmilch und von Joghurt aus unbehandelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch.....	95
Abb. 4.18.	Struktur von Joghurtgelen aus unbehandelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch.....	99
Abb. 4.19.	Sensorische Bewertung von Joghurt aus unbehandelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch.....	101
Abb. 4.20.	Joghurt aus unbehandelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch .....	101
Abb. 4.21.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch <i>Maillard</i> -Reaktion bei 70°C oder bei 40°C in Abhängigkeit von der Reaktionszeit .....	104
Abb. 4.22.	Modifizierung von Proteinmonomeren durch <i>Maillard</i> -Reaktion bei 10%, bei 40%, bei 65% und bei 100% relativer Feuchte in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.....	106
Abb. 4.23.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen durch <i>Maillard</i> -Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit .....	107
Abb. 4.24.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Protein/Saccharid-Mischungen durch <i>Maillard</i> -Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit .....	108
Abb. 4.25.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Glucose.....	110
Abb. 4.26.	Elektropherogramme von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Glucose....	111
Abb. 4.27.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Lactose .....	117
Abb. 4.28.	Elektropherogramme von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Lactose ....	119
Abb. 4.29.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Pektin.....	124
Abb. 4.30.	Elektropherogramme von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Pektin .....	125
Abb. 4.31.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Dextran .....	131
Abb. 4.32.	Elektropherogramme von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran ....	132
Abb. 4.33a.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Glucose I .....	141
Abb. 4.33b.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Glucose II .....	142
Abb. 4.34a.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Lactose I.....	143

Abb. 4.34b.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Lactose II .....	144
Abb. 4.35a.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Pektin I .....	145
Abb. 4.35b.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Pektin II .....	146
Abb. 4.36a.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] I .....	147
Abb. 4.36b.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] II .....	148
Abb. 4.37.	Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/ <i>Glucose-Maillard</i> -Produkten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	157
Abb. 4.38.	Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/ <i>Lactose-Maillard</i> -Produkten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	159
Abb. 4.39.	Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein und von <i>Maillard</i> -Produkten aus Gesamtmilchprotein in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	159
Abb. 4.40.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten aus Natriumcaseinat und in Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/ <i>Saccharid-Maillard</i> -Produkten .....	163
Abb. 4.41.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat und in Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat/ <i>Saccharid-Maillard</i> -Produkten ....	166
Abb. 4.42.	Elektropherogramme von Joghurtmilch und von Joghurt mit Trockenmasseerhöhung durch Magermilchpulver oder durch <i>Maillard</i> -Produkte aus Magermilchpulver .....	170
Abb. 4.43.	Sensorische Bewertung von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandeltes Magermilchpulver oder durch <i>Maillard</i> -Produkte aus Magermilchpulver.....	175

### Abbildungen in der Anlage

Abb. A.1.	Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Referenzsubstanzen.....	i
Abb. A.2.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen .....	ii
Abb. A.3.	Veränderung der Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	iii
Abb. A.4.	Veränderung der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	iii
Abb. A.5.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen .....	iv
Abb. A.6.	Veränderung der Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	v
Abb. A.7.	Veränderung der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	v
Abb. A.8.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Glucoseoxidase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen .....	vi
Abb. A.9.	Veränderung der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Glucoseoxidase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	vii

Abb. A.10.	Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse (pH-Stat) von Natriumcaseinat und von enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat .....	viii
Abb. A.11.	Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse (pH-Stat) von Molkenproteinisolat und von enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat .....	ix
Abb. A.12.	Sensorische Bewertung von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch .....	x
Abb. A.13.	Sensorische Bewertung von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch .....	x
Abb. A.14a.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Dextran [500.000 g/mol] I .....	xi
Abb. A.14b.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion mit Dextran [500.000 g/mol] II .....	xii
Abb. A.15.	Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	xiii
Abb. A.16.	Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	xiv
Abb. A.17.	Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein und von Gesamtmilchprotein/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	xv
Abb. A.18.	Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse (pH-Stat) von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten .....	xvi
Abb. A.19.	Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse (pH-Stat) von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten .....	xvii
Abb. A.20.	Sensorische Bewertung von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Pektin-Mischung oder durch Natriumcaseinat/Pektin- <i>Maillard</i> -Produkte .....	xviii
Abb. A.21.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat, von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Transglutaminase .....	xix
Abb. A.22.	Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat und von Molkenproteinisolat durch Erhitzung .....	xx

**Tabellenverzeichnis****Tabellen in Kapitel 2: Theoretischer Hintergrund**

Tab. 2.1.	Enzymaktivität der Lactoperoxidase .....	8
Tab. 2.2.	Enzymaktivität der Laccase .....	10
Tab. 2.3a.	Literaturüberblick über die Modifizierung von Molkenprotein durch <i>Maillard</i> - Reaktion .....	16
Tab. 2.3b.	Literaturüberblick über die Modifizierung von Casein durch <i>Maillard</i> -Reaktion ...	17

**Tabellen in Kapitel 3: Material und Methoden**

Tab. 3.1.	Bedingungen der Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase.....	22
Tab. 3.2.	Bedingungen der Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase .....	33
Tab. 3.3.	Bedingungen der Trockenmasseerhöhung von Joghurtmilch durch Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder durch Protein/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkte .....	34
Tab. 3.4.	Vokabular zur sensorischen Bewertung von Joghurt nach Aussehen, Konsistenz, Geruch und Geschmack.....	39

**Tabellen in Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion**

Tab. 4.1.	Molmassenverteilung von unbehandeltem und von lactoperoxidase- behandeltem Milcheiweiß.....	42
Tab. 4.2.	Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem und in lactoperoxidase- behandeltem Milcheiweiß.....	44
Tab. 4.3.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in lactoperoxidasebehandeltem Milcheiweiß.....	46
Tab. 4.4.	Optimale Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase .....	47
Tab. 4.5.	Molmassenverteilung von unbehandeltem und von laccasebehandeltem Milcheiweiß .....	54
Tab. 4.6.	Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem und in laccasebehandeltem Milcheiweiß .....	56
Tab. 4.7.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in laccasebehandeltem Milcheiweiß.....	57
Tab. 4.8.	Optimale Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Laccase.....	58
Tab. 4.9.	Molmassenverteilung von unbehandeltem und von glucoseoxidase- behandeltem Milcheiweiß.....	65
Tab. 4.10.	Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem und in glucoseoxidase- behandeltem Milcheiweiß.....	67
Tab. 4.11.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß .....	68
Tab. 4.12.	Optimale Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase.....	69
Tab. 4.13.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase .....	75

Tab. 4.14.	Molmassenverteilung von Milcheiweiß, von Hydrolysaten aus Milcheiweiß, von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß und von Hydrolysaten aus enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß .....	86
Tab. 4.15.	Reaktionsprodukte der enzymatischen Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch .....	94
Tab. 4.16.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch .....	98
Tab. 4.17.	Molmassenverteilung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Glucose....	112
Tab. 4.18.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Glucose .....	114
Tab. 4.19.	Gehalt an Aminosäuren in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Glucose...	116
Tab. 4.20.	Molmassenverteilung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Lactose ....	119
Tab. 4.21.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Lactose .....	121
Tab. 4.22.	Gehalt an Aminosäuren in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Lactose ...	123
Tab. 4.23.	Molmassenverteilung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Pektin.....	127
Tab. 4.24.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Pektin.....	127
Tab. 4.25.	Gehalt an Aminosäuren in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Pektin.....	130
Tab. 4.26.	Molmassenverteilung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol] .....	133
Tab. 4.27.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol] .....	136
Tab. 4.28.	Gehalt an Aminosäuren in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol] .....	137
Tab. 4.29.	Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch <i>Maillard</i> -Reaktion .....	138
Tab. 4.30.	Molmassenverteilung von Natriumcaseinat, von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat, von Natriumcaseinat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten und von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten .....	161
Tab. 4.31.	Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat, von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat, von Molkenproteinisolat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten und von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat/Saccharid- <i>Maillard</i> -Produkten .....	165
Tab. 4.32.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Pektin-Pulvermischungen.....	172

### Tabellen in Kapitel 5: Abschließende Bewertung

Tab. 5.1.	Übersicht über die enzymatische und die chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß und die techno-funktionellen und die tropho-funktionellen Eigenschaften der Reaktionsprodukte.....	177
-----------	---	-----

### Tabellen in der Anlage

Tab. A.1.	Monomerenfraktionen in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat .....	xxi
Tab. A.2.	Monomerenfraktionen in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat .....	xxi

Tab. A.3.	Monomerenfraktionen in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Gesamtmilchprotein .....	xxii
Tab. A.4.	Monomerenfraktionen in unbehandeltem und in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat in Abhängigkeit von der Chlorogensäurekonzentration .....	xxii
Tab. A.5.	Techno-funktionelle Eigenschaften von unmodifiziertem Milcheiweiß .....	xxiii
Tab. A.6.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus laccasebehandelter Joghurtmilch .....	xxiv
Tab. A.7.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch .....	xxv
Tab. A.8.	Monomerenfraktionen in <i>Maillard</i> -Produkten aus Natriumcaseinat .....	xxvi
Tab. A.9.	Monomerenfraktionen in <i>Maillard</i> -Produkten aus Molkenproteinisolat .....	xxvi
Tab. A.10.	Monomerenfraktionen in <i>Maillard</i> -Produkten aus Gesamtmilchprotein .....	xxvi
Tab. A.11.	Molmassenverteilung von <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [500.000 g/mol] .....	xxvii
Tab. A.12.	Molmassenverteilung von unbehandeltem und von erhitztem Milcheiweiß .....	xxvii
Tab. A.13.	Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in <i>Maillard</i> -Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [500.000 g/mol] .....	xxviii
Tab. A.14.	SDS-Bindung von Sacchariden .....	xxviii
Tab. A.15.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Magermilchpulver .....	xxix
Tab. A.16.	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischungen ...	xxx

**Abkürzungsverzeichnis**

Auss.	Aussehen
BfEL Kiel	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel
CA	Chlorogensäure
D	Dextran
D40	Dextran [40.000 g/mol]
D500	Dextran [500.000 g/mol]
EAI	Emulsion Activity Index
EC	Enzyme Commission
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
G	Glucose
Ges.	Geschmack
Ger.	Geruch
GOX	Glucoseoxidase
GOX <sup>GC</sup>	Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität
GOX <sup>SC</sup>	Glucoseoxidase mit starker Catalaseaktivität
HMF	Hydroxymethylfurfural
Kons.	Konsistenz
L	Lactose
LPO	Lactoperoxidase
LPSL	Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung
MO-TG	mikrobielle Transglutaminase von <i>Streptovorticillium mobaraense</i>
MPI	Molkenproteinisolat
MP	Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver
MP <sub>oLH</sub>	Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver
MP <sub>mLH</sub>	Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver
NC	Natriumcaseinat
OPA	löslicher Aminostickstoff
P	Pektin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PPO	Laccase
PPO <sup>OT</sup>	Laccase ohne Tyrosinaseaktivität
PPO <sup>MT</sup>	Laccase mit Tyrosinaseaktivität
PSGTE	phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt
PSPM	Protein/Saccharid-Pulvermischung
r. F.	relative Feuchte
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-	Sulfhydryl-
U	Units
VK	Variationskoeffizient





## 1. Einleitung und Problemstellung

Proteine sind die Lebensmittelinhaltsstoffe, die die sensorischen, die techno-funktionellen und die tropho-funktionellen Eigenschaften von Lebensmitteln wesentlich bestimmen. Sensorische Eigenschaften wie Geruch, Geschmack und Textur werden durch Proteine vermittelt (Russell et al. 2006, Kinsella 1989), aber auch techno-funktionelle Eigenschaften wie Viskosität, Wasser- und Ölbindung, Schutzkolloidwirkung, Ausbildung/Stabilisierung von Grenzflächen und Gelbildung (Phillips et al. 1994) und tropho-funktionelle Eigenschaften wie Nährwert, biologische Wertigkeit und bioaktive Wirkungen (Walstra et al. 2006, Kinsella 1989).

Um die Eigenschaften von Lebensmitteln den Anforderungen anzupassen, die die Industrie, der Handel und die Verbraucher an Lebensmittel stellen, ist es daher besonders interessant, die Eigenschaften von Proteinen zu modifizieren. In der Literatur werden chemische, physikalische, gentechnische und enzymatische Verfahren zur Modifizierung der Eigenschaften von Eiweiß beschrieben (Lorenzen 2000b, Singh 1991, Kinsella 1989, Matheis und Whitaker 1987). Unter den enzymatischen Verfahren ist in den letzten Jahren eine Quervernetzung von Protein durch das Enzym Transglutaminase intensiv untersucht und auch industriell eingesetzt worden (Lorenzen 2007, Yokoyama et al. 2004, Jaros et al. 2006).

Transglutaminase [EC 2.3.2.13] katalysiert im Wesentlichen die Bildung von Isopeptidbindungen zwischen Lysyl- und Glutaminylresten von Proteinseitenketten (Zhu et al. 1995). Es entstehen Proteinpolymere mit Molmassen  $>2 \times 10^6$  g/mol, für die eine höhere Hitzestabilität, eine verbesserte Stabilisierung disperser Systeme, eine höhere Viskosität ihrer Lösungen und eine höhere Wasserbindung nachgewiesen werden konnte als für unbehandeltes Protein (Lorenzen 2000a, Lorenzen 2007, Flanagan et al. 2003, Tang et al. 2005). Für eine Anwendung der Transglutaminasebehandlung in der Herstellung von Milchprodukten, von Fleisch- und Wurstwaren und von Sojaproteinerzeugnissen wurde eine Verbesserung von Textur, Wasserbindungsvermögen, Verarbeitungseigenschaften und sensorischen Eigenschaften der Produkte beschrieben (Zhu et al. 1995). Durch Inkubation von Protein mit Transglutaminase werden nach Mautner et al. (1999) nur etwa 1% der Lysylreste in Protein modifiziert und die in-vivo Proteolysebarkeit von Protein nach Roos et al. (2003) im Wesentlichen nicht beeinträchtigt.

Als Alternative zur Modifizierung von Protein durch Transglutaminase wurden bisher wenige Möglichkeiten zur enzymatischen Quervernetzung von Protein beschrieben (Færgemand et al. 1998a, Thalmann 2003). Die Modifizierung von Protein durch andere Enzyme als Transglutaminase ist besonders dann interessant, wenn Proteine mit einer geringen sterischen Verfügbarkeit von Lysyl- und Glutaminylresten modifiziert werden sollen, wenn die Wirkung von Transglutaminase durch Enzyminhibitoren im Lebensmittel beeinträchtigt wird (De Jong et al. 2005) oder wenn Proteinmoleküle mit unterschiedlicher Molekülstruktur quervernetzt werden sollen (Han und Damodaran 1996). In der Literatur wurden erste Untersuchungen zur Modifizierung von Molkenprotein durch Peroxidase (Færgemand et al. 1998a), von Molkenprotein durch Tyrosinase (Thalmann 2003), von Fleischeiweiß durch Laccase (Lantto et al. 2007a) und von Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase (Primo-Martin et al. 2003) beschrieben. Thalmann (2003) berichtete über gute Schaumbildungseigenschaften von tyrosinasebehandeltem Molkenprotein, Shotaro (2002) über verbesserte Gelbildungseigenschaften von laccasebehandeltem Protein.

Auf der Seite der chemisch-physikalischen Verfahren zur Quervernetzung von Eiweiß - als Alternative zur enzymatischen Modifizierung von Protein durch Transglutaminase - wurde in den letzten Jahren die *Maillard*-Reaktion von Protein und Saccharid diskutiert. Es wurde

berichtet, dass Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte hergestellt werden können, die sich durch die funktionellen Eigenschaften von Proteinen und die funktionellen Eigenschaften von Sacchariden auszeichnen (Fechner et al. 2007, Mu et al. 2006).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur enzymatischen und zur chemisch-physikalischen Modifizierung von Protein ist bisher nur begrenzt möglich. In Studien wurden unterschiedliche Proteine unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen modifiziert. Reaktionsprodukte mit unterschiedlicher Molmasse, mit unterschiedlicher Struktur und mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften wurden gebildet.

Um einen direkten Vergleich der Eigenschaften von Milcheiweiß zu ermöglichen, das enzymatisch oder aber chemisch-physikalisch modifiziert wurde, wurde eine experimentelle, wissenschaftliche Übersichtsarbeit über die *Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften* mit folgenden Schwerpunkten durchgeführt:

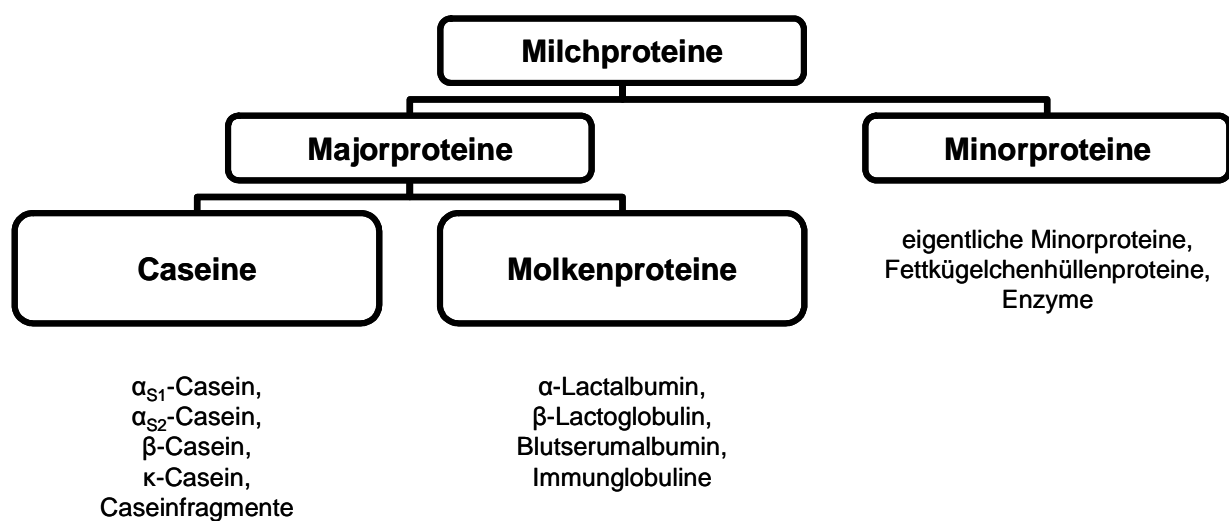
- (I.) Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase.
- (II.) Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, mit Lactose, mit Pektin und mit Dextran.
- (III.) Charakterisierung der techno-funktionellen und der tropho-funktionellen Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem beziehungsweise von chemisch-physikalisch modifiziertem Milcheiweiß.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1. Milcheiweiß

Milch enthält etwa 3,3% Milcheiweiß (Walstra et al. 2006), das neben Minorproteinen im Wesentlichen aus Caseinen und aus Molkenproteinen als den Majorproteinen von Milcheiweiß besteht. Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung von Milcheiweiß.

Caseine und Molkenproteine werden anhand ihrer chemisch-physikalischen, ihrer technofunktionellen und ihrer trophofunktionellen Eigenschaften voneinander unterschieden.



**Abb. 2.1.** Übersicht über die Zusammensetzung von Milcheiweiß

### Chemisch-physikalische Eigenschaften von Caseinen und Molkenproteinen

**Caseine** sind amphiphile Moleküle mit ungeordneter, offenkettiger Molekülstruktur und hydrophoben Eigenschaften. Durch einen hohen Gehalt an Prolin in der Primärstruktur von Casein bilden Caseinmoleküle im Wesentlichen keine Tertiärstruktur aus. In wässriger Lösung bilden Caseinmoleküle durch intermolekulare Calcium-Phosphat-Brückenbindungen, durch hydrophobe Wechselwirkungen und durch Wasserstoffbrückenbindungen Caseinmicellen aus (Walstra et al. 2006). Casein präzipitiert aus Milch durch Säuerung (pH 4,6, 20°C) und durch enzymatische Behandlung mit Lab. Casein ist weitgehend stabil gegenüber einer thermischer Behandlung bei Temperaturen von bis zu 120°C (Schlimmer und Buchheim 1999).

Die Molmasse der einzelnen Caseinfraktionen wird mit 19.023 g/mol ( $\kappa$ -Casein), mit 23.614 g/mol ( $\alpha_{S1}$ -Casein), mit 25.230 g/mol ( $\alpha_{S2}$ -Casein) und mit 23.983 g/mol ( $\beta$ -Casein) angegeben (Walstra et al. 2006).

**Molkenproteine** sind Moleküle mit globulärer, kompakter Molekülstruktur (Töpel 2004). Durch schwefelhaltige Aminosäuren in der Primärstruktur von Molkenproteinen bilden Molkenproteinmoleküle intramolekulare Disulfidbrückenbindungen aus und - als Folge - eine globuläre Tertiärstruktur. Die Oberfläche von Molkenproteinmolekülen wird als weitgehend hydrophil beschrieben. Molkenproteine sind gegenüber einer Säuerung (pH 4,6, 20°C) und einer Behandlung mit Lab deutlich unempfindlicher als Caseine, sie denaturieren jedoch durch eine thermische Behandlung bei Temperaturen  $\geq 70^\circ\text{C}$  (Töpel 2004).

Die Molmasse der einzelnen Molkenproteinfraktionen wird mit 14.176 g/mol ( $\alpha$ -Lactalbumin), mit 18.283 g/mol ( $\beta$ -Lactoglobulin) und mit 66.267 g/mol (Blutserumalbumin) angegeben (Walstra et al. 2006).

### **Techno-funktionelle Eigenschaften von Caseinen und Molkenproteinen**

Die unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften von Caseinen und von Molkenproteinen führen zu unterschiedlichen techno-funktionellen Eigenschaften, die Töpel (2004) gegenüberstellt.

**Caseine** zeichnen sich im Wesentlichen durch gute Grenzflächeneigenschaften, eine hohe Hydrationsfähigkeit, eine hohe Hitzestabilität und die Ausbildung viskoser Lösungen aus.

Für **Molkenproteine** werden eine kolloidale Löslichkeit, die Fähigkeit zur Gelbildung und gute Grenzflächeneigenschaften angeführt (Töpel 2004). Die techno-funktionellen Eigenschaften von Molkenproteinen sind abhängig vom Grad der Denaturierung der Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen und können besonders durch eine prädenaturierende Erhitzung verbessert werden (Konrad und Lieske 1994, Lorenzen 1983).

### **Tropho-funktionelle Eigenschaften von Caseinen und Molkenproteinen**

**Caseine** und **Molkenproteine** sind Proteine mit hoher ernährungsphysiologischer Qualität und hoher Bioverfügbarkeit in Milch. Walstra et al. (2006) geben für Molkenprotein eine höhere Proteinqualität an als für Casein. Für Gesamtmilchprotein wird eine höhere Proteinqualität berichtet als für einzelne Proteinfraktionen, da sich die limitierenden Aminosäuren in Casein (Cystein, Methionin) und in Molkenprotein (Tyrosin, Phenylalanin) ergänzen (Walstra et al. 2006). Nach Kinsella (1989) werden Caseine als Folge der offenkettigen Tertiärstruktur von Caseinmolekülen leichter enzymatisch hydrolysiert als Molkenproteine.

Über den Nährwert von Caseinen und von Molkenproteinen hinaus diskutierten Liu et al. (2007) und Tong et al. (2000) für Milcheiweiß antioxidative Eigenschaften.

Für Proteinfragmente, die beispielsweise in Milch durch das Enzym Plasmin aus Caseinen gebildet werden, werden bioaktive Eigenschaften beschrieben (Schlimme und Buchheim 1999, Fitzgerald und Meisel 2003). Fitzgerald und Meisel (2003) geben einen umfassenden Überblick über die opioiden (Casomorphine,  $\alpha$ -Lactorphin,  $\beta$ -Lactorphin), die opioidantagonistischen (Lactoferroxine, Casoxine), die ACE-inhibitorischen (Casokinine, Lactokinine), die immunmodulierenden (Immunopeptide), die antimikrobiellen (Lactoferricin, Casocidin, Isracidin), die antithrombotischen (Casoplateline) und die mineralstoffbindenden (Phosphopeptide) Eigenschaften von bioaktiven Peptiden aus Milcheiweiß.

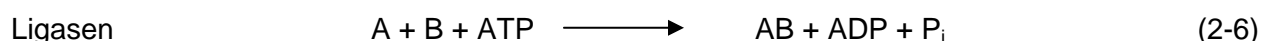
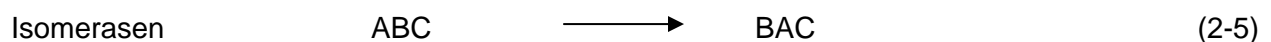
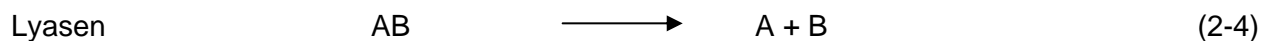
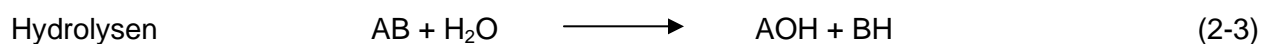
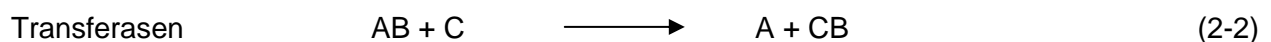
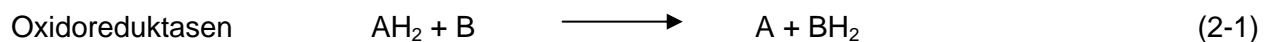
## 2.2. Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß

### 2.2.1. Enzyme (allgemein)

Enzyme sind Proteine mit katalytischer Aktivität. Sie werden in biologischen Zellen gebildet und katalysieren den komplexen Ablauf des Stoffwechsels als wesentliches Merkmal des Lebens.

Enzyme katalysieren spezifische chemische Reaktionen (*Reaktionsspezifität*) unter Umsetzung spezifischer Substratmoleküle (*Substratspezifität*). Die katalytische Wirkung von Enzymen besteht in der Eigenschaft, mit Substratmolekülen eine Zwischenverbindung einzugehen und die Aktivierungsenergie chemischer Reaktionen zu senken. Aus der Zwischenverbindung Substrat/Enzym gehen die Reaktionsprodukte und das unveränderte Enzym hervor. Enzyme beschleunigen so den Ablauf chemischer Reaktionen ohne das Gleichgewicht der Reaktionen zu verändern (Hansen und Frömmel 1994).

Die Klassifizierung und Nomenklatur von Enzymen erfolgt anhand der Reaktionsspezifität von Enzymen nach den Regeln der „*International Union of Pure and Applied Chemistry (I.U.P.A.C.)*“ und der „*International Union of Biochemistry (I.U.B.M.B.)*“ in [1] Oxidoreduktasen, in [2] Transferasen, in [3] Hydrolasen, in [4] Lyasen, in [5] Isomerasen und in [6] Ligasen. Die wesentlichen Reaktionen der Enzymklassen sind schematisch in den Formeln 2-1 bis 2-6 dargestellt.



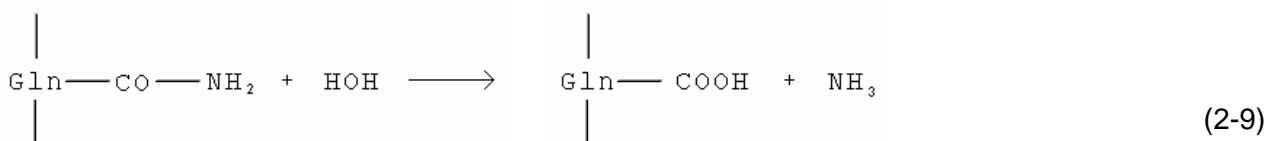
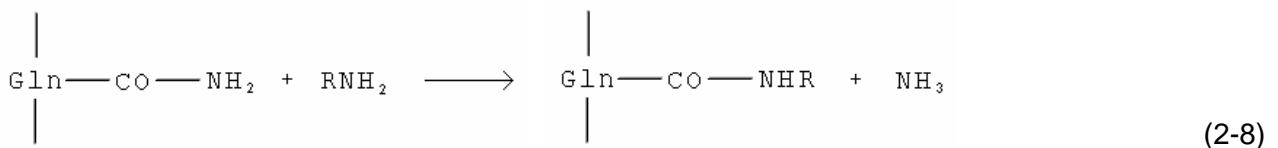
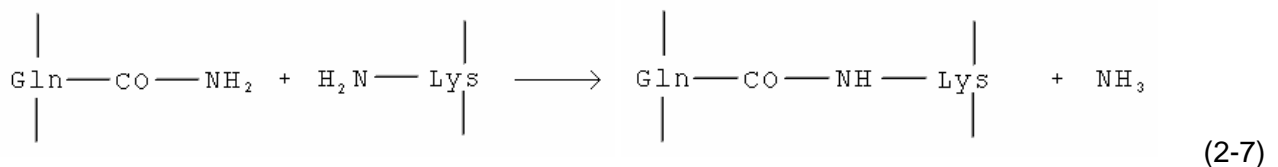
Die Modifizierung von Lebensmittelproteinen durch enzymatische Verfahren gilt als besonders innovatives Verfahren zur Veränderung der techno-funktionellen, der tropho-funktionellen und der sensorischen Eigenschaften von Proteinen (Lorenzen 2000b). In den Kapiteln 2.2.2., 2.2.3., 2.2.4. und 2.2.5. werden die Enzyme Transglutaminase, Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase als die Enzyme charakterisiert, die die Eigenschaften von Proteinen durch eine Quervernetzung von Aminosäureseitenketten in und zwischen Proteinmolekülen modifizieren können.

### 2.2.2. Transglutaminase [EC 2.3.2.13]

#### Hintergrund

Transglutaminase beziehungsweise Protein-glutamin:amin- $\gamma$ -glutamyl-transferase [EC 2.3.2.13] ist ein Enzym, das nach IUPAC-Nomenklatur der Gruppe der Transferasen zugeordnet wird.

Transglutaminase katalysiert drei wesentliche Reaktionen: eine enzymatische Quervernetzung von peptidgebundenen Glutaminyl- und Lysylresten (Formel 2-7), einen Acyltransfer (Formel 2-8) und eine Desaminierung (Formel 2-9).



Transglutaminasen wurden im pflanzlichen, im tierischen, im menschlichen und im mikrobiellen Organismus nachgewiesen (Zhu et al. 1995). Die industriell eingesetzte mikrobielle Transglutaminase (MO-TG) ist ein Exoenzym von *Streptovorticillium mobaraense*. MO-TG ist ein globuläres, hydrophiles Polypeptid mit einer Molmasse von 37.900 g/mol aus 331 Aminosäurenresten (Zhu et al. 1995). Die katalytische Aktivität von MO-TG wird vermittelt durch einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms.

Bei der enzymatischen Quervernetzung von Protein durch MO-TG (Formel 2-7) bindet der  $\gamma$ -Carboxy-Glutaminylrest eines Proteinmoleküls an das aktive Zentrum der MO-TG (Chica et al. 2004). Durch den nukleophilen Angriff eines Lysylrestes bildet sich eine Isopeptidbindung zwischen Glutaminylrest und Lysylrest aus. Das Isopeptid dissoziiert vom Enzymkomplex; Ammoniak wird freigesetzt (Pedersen et al. 1994, Taguchi et al. 2000).

Eine enzymatische Quervernetzung von Protein durch Transglutaminase wurde beschrieben für tierisches Eiweiß (Fleischeiweiß, Milcheiweiß, Hühnereieiweiß) und für pflanzliches Eiweiß (Sojaprotein, Getreideeiweiß). Transglutaminase katalysiert die Bildung von Proteinpolymeren mit Molmassen  $>2 \times 10^6$  g/mol (Lorenzen 2000a). Es wurde nachgewiesen, dass die Reaktionsprodukte eine höhere Hitzestabilität (Lorenzen 2000a, Tang et al. 2005, Mounsey et al. 2005, Flanagan et al. 2003), verbesserte Grenzflächeneigenschaften (Wang et al. 2002, Tang et al. 2004, Yildirim et al. 1996), eine höhere Löslichkeit (Lorenzen 2000a), eine höhere Viskosität (Mounsey et al. 2005), verbesserte sensorische Eigenschaften (Mautner 2000) und

eine verbesserte Shelf-Life-Stabilität (Zhu et al. 1995) gegenüber unbehandeltem Protein aufweisen.

Nur etwa 1% des Lysins von Protein wird durch MO-TG umgesetzt (Mautner 2000). Die in-vivo Proteolysierbarkeit von Protein wird nach Roos et al. (2003) durch MO-TG nicht beeinträchtigt. Durch Inkubation mit MO-TG sinkt das allergene Potential von Protein (Yamauchi et al. 1991), essentielle Aminosäuren können in Protein integriert werden (Zhu et al. 1995) und die intestinale Absorption von Mineralstoffen kann verbessert werden (Noguchi et al. 1992).

Für eine Anwendung der Transglutaminasebehandlung in der Herstellung von Milchprodukten, von Fisch- und Fleischwaren sowie von Sojaproteinerzeugnissen wird eine Verbesserung von Textur, Wasserbindungsvermögen, Verarbeitungseigenschaften und sensorischen Eigenschaften der Produkte beschrieben (Zhu et al. 1995, Yokoyama et al. 2004).

### **Begrenzungen der Anwendung von Transglutaminase**

Folgende Begrenzungen der Transglutaminasebehandlung von Protein werden beschrieben:

- eine geringe Wirkung von MO-TG gegenüber Proteinen mit einer geringen sterischen Verfügbarkeit von Lysyl- und Glutaminyresten,
- eine Inhibierung von MO-TG durch Enzyminhibitoren im Produkt (z.B. in Rohmilch) (De Jong et al. 2005),
- unerwünschte sensorische Eigenschaften von Lebensmitteln durch Anwendung der Transglutaminasebehandlung (z.B. ein geringes Volumen und eine zähe Konsistenz von Teigen in der Backwarenherstellung) (Caballero et al. 2007),
- unerwünschte techno-funktionelle Eigenschaften von Proteinpolymeren (z.B. eine geringe Emulgieraktivität und eine geringe Aufschlagfähigkeit) (Lorenzen 2000a),
- unerwünschte technologische Wirkungen von MO-TG auf den Produktionsprozess (z.B. eine Verlängerung der Fermentationszeit von Joghurtmilch) (Mautner 2000),
- eine geringe Aktivität von MO-TG zur Quervernetzung von Proteinen mit unterschiedlicher Molekülstruktur oder aber zur Bildung komplex zusammengesetzter Polymere aus verschiedenen Naturstoffmolekülen (Han und Damodaran 1996).

### **Erweiterung und Alternativen zur Anwendung von Transglutaminase**

In der Literatur wurde beschrieben, dass die enzymatische Polymerisierung von Protein durch MO-TG durch eine Kombination mit einer chemisch-physikalischen oder mit einer enzymatischen Behandlung von Protein verbessert werden kann.

Eine Behandlung von Protein durch Erhitzung (Lorenzen 2007), durch hydrostatischen Hochdruck (Trespalacios and Pla 2007, Partschefeld et al. 2007) und durch Acidifizierung (Eissa et al. 2004) wurde vor oder aber zeitgleich mit einer Inkubation von Protein mit MO-TG eingesetzt. Eine Modifizierung von Protein durch Transglutaminase/Tyrosinase- (Lantto et al. 2006), Transglutaminase/Peptidase- (Hassan et al. 2007, Caballero et al. 2007), Transglutaminase/Amylase- und Transglutaminase/Xylanase-Kombination (Caballero et al. 2007) wurde beschrieben.

Übersichtsarbeiten geben einen Überblick über Enzymsysteme, mit denen Protein als Alternative zur Inkubation mit MO-TG quervernetzt werden kann. Lactoperoxidase (s. Kap. 2.2.3.), Phenoloxidasen (s. Kap. 2.2.4.) und Glucoseoxidase (s. Kap. 2.2.5.) werden durch Singh (1991) und Matheis und Whitaker (1984) angeführt.

### 2.2.3. Lactoperoxidase [EC 1.11.1.7]

Lactoperoxidase [EC 1.11.1.7] ist ein Enzym, das nach IUPAC-Nomenklatur der Gruppe der Oxidoreduktasen zugeordnet wird. Lactoperoxidase katalysiert verschiedene Redoxreaktionen durch einen Wechsel des Oxidationszustands ihres katalytisch wirksamen Eisenions (Kussendrager und van Hooijdonk 2000).

Lactoperoxidase ist ein hämhaltiges Glycoprotein aus 608 Aminosäuren mit einer Molmasse von 78.000 g/mol (Boots und Floris 2006). Sie ist das quantitativ bedeutendste Enzym in Milch (Østdal et al. 2000). Peroxidasen allgemein können ubiquitär im pflanzlichen, im tierischen und im mikrobiellen Gewebe nachgewiesen werden (Kussendrager und van Hooijdonk 2000).

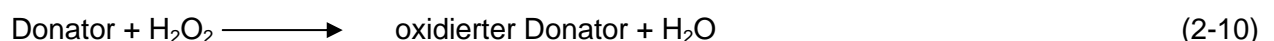
Die wesentliche Reaktion der Lactoperoxidase besteht in der Spaltung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff, bezeichnet als Peroxidaseaktivität. Neben der Peroxidaseaktivität führen Boots und Floris (2006), Matheis und Whitaker (1984) und Koppelman und Wijngaards (2000) auch eine Oxidase-, eine Catalase- und eine Hydroxylaseaktivität der Lactoperoxidase an (Tab. 2.1). Grabber et al. (2000) beobachteten darüber hinaus Acyltransferreaktionen durch Peroxidase.

**Tab. 2.1.** Enzymaktivität der Lactoperoxidase

Enzymaktivität	Reaktion
1. Peroxidaseaktivität	Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser
2. Oxidaseaktivität	Umsetzung von Hydroxylgruppen zu Carbonylgruppen
3. Catalaseaktivität	Abspaltung von atomarem Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid
4. Hydroxylaseaktivität	Einführung von Hydroxylgruppen in Aromaten

Eine Quervernetzung von Proteinmolekülen durch Lactoperoxidase wurde erstmals anhand der Bildung von Dityrosin in Milch, die durch Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid sterilisiert wurde, beschrieben (Østdal et al. 2000). Die Quervernetzung von Aminosäurenresten wird im Wesentlichen auf die Peroxidase- und die Hydroxylaseaktivität von Peroxidasen zurückgeführt (Koppelman und Wijngaards 2000).

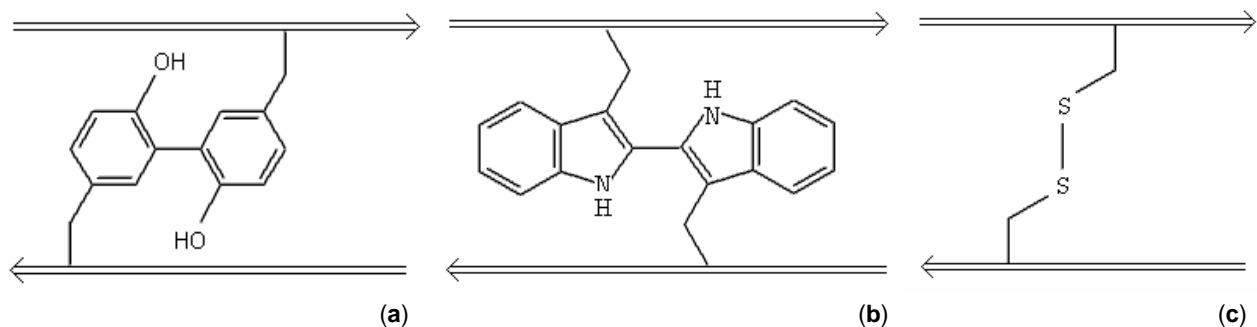
Das katalytisch wirksame Eisenion der Lactoperoxidase liegt in Ruhe als Eisen(II)-Ion vor. Durch eine enzymatische Abspaltung von Sauerstoff aus Peroxiden wird das Eisen(II)-Ion zum Eisen(III)-Ion oxidiert und kann nach Formel (2-10) verschiedene Elektronendonatoren unspezifisch oxidieren (Matheis und Whitaker 1984).



Als Donatoren dienen im Wesentlichen leicht oxidierbare Aminosäureseitenketten (Oudgenoeg et al. 2001, Aeschbach et al. 1976, Stahmann et al. 1977, Schooneveld-Bergmans et al. 1999) von Tyrosin, Tryptophan und schwefelhaltigen Aminosäuren. Die enzymatisch oxidierten Donatoren und radikalischen Intermediate (Grabber et al. 2000, Oudgenoeg et al. 2001,



Matheis und Whitaker 1984, Stahmann et al. 1977) sind chemisch instabil und reagieren durch spontane Oxidations-, Additions- und Kondensationsreaktionen zu stabilen Reaktionsprodukten und Aggregaten (Stahmann et al. 1977, Oudgenoeg et al. 2001, Michon et al. 1999, Grabber et al. 2000). Es entstehen Protein/Protein-Vernetzungsprodukte über Isodityrosin-, Dityryptophan- und Disulfid-Verbindungen (Abb. 2.2), die beispielsweise die elastischen und wasserunlöslichen Eigenschaften der Strukturproteine Kollagen, Elastin und Extensin vermitteln (Oudgenoeg 2001, Koppelman und Wijngaards 2000, Grabber et al. 2000). Neben Protein/Protein-Produkten können durch Peroxidasen auch Protein/Phenol-, Protein/Kohlenhydrat- und Protein/Lipid-Produkte ausgebildet werden (Schooneveld-Bergmans et al. 1999, Østdal et al. 2000, Boeriu et al. 2004). In Abhängigkeit von den Substratmolekülen und den Reaktionsbedingungen (Østdal et al. 2000, Stahmann et al. 1977) entstehen verschiedene Reaktionsprodukte durch intra- und intermolekulare kovalente Bindungen (Aeschbach et al. 1976), aber auch durch hydrophobe Wechselwirkungen und durch Wasserstoffbrückenbindungen (Stahmann et al. 1977).



**Abb. 2.2.** Proteinvernetzungsprodukte der Lactoperoxidase  
**a** = Isodityrosin, **b** = Dityryptophan, **c** = Disulfid

In Bezug auf das System Milch wurde Lactoperoxidase bisher im Wesentlichen aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften eingesetzt. Anwendungen von Lactoperoxidase zur Kaltsterilisierung von Milch (Marin et al. 2005, Fonteh et al. 2005), zur Kontrolle der Aktivität der Mikroflora und zur Hemmung der Nachsäuerung von Joghurt und Käse (Hirano und Kudo 1998) sowie als Indikator einer Erhitzung von Milch bei Temperaturen  $>85^{\circ}\text{C}$  (Kussendrager und van Hooijdonk 2000, Seifu et al. 2005) wurden beschrieben.

Eine oxidative Modifizierung von Milcheiweiß durch Peroxidasen wurde berichtet für Molkenproteinisolat (Færgemand et al. 1998a), für Casein (Aeschbach et al. 1976, Østdal et al. 2000, Boeriu et al. 2004), für  $\beta$ -Lactoglobulin (Østdal et al. 2000, Stahmann et al. 1977) und für Blutserumalbumin (Østdal et al. 2000, Thomas und Aune 1977, Stahmann et al. 1977, Aeschbach et al. 1976).

Eine genaue Charakterisierung der Reaktionsprodukte auf Molmasse, Struktur, techno- und tropho-funktionelle Eigenschaften liegt bisher nicht vor. Lediglich für eine Inkubation von Molkenprotein mit Peroxidase/Wasserstoffperoxid beobachteten Færgemand et al. (1998a) die Bildung von Proteinoligomeren, deren Viskosität in wässriger Lösung die Viskosität von unbehandeltem Molkenprotein überstieg.

### 2.2.4. Laccase [EC 1.10.3.2]

Laccasen [EC 1.10.3.2] sind Enzyme, die nach IUPAC-Nomenklatur der Gruppe der Oxidoreduktasen zugeordnet werden. Sie katalysieren Redoxreaktionen durch einen Wechsel des Oxidationszustands und einen Elektronentransfer zwischen ihren katalytisch wirksamen Kupferionen (Claus 2004, Shotaro 2002).

Laccasen sind Phenoloxidasen, die ubiquitär im bakteriellen, im mykotischen, im pflanzlichen und im tierischen Organismus nachgewiesen werden können (Claus 2004, Mattinen et al. 2005). Die Laccase von *Myceliophthera thermophila* (Kap. 3.1.) besteht aus einer Polypeptidkette von 540 Aminosäuren mit einer Molmasse von 64.000 g/mol. Jedes Laccasemolekül besitzt zwei Substratbindungsstellen und vier katalytische Kupferionen, die in Gegenwart von Sauerstoff von  $\text{Cu}^{1+}$  zu  $\text{Cu}^{2+}$  oxidiert und aktiviert werden.

Laccase katalysiert im Wesentlichen eine Dioxygenierung von o- und p-Diphenolen in Gegenwart von Sauerstoff zu den korrespondierenden o- und p-Chinonen (Tab. 2.2). Jeweils ein Molekül Sauerstoff liefert Laccase die Elektronen zur Bildung von zwei Chinonmolekülen (Claus 2004, Mattinen et al. 2005, Shotaro 2002).

**Tab. 2.2.** Enzymaktivität der Laccase

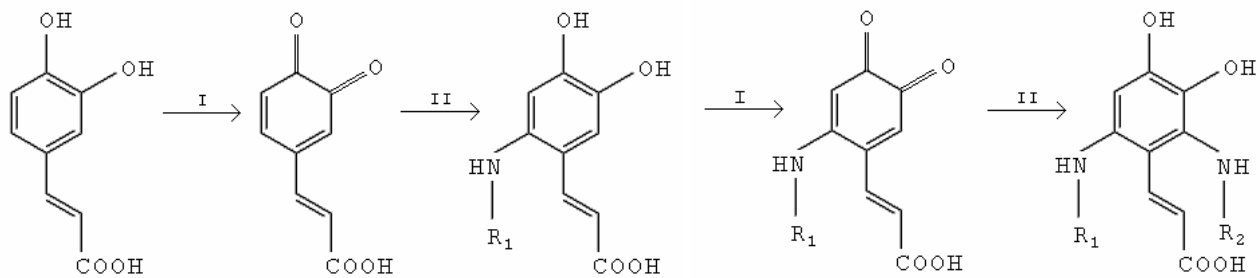
Enzymaktivität	Reaktion
1. Catecholaseaktivität	Oxidation von o- und p-Diphenolen zu o- und p-Chinonen
2. Phenolaseaktivität <sup>1)</sup>	Oxidation von Mono- und Diphenolen zu Chinonen
3. Catalaseaktivität <sup>1)</sup>	Abspaltung von atomarem Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid
4. Peroxidaseaktivität <sup>1)</sup>	Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser

<sup>1)</sup> nicht für alle Laccasen nachweisbar (vgl. Lantto et al. 2005, Yamazaki et al. 2004, Selinheimo et al. 2007)

Chinone sind chemisch instabil und reagieren mit nucleophilen Molekülen durch Oxidations-, Substitutions-, Additions- und Kondensationsreaktionen spontan weiter (Figueroa-Espinoza und Rouau 1999, Matheis und Whitaker 1984). Über radikalische Intermediate (Claus 2004, Mattinen et al. 2006, Lantto et al. 2005, Selinheimo et al. 2007) entstehen folgende polymere, heterogen zusammengesetzte Melanoidine (Hurrel und Finot 1982, Thalmann 2003):

- Chinone bilden untereinander Phenolpolymere aus (Claus 2004, Færgemand et al. 1998a).
- Chinone oxidieren Proteinmoleküle (Færgemand et al. 1998a), Kohlenhydrate (Figueroa-Espinoza und Rouau 1999) oder auch Fette (Norsker et al. 2000). In Gegenwart von Proteinmolekülen werden Aminosäurenreste von Tyrosin (Hurrel und Finot 1982, Mattinen et al. 2005, Jee et al. 2000), von Tryptophan (Mattinen et al. 2006, Hurrel und Finot 1982), von Cystein (Matheis und Whitaker 1984, Shotaro 2002), von Lysin (Matheis und Whitaker 1984, Hurrel und Finot 1982, Shotaro 2002), von Methionin (Hurrel und Finot 1982, Shotaro 2002) und/oder von Histidin (Shotaro 2002) unspezifisch oxidiert. Nach dem in Abbildung 2.3 dargestellten Mechanismus entstehen Protein/Phenol-Vernetzungsprodukte (Færgemand et al. 1998a).
- Chinone oxidieren Proteinmoleküle und werden dabei selbst zu Diphenolen reduziert (Figueroa-Espinoza und Rouau 1999). Es werden spontan Protein/Protein-

Vernetzungsprodukte ausgebildet (Jee et al. 2000). Verschiedene Vernetzungsprodukte wie Isodityrosin, Disulfid, Tyrosin-Cystein, Tyrosin-Lysin und Dityryptophan (vgl. Abb. 2.2) werden intra- und intermolekular ausgebildet (Selinheimo et al. 2007, Lantto et al. 2007b, Matheis und Whitaker 1984).



**Abb. 2.3.** Vernetzung von Protein R<sub>1</sub> und Protein R<sub>2</sub> durch Laccase (modifiziert nach Thalmann 2003)

Reaktion I = enzymatische Oxidation von Diphenolen in Gegenwart von Sauerstoff zu Chinonen  
 Reaktion II = spontane Stabilisierung der Chinone durch Additionsreaktion mit Proteinen

Neben diesen spontanen Reaktionen als Folge der Catecholaseaktivität von Laccasen, wird in der Literatur auch eine Phenolase- (Lantto et al. 2005), eine Catalase- oder eine Peroxidaseaktivität von Phenoloxidasen (Yamazaki et al. 2004) berichtet (Tab. 2.2). Laccasen gelten als wenig spezifisch gegenüber ihren Substratmolekülen (Minussi et al. 2002, Claus 2004, Shotaro 2002, Mattinen et al. 2006). Als Ursache führen Yamazaki et al. (2004) an, dass das aktive Zentrum von Phenoloxidasen Substratmolekülen leicht zugänglich ist.

Ein umfassender Überblick über Anwendungen von Laccasen im Lebensmittelbereich, beispielsweise zur Stabilisierung von Fruchtsaft, Bier und Wein gegen Trübungsreaktionen und zur Entfernung von Sauerstoff aus Pflanzenölen, liegt vor (Minussi et al. 2002). Eine Quervernetzung von Lebensmittelproteinen durch Phenoloxidasen wurde bisher untersucht für die pflanzlichen Proteine aus Ackerbohne (Shotaro 2002) und Getreide (Figuroa-Espinoza und Rouau 1999, Shotaro 2002, Selinheimo et al. 2007) sowie die tierischen Proteine Casein (Shotaro 2002, Halaouli et al. 2005),  $\alpha$ -Lactalbumin (Thalmann 2003, Færgemand et al. 1998a),  $\beta$ -Lactoglobulin (Thalmann 2003, Shotaro 2002, Færgemand et al. 1998a), Blutserumalbumin (Shotaro 2002) und Muskelfaserprotein (Lantto et al. 2005, Lantto et al. 2006, Lantto et al. 2007a, Lantto et al. 2007b, Shotaro 2002). Muskelfaserproteine bildeten durch Modifizierung mit Laccase feste Proteingele (Shotaro 2002) und Kollagenetzwerke mit guten Wasserbindungs- und Erhitzungseigenschaften aus (Lantto et al. 2005, Lantto et al. 2006, Lantto et al. 2007b). Durch Inkubation von Weizeneiweiß mit Laccase konnten Protein/Protein- und Protein/Arabinoxylan-Produkte synthetisiert werden (Figuroa-Espinoza und Rouau 1999), die in Backwaren zu einem hohen Gebäckvolumen, einer weichen Kruste und einer ungleichmäßigen Krumenstruktur führten (Selinheimo et al. 2007).

Lantto et al. (2006) und Thalmann (2003) beschrieben die Möglichkeit, Phenoloxidasen (wie Laccase oder Tyrosinase) aus Rückständen der Lebensmittelindustrie wie Apfeltrester oder Kartoffelsaft zur Modifizierung von Proteinen einzusetzen.

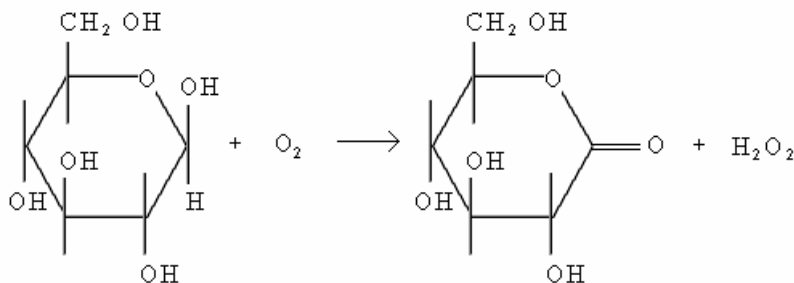
Wenige Untersuchungen wurden bisher zur Quervernetzung von Milcheiweiß mit Laccase durchgeführt. Færgemand et al. (1998a) und Shotaro (2002) berichteten eine Oligomerisierung von Milcheiweiß durch Laccase, Thalmann (2003) eine Quervernetzung von Molkenprotein durch Tyrosinase. Im Vergleich zu unbehandeltem Protein wiesen Thalmann (2003) verbesserte Schaumbildungseigenschaften von tyrosinasebehandeltem Molkenprotein nach, Færgemand et al. (1998a) und Shotaro (2002) eine tendenziell höhere Viskosität der Lösungen von laccasebehandeltem Milcheiweiß.

### 2.2.5. Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4]

Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4] ist ein Enzym, das nach IUPAC-Nomenklatur der Gruppe der Oxidoreduktasen zugeordnet wird. Ihre katalytische Wirkung wird auf Redoxreaktionen von FAD-Molekülen als den prosthetischen Gruppen der Glucoseoxidase zurückgeführt (Tsuge et al. 1975).

Glucoseoxidasen sind Enzyme des Stoffwechsels von Pilzen wie *Aspergillus sp.* und *Penicillium sp.* (Nakamura und Fujiki 1968). Glucoseoxidase von *Aspergillus niger* (Kap. 3.1.) ist ein dimeres Glycoprotein mit einer Molmasse von 160.000 g/mol (Swoboda und Massey 1965). Jede ihrer beiden Untereinheiten besteht aus 604 Aminosäurenresten, einem Mol Eisen und einem Mol FAD (O'Malley und Weaver 1972, Tsuge et al. 1975).

Glucoseoxidase katalysiert im Wesentlichen die Oxidation von  $\beta$ -D-Glucose zu  $\delta$ -D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid (Hanft und Köhler 2006) (Abb. 2.4). Bei dieser Reaktion wird FAD durch das Substrat  $\beta$ -D-Glucose zu  $\text{FADH}_2$  reduziert und durch die Gegenwart von Sauerstoff zu FAD reoxidiert. Wasserstoffperoxid wird freigesetzt.



**Abb. 2.4.** Umsetzung von  $\beta$ -D-Glucose und Sauerstoff zu  $\delta$ -D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid durch Glucoseoxidase

Wasserstoffperoxid ist chemisch instabil und reagiert spontan weiter. Wasserstoffperoxid zerfällt zu Wasser und Sauerstoff und kann zu einer direkten Oxidation verschiedener Moleküle führen. Besonders aromatische Ringsysteme oder aber Sulfhydrylgruppen von Proteinen werden als potenzielle Ziele unspezifischer Oxidationsreaktionen beschrieben. Reaktionsprodukte wie Isodityrosin und Disulfid werden ausgebildet (Rosell et al. 2003, Primo-Martin et al. 2005, Poulsen und Bak Høstrup 1998, Vernulapalli und Hoseneý 1998, Bonet et al. 2006, Hanft und Köhler 2006). Proteinoxidationsprodukte und radikalische Intermediate führen die nicht-enzymatische Reaktion fort und stabilisieren sich durch Oxidation oder durch Kondensation mit weiteren Proteinmolekülen oder aber Kohlenhydratmolekülen (Primo-Martin et al. 2005).

Hanft und Köhler (2006) führten den Einfluss von Glucoseoxidase auf die Eigenschaften von Backwaren neben der Wirkung von Wasserstoffperoxid auf eine Phenoxidase-Nebenaktivität technischer Glucoseoxidase-Präparate zurück. In der Literatur wird beschrieben, dass Glucoseoxidase neben  $\beta$ -D-Glucose auch andere Moleküle mit Sechsringstruktur oxidiert (Pazur und Kleppe 1964). Nach Leskovac et al. (2005), Alzari et al. (1996), Trivić et al. (2002) und Chan und Bruice (1977) kann Glucoseoxidase anstelle von Sauerstoff auch beispielsweise Chinonmoleküle als Oxidationsmittel nutzen (Leskovac et al. 2005, Alzari et al. 1996, Trivić et al. 2002, Chan und Bruice 1977). Trivić et al. (2002) wiesen nach, dass Glucoseoxidase direkt freie Radikale produziert.

Ein umfassender Überblick über Anwendungen von Glucoseoxidase im Lebensmittelbereich, beispielsweise zur Entzuckerung oder zur Desoxygenierung von Mayonnaise und Fleischwaren, liegt vor (Ruttloff 1994). Eine Quervernetzung von Lebensmittelproteinen durch Glucoseoxidase wurde bisher ausschließlich für pflanzliche Proteinfractionen aus Getreidearten untersucht. Bonet et al. (2006), Primo-Martin et al. (2003), Dunnewind et al. (2002) und Poulsen und Bak Høstrup (1998) wiesen eine Polymerisierung von Glutenmolekülen durch Glucoseoxidase nach, Vernulapalli et al. (1998), Rosell et al. (2003) und Rasiah et al. (2005) eine enzymatische Vernetzung von wasserlöslichen Getreideeiweißfraktionen. Ein Einsatz von Glucoseoxidase führt zur Ausbildung fester (Rosell et al. 2003, Primo-Martin et al. 2005, Hanft und Köhler 2006) und trockener (Miller und Hoseneý 1999, Hanft und Köhler 2006) Teige, zu einem hohen Gebäckvolumen (Vernulapalli und Hoseneý 1998, Rosell et al. 2003) und zu einer großporigen Krumenstruktur (Tokutake et al. 1996).

Eine Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase wird bisher nicht beschrieben. Anwendungen von Glucoseoxidase in Milchprodukten wurden berichtet zur Bleichung, zur Biokonservierung (Montgomery 1986) und zur Desoxygenierung (Tamsma und Tarassuk 1957).

## 2.3. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß

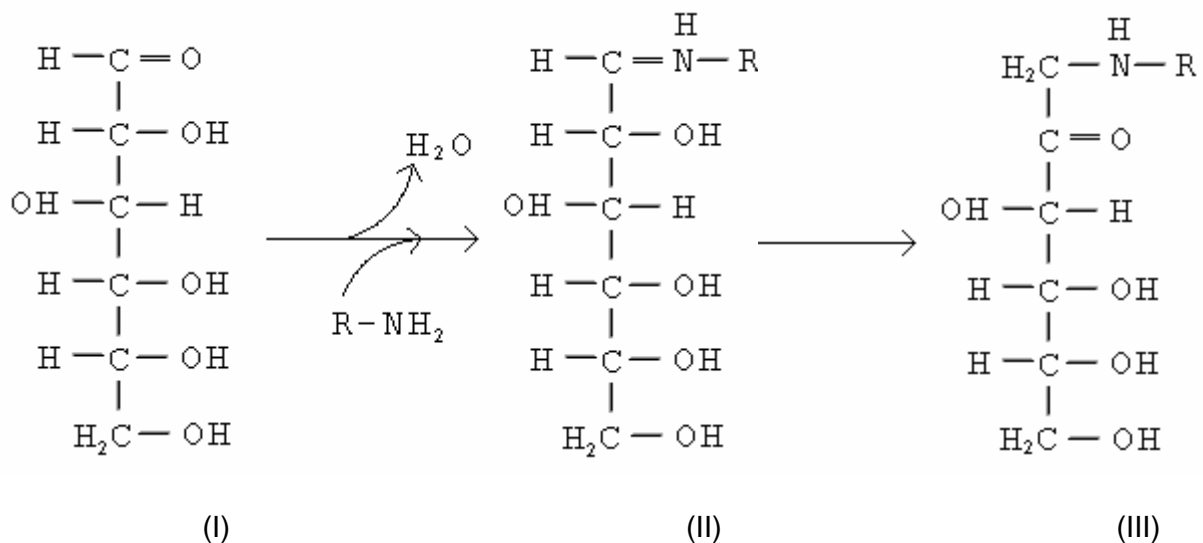
### 2.3.1. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion

Als *Maillard*-Reaktion werden chemisch-physikalische Reaktionen bezeichnet, die zwischen Sacchariden und Proteinen, Peptiden, Aminosäuren oder Aminen ablaufen (Friedmann 1996). Besonders bei höherer Temperatur und bei niedriger Wasseraktivität (Morgan et al. 1999a) führen spontane Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen von Sacchariden und den funktionellen Gruppen von Proteinen zur Bildung von *Maillard*-Produkten (De Block et al. 2003). *Maillard*-Produkte entstehen beispielsweise als geruchswirksame und geschmackswirksame, braungefärbte Verbindungen bei Röst-, Brat- und Backprozessen (Chevalier et al. 2001b, van Boekel 1998) oder sie werden spontan während der Herstellung und der Lagerung von Trockenmilchprodukten gebildet (Thomas et al. 2004b). *Maillard*-Produkte entstehen auch in-vivo durch eine Glycosylierung von Proteinen in Körpergeweben und werden mit Diabetes mellitus, mit Alterungsprozessen und mit Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht (Dills 1993).

Insgesamt sind *Maillard*-Produkte eine sehr heterogene Gruppe von Protein/Saccharid- und Protein/Protein-Verbindungen (Miller und Gerrard 2005).

Unter dem Begriff „*Maillard*-Reaktion“ werden verschiedene chemisch-physikalische Reaktionen zusammengefasst, die in 3 wesentlichen Reaktionsphasen ablaufen (De Block et al. 2003).

Im **Anfangsstadium** der Reaktion addieren Aminogruppen von Proteinen an die Carbonylgruppen reduzierender Zucker (De Block et al. 2003). Abbildung 2.5 stellt am Beispiel der *Maillard*-Reaktion eines Proteins mit Glucose dar, dass die Aminogruppe des Proteins an die Aldehydgruppe von Glucose addiert. Unter Wasserabspaltung entsteht ein Imin. Das Imin stabilisiert sich durch Umlagerung zur *Amadori*-Verbindung, der 1-Amino-1-desoxy-ketose (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5.** Additionsreaktion zwischen Protein und Saccharid im Anfangsstadium der *Maillard*-Reaktion

I = Aldose, II = Imin, III = 1-Amino-1-desoxy-ketose/*Amadori*-Verbindung

Wenn die Aminogruppe des Proteins an die Ketogruppe einer Ketose addiert, entstehen analog *Heyns*-Produkte, die 2-Amino-2-desoxy-aldosen. Besonders die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysylresten in Proteinen wechselwirkt durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden (van Boekel 2001, Oliver et al. 2006b, De Block et al. 2003). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass auch funktionelle Gruppen in Aminosäureseitenketten von schwefelhaltigen Aminosäuren (Miller und Gerrard 2005, De Block et al. 2003), von Histidin (Oliver et al. 2006b, Nagaraj et al. 1996, Dai et al. 2007, Yilmaz und Toledo 2005), von Tryptophan (Oliver et al. 2006b, Moreaux und Birlouez-Aragon 1997, De Block et al. 2003), von Arginin (Oliver et al. 2006b, Miller und Gerrard 2005, Lauber et al. 2001), von Glutaminsäure (Yilmaz und Toledo 2005) und von Leucin (Chevalier et al. 2001b) durch *Maillard*-Reaktion modifiziert werden.

Im **vorangeschrittenen Stadium** der *Maillard*-Reaktion reagieren *Amadori*- und *Heyns*-Produkte als Intermediate der *Maillard*-Reaktion weiter. Verschiedene spontane Reaktionen wie Wasserabspaltung, Eliminierung, Enolisierung, Retroaldolreaktion, Karamelisierung, Strecker-Abbau, Redoxreaktionen, radikalische Reaktionen, Proteinquervernetzung und Fragmentierung laufen ab (Friedman 1996, van Boekel 1998, Oliver et al. 2006a). Über Desoxyosone und weitere Reaktionsintermediate entstehen im **Endstadium** der Reaktion hochmolekulare Melanoidine (Casal et al. 2005, van Boekel 1998, De Block et al. 2003, Friedman 1996). Kovalente Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrückenbindungen wurden zwischen Proteinmolekülen und Saccharidmolekülen in *Maillard*-Produkten nachgewiesen (Miller und Gerrard 2005, Nagaraj et al. 1996).

Die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß wird als ubiquitäre Reaktion beschrieben, die zwischen Milcheiweiß und Milchzucker während der Verarbeitung und während der Lagerung von Milch (Morales et al. 1996, Gaucher et al. 2008, Calligaris et al. 2004, Lauber et al. 2001, Venkatachalam et al. 1993, Leonil et al. 1997) und von Milchpulver auftritt (De Block et al. 2003, Fernández et al. 2003, Gyomarc'h et al. 2000, Havea 2006, Jones et al. 1998, Sithole et al. 2005, Thomas et al. 2004b, Villamiel und Corzo 2000).

In den 70er und 80er Jahren wurde im Wesentlichen von einer geringeren Verfügbarkeit essentieller Aminosäuren und von einer Bildung potenziell mutagener Verbindungen durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß berichtet (Friedman 1996). Aktuelle Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass durch *Maillard*-Reaktion die techno-funktionellen und die tropho-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß verbessert werden können. Tabellen 2.3a und 2.3b geben einen Überblick über Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen, die durch verschiedene Arbeitsgruppen eingesetzt wurden, um Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte mit modifizierten funktionellen Eigenschaften herzustellen.

Aus den Studien, die eine Verbesserung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion nachweisen konnten, geht hervor, dass *Maillard*-Produkte aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Alginat (Hattori et al. 1997) oder aus Casein und Dextran (Aminlari et al. 2005), zum Beispiel, eine höhere Hitzestabilität aufweisen als unbehandeltes Protein. Für  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkte (Chevalier et al. 2001a) und für Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte (Mishra et al. 2001) wurden besonders gute Schaumbildungseigenschaften festgestellt. Verbesserte Emulgierereigenschaften wurden ermittelt für Blutserumalbumin/Dextran-*Maillard*-Produkte (Dickinson und Izgi 1996) und für Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte (Mu et al. 2006, Fechner et al. 2007). Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte zeichnen sich nach Oliver et al. (2006b) durch ihre viskosen Eigenschaften aus, Molkenprotein/Maltopentose-Produkte nach Li et al. (2005) durch verbesserte Gelbildungseigenschaften.

**Tab. 2.3a.** Literaturüberblick über die Modifizierung von Molkenprotein durch *Maillard*-Reaktion

<b>Protein</b>	<b>+</b>	<b>Saccharid</b>	
<b><math>\alpha</math>-Lactalbumin</b>	+	Carboxymethylcellulose	Kika et al. (2007)
	+	Dextran	Jiménez-Castaño et al. (2007)
	+	Glucose	Nacka et al. (1998), Sun et al. (2006)
	+	Lactose	Nacka et al. (1998)
	+	Maltodextrin	Akhtar und Dickinson (2007)
	+	Maltopentose	Li et al. (2005)
	+	Pektin	Einhorn-Stoll et al. (2005), Mishra et al. (2001), Neiryneck et al. (2004)
<b><math>\beta</math>-Lactoglobulin</b>	+	Akaziengummi	Schmidt et al. (2005)
	+	Alginat	Hattori et al. (2007)
		Carboxymethylcellulose	Kika et al. (2007)
	+	Chitopentose	Hattori et al. (2000)
	+	Chitosan	Hattori et al. (2000), Miralles et al. (2007)
	+	Dextran	Dunlap und Côté (2005), Jiménez-Castaño et al. (2005a), Jiménez-Castaño et al. (2005b), Jiménez-Castaño et al. (2007), Mishra et al. (2001), Mu et al. (2006), Wooster und Augustin (2006), Wooster und Augustin (2007)
	+	Fructooligosaccharide	Trofimova und de Jongh (2004)
	+	Glucosamin	Hattori et al. (2000)
	+	Glucose	Broersen et al. (2004), Chevalier et al. (2001a), Chevalier et al. (2001b), Chevalier et al. (2002), Kato et al. (1988b), Nacka et al. (1998), van Teeffelen et al. (2005)
	+	Lactose	Bouhallab et al. (1999), Chevalier et al. (2001a), Chevalier et al. (2001b), Chevalier et al. (2002), Fenaille et al. (2004), French und Harper (2003), Moreaux und Birlouez-Aragon (1997), Morgan et al. (1999a), Nacka et al. (1998), Thomas et al. (2004a)
	+	Maltodextrin	Akhtar und Dickinson (2007)
	+	Maltopentose	Li et al. (2005)
	+	Pektin	Einhorn-Stoll et al. (2005), Mishra et al. (2001), Neiryneck et al. (2004)
<b>Blutserumalbumin</b>	+	Glucose	Ajandouz et al. (2007)
	+	Dextran	Dickinson und Izgi (1996), Dickinson und Semenova (1992), Jiménez-Castaño et al. (2007), Kato et al. (1988a)



**Tab. 2.3b.** Literaturüberblick über die Modifizierung von Casein durch *Maillard*-Reaktion

<b>Protein</b>	<b>+</b>	<b>Saccharid</b>	
<b>Casein</b>	+	Dextran	Aminlari et al. (2005), Dickinson und Izgi (1996), Dickinson und Semenova (1992), Fechner et al. (2007), Pan et al. (2006)
	+	Fructooligosaccharide	Oliver et al. (2006a)
	+	Glucose	Ajandouz et al. (2007), Brands et al. (2002), Jing und Kitts (2002), Oliver et al. (2006a), Oliver et al. (2006b), Scaloni et al. (2002)
	+	Lactose	Oliver et al. (2006a), Oliver et al. (2006b), Malec et al. (2002), Morales und Jimenez-Perez (1998)
	+	Maltodextrin	Morris et al. (2004)
	+	Pektin	Al-Hakkak und Kavale (2002), Einhorn-Stoll et al. (2005)
	+	Ribose	Oliver et al. (2006a)
<b>Casein-macro-peptid</b>	+	Lactose	Casal et al. (2005), Moreno et al. (2002)

Andere Autoren wiesen nach, dass durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß *Maillard*-Produkte mit antioxidativen, antimikrobiellen und antihypertensiven Eigenschaften gebildet werden können (Rufián-Henares und Morales 2007, Calligaris et al. 2004).

Ein Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Studien ist jedoch bisher nur begrenzt möglich. Unterschiedliche Proteine und unterschiedliche Saccharide wurden jeweils durch *Maillard*-Reaktion unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen miteinander inkubiert. *Maillard*-Produkte mit unterschiedlicher Molmasse, mit unterschiedlicher Struktur und mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften wurden gebildet. Al-Hakkak und Kavale (2002) berichteten zum Beispiel über eine hohe Stabilität von Emulsionen mit Casein/Pektin-*Maillard*-Produkten, die durch *Maillard*-Reaktion bei 60°C und 79% r. F. über 2 Tage hergestellt wurden. Einhorn-Stoll et al. (2005) beschrieben dagegen eine geringe Stabilität von Emulsionen mit Casein/Pektin-*Maillard*-Produkten, die durch *Maillard*-Reaktion bei 60°C und 65% r. F. über 15 Tage hergestellt wurden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material zur Herstellung von modifiziertem Milcheiweiß

##### *Milcheiweiß*

- Magermilchpulver. Sprühgetrocknetes Pulver. Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) 35,9%, Asche 8,0%, Lactose 51,5%, Fett 0,6%, Wasser 4,0%. Nordmilch, Bremen.
- Magermilchpulver, lactosehydrolysiert. Sprühgetrocknetes Pulver (Eingangstemperatur/Ausgangstemperatur von 180°C/80°C). Zusammensetzung : Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 30,8%, Asche 7,3%, Lactose 0,1%, Fett 0,1%, Glucose 22,6%, Galactose 20,9%. Hergestellt durch Lactosehydrolyse in pasteurisierter Magermilch (Versuchsstation Schädtkbek) über 3 h bei 40°C mit  $\beta$ -Galactosidase (Lactozym 3000 L HPG; Novozymes Dänemark) im Enzym-Substrat-Verhältnis E/S = 1/100. Hergestellt im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BfEL Kiel.
- Molkenproteinisolat (Isolac ®). Sprühgetrocknetes Pulver. Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 93,0%, Asche 2,0%, Lactose <1,0%, Fett <1,0%, Wasser <5,0%. Milei GmbH, Stuttgart.
- Natriumcaseinat (Alanate 180 ®). Sprühgetrocknetes Pulver. Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 96,6%, Asche 3,6%, Lactose 0,1%. Fonterra New Zealand's Dairy Company, Rellingen.
- Rohmilch. Versuchsstation Schädtkbek, BfEL Kiel.
- Transglutaminasebehandeltes Magermilchpulver. Sprühgetrocknetes Pulver (Eingangstemperatur/Ausgangstemperatur von 180°C/80°C). Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 35,9%, Asche 8,0%, Lactose 51,5%. Hergestellt durch Inkubation von Magermilchpulver (Nordmilch, Bremen) mit Transglutaminase (0,05 U/mg, 40°C, 4 h, pH 7,0) in entmineralisiertem Wasser. Hergestellt im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BfEL Kiel.
- Transglutaminasebehandeltes Molkenproteinisolat. Sprühgetrocknetes Pulver (Eingangstemperatur/Ausgangstemperatur von 180°C/80°C). Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 93,0%, Asche 2,0%, Lactose <1,0%. Hergestellt durch Inkubation von Molkenproteinisolat (Milei GmbH, Stuttgart) mit Transglutaminase (0,05 U/mg, 6°C, 16 h, pH 7,0) in entmineralisiertem Wasser. Hergestellt im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BfEL Kiel.
- Transglutaminasebehandeltes Natriumcaseinat. Sprühgetrocknetes Pulver (Eingangstemperatur/Ausgangstemperatur von 180°C/80°C). Zusammensetzung: Protein (N x 6,38) bezogen auf Trockenmasse 96,6%, Asche 3,6%, Lactose 0,1%. Hergestellt durch Inkubation von Natriumcaseinat (Fonterra, Rellingen) mit Transglutaminase (0,05 U/mg, 6°C, 16 h, pH 6,7) in entmineralisiertem Wasser. Hergestellt im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BfEL Kiel.

##### *Enzyme*

- Catalase [EC 1.11.1.6.] (Corkzyme ®) des *Aspergillus niger*. (Lebensmittelqualität). Dunkelbraune Enzymsuspension. Enzymaktivität: 25.000 CIU/ml Präparat. Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark.

- Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4] (Alphamalt Gloxy 7082 ®) des *Aspergillus niger*. (Lebensmittelqualität). Weißes, lyophilisiertes Pulver. Enzymaktivität: 300 U/g Präparat, starke Katalasenebenaktivität. Zusätzliche Inhaltsstoffe: Weizenstärke und Tricalciumphosphat. Mühlenchemie, Ahrensburg.
- Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4] (Gluzyme BG Mono 10.000 ®) des *Aspergillus niger*, produziert durch *Aspergillus oryzae*. (Lebensmittelqualität). Hellbraunes, sprühgetrocknetes Pulver. Enzymaktivität: 10.000 U/g Präparat, geringe Katalasenebenaktivität. Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark.
- Laccase [EC 1.10.3.2] (Suberase ®) des *Myceliophthera thermophila*, produziert durch *Aspergillus oryzae*. (Lebensmittelqualität). Dunkelbraune Enzymsuspension. Enzymaktivität: 10.500 PCU/ml Präparat. Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark.
- Laccase C [EC 1.10.3.2] des *Trametes spec.*. Hellbraunes, lyophilisiertes Pulver. Enzymaktivität: 1.248 U/g Präparat. Nebenaktivität: Tyrosinaseaktivität. ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel.
- Lactoperoxidase [EC 1.11.1.7], isoliert aus Kuhmilch. (Lebensmittelqualität). Hellbraunes, sprühgetrocknetes Pulver. Enzymaktivität: 950 U/mg Präparat. DMV International, Veghel, Niederlande.
- Pancreatin, aus Schweinepancreas. Hellbraunes, lyophilisiertes Pulver. Enzymaktivität: 8 x USP. Nebenaktivität: Amylase-, Lipase-, Ribonuclease- und Peptidaseaktivität nachgewiesen. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

#### Hilfsstoffe

- Wasserstoffperoxidlösung 30%, reinst. Merck, Darmstadt.
- Ascorbinsäure (ELCO C-100 K ®). Mühlenchemie, Ahrensburg.
- Cystein (EMCEsoft P ®). Mühlenchemie, Ahrensburg.
- Cystin ®. Mühlenchemie, Ahrensburg.

#### Phenolische Substrate

- Chlorogensäure ≥95%. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.
- Extrakt aus Blaubeeren. Polyphenolgehalt: 10%. Kaden Biochemicals, Hamburg.
- Extrakt aus schwarzen Johannisbeeren. Polyphenolgehalt: 10%. Kaden Biochemicals, Hamburg.
- Extrakt aus *Vitis Vinifera* (Echte Weinrebe). Polyphenolgehalt: >15%. Kaden Biochemicals, Hamburg.
- Grünteeextrakt (Teavigo ®) aus *Camellia sinensis* (Teepflanze). Polyphenolgehalt: ≥96,5% Epigallocatechingallat. DSM Nutritional Products, Grenzach-Wyhlen.

#### Saccharide

- D(+)-Glucose-Monohydrat. Merck, Darmstadt.
- D(+)-Lactose-Monohydrat. Merck, Darmstadt.
- Dextran T 40. Molmasse ~40.000 g/mol. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.
- Dextran T 500. Molmasse ~500.000 g/mol. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.
- Pektin C aus Citrus-Arten, Veresterungsgrad ~70%. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.

*Wasser*

- entmineralisiertes Wasser. Hergestellt im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BfEL Kiel mit dem Ultra Clear Water System. SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Methoden zur Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

#### 3.2.1.1. Standardinkubationsbedingungen

Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde über 24 Stunden bei 40°C und pH 7,0 mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase inkubiert.

Zur Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase wurden 47,5 U Lactoperoxidase und 1,8 µmol Wasserstoffperoxid je mg Milcheiweiß eingesetzt. Wasserstoffperoxid wurde am Ende der Inkubationszeit durch 0,13 U Catalase/mg Milcheiweiß (10 min, 40°C) inaktiviert.

Zur Inkubation von Milcheiweiß mit Laccase wurden 0,53 U Laccase und 0,02 µmol Chlorogensäure je mg Milcheiweiß verwendet. Eingesetzt wurden Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> und Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup>.

Zur Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase wurden 0,5 U Glucoseoxidase je mg Milcheiweiß verwendet. Eingesetzt wurden Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> und Glucoseoxidase<sup>mit hoher Catalaseaktivität</sup>.

#### 3.2.1.2. Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen

Ausgehend von den Inkubationsbedingungen in Kapitel 3.2.1.1. wurden jeweils einzelne Inkubationsbedingungen variiert, um zu ermitteln, unter welchen Inkubationsbedingungen der höchste Anteil an Proteinmonomeren enzymatisch modifiziert wird. Die Untersuchungen wurden für die Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase, mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> und mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> durchgeführt.

Zusätzlich wurde untersucht, wie sich eine chemisch-physikalische Vorbehandlung von Milcheiweiß auf eine anschließende enzymatische Modifizierung mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase auswirkt. Zur chemisch-physikalischen Vorbehandlung wurde Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) über 30 min bei 40°C mit 0,05 mg Ascorbinsäure, 0,05 mg Cystein oder 0,05 mg Cystin je mg Milcheiweiß inkubiert. Der Einfluss einer thermischen Vorbehandlung von Milcheiweiß wurde durch eine Erhitzung von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) über 10 min oder über 20 min bei 80°C ermittelt.

Für die Inkubation von Milcheiweiß mit Laccase wurde untersucht, ob 0,02 µmol Chlorogensäure je mg Milcheiweiß auch durch 0,02 µmol phenolische Substanzen aus Pflanzenextrakten (Blaubeer-, Johannisbeer-, Wein-, Grünteeextrakt) ersetzt werden können.

Für die Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase wurde untersucht, wie Lactose (w/w ≤10 mg/mg Milcheiweiß) oder Glucose (w/w ≤10 mg/mg Milcheiweiß) die enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß beeinflussen.

#### 3.2.1.3. Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

Milcheiweiß wurde unter den als optimal ermittelten Inkubationsbedingungen (Kap. 3.2.1.2.) mit Lactoperoxidase, mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> und mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> modifiziert (Tab. 3.1). Die Reaktionsprodukte wurden auf ihre chemisch-analytischen, auf ihre techno-funktionellen und auf ihre tropho-funktionellen Eigenschaften untersucht.

**Tab. 3.1.** Bedingungen der Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase

	Inkubationsbedingungen				
	U Enzym/ mg Milcheiweiß	pH	Inkubations- temperatur [°C]	Inkubations- zeit [h]	µmol Cofaktor/ mg Milcheiweiß
NC + LPO	47,500	6,8	40	16	1,80 µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
MPI + LPO	9,500	7,2	50	1	18,00 µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
MP + LPO	9,500	7,0	50	1	1,80 µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NC + PPO	0,011	6,8	40	16	0,02 µmol CA
MPI + PPO	0,011	7,2	40	1	0,08 µmol CA
MP + PPO	0,011	7,0	40	1	0,08 µmol CA
NC + GOX	0,500	6,8	40	16	-
MPI + GOX	0,500	7,2	40	16	-
MP + GOX	0,010	7,0	20	16	-

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein aus Magermilchpulver, LPO = Lactoperoxidase, PPO = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, GOX = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, CA = Chlorogensäure

### 3.2.2. Methoden zur Herstellung von chemisch-physikalisch modifiziertem Milcheiweiß

#### 3.2.2.1. Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen der *Maillard*-Reaktion

In kontrollierter Atmosphäre (Clima Temperature System C+ 10/350/S, CTS, Hechingen) wurde untersucht, unter welchen Temperatur/Zeit/Feuchte-Bedingungen der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit verschiedenen Sacchariden ein möglichst hoher Anteil an Proteinmonomeren modifiziert wird. Gewählt wurde eine Inkubationstemperatur von 40°C und von 70°C, eine relative Feuchte von 10%, von 40%, von 65% und von 100% und eine Reaktionszeit von 1 h bis 240 h. Milcheiweiß und Saccharid wurden in einem Gewichtsverhältnis von w/w = 10/11 bis w/w = 1/11 miteinander inkubiert. Untersucht wurden pulverförmige Protein/Saccharid-Mischungen, die vorab als Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder als Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden. Als Saccharide wurden Glucose, Lactose, Pektin und Dextran eingesetzt.

#### 3.2.2.2. Herstellung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden

Milcheiweiß in Protein/Saccharid-Pulvermischungen und in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen wurde unter den als optimal ermittelten Reaktionsbedingungen (Kap. 3.2.2.1.) von 70°C und 65% relativer Feuchte durch *Maillard*-Reaktion modifiziert. Die Reaktionszeit wurde für Protein/Glucose-Mischungen auf 4 Stunden begrenzt, für Protein/Lactose-Mischungen auf 96 Stunden, für Protein/Pektin-Mischungen auf 24 Stunden und für Protein/Dextran-Mischungen auf 240 Stunden.

Natriumcaseinat und Molkenproteinisolat wurden jeweils im Verhältnis von 1 g Saccharid pro g Milcheiweiß zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt. Gesamtmilcheiweiß wurde in

lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, in Magermilchpulver, in Magermilchpulver/Pektin-Mischungen (w/w = 1 g Pektin pro g Gesamtmilchprotein) und in Magermilchpulver/Dextran-Mischungen (w/w = 1 g Dextran pro g Gesamtmilchprotein) zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt. Die *Maillard*-Produkte wurden auf ihre chemisch-analytischen, auf ihre techno-funktionellen und auf ihre tropho-funktionellen Eigenschaften untersucht.

### 3.2.3. Chemisch-analytische Untersuchung von modifiziertem Milcheiweiß

#### 3.2.3.1. Fast-Protein-Liquid-Chromatographie (FPLC)

Die Molmassenverteilung von Milcheiweiß wurde durch Größenausschlusschromatographie (FPLC) ermittelt. Das Prinzip der Methode besteht in einer Verteilung von Proteinmolekülen zwischen der mobilen und der stationären Phase des chromatographischen Systems. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Molmasse und der Retentionszeit von Molekülen in der Chromatographiesäule ist eine Identifizierung und eine Quantifizierung verschiedener Molmassenfraktionen in Proteinlösungen durch einen Vergleich mit Molmassenstandards möglich.

#### *Material*

- FPLC-System aus Chromatographie-Controller LCC-500 plus, 2 Pumpen P-500, UV-Monitor, Fraktionensammler und Photometer Pharmacia LKB UV-MII (Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm; Empfindlichkeit 0,1). Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden.
- Chromatographiesäule Superdex200 10/300 GL (Tricorn) No. 17517401, Ausschlussgrenze:  $1,3 \times 10^6$  g/mol, 24 ml Bettvolumen. GE Healthcare, Freiburg.
- Probenschleife: 25  $\mu$ l. GE Healthcare, Freiburg.
- Tris-HCl-Puffer (pH 8,0). Wässrige Lösung aus 0,1 mol/l Tris, 0,15 mol/l Natriumchlorid und 8 mol/l Harnstoff, filtriert (Membranfilter 0,2  $\mu$ m; Schleicher & Schüll, Dassel) und entgast.
- Hinterkolbenspülung. Ethanol 20% mit 3 Tropfen Natriumhydroxidlösung 40%.
- Auswerteprogramm FPLC-Detektor<sup>TM</sup> Version 1.10. Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden.
- Graphikprogramm Sigma Plot 9.0. Systat Software Inc., San Jose, USA.
- Spritzenscheibenfilter, 0,20  $\mu$ m, steril. Schleicher & Schüll, Dassel.
- Molmassenstandardsubstanzen.
  - Ribonuclease A (13.700 g/mol), Chymotrysinogen (25.000 g/mol), Ovalbumin (43.000 g/mol), Aldolase (158.000 g/mol), Catalase (232.000 g/mol), Ferritin (450.000 g/mol), Thyroglobulin (669.000 g/mol) und Dextranblau (2.000.000 g/mol). Lyophilisierte Pulver. LMW und HMW Gel Filtration Calibration Kit. GE Healthcare, Freiburg.
  - Bradykinin (1.060 g/mol), Insulin Kette B (3.496 g/mol) und Aprotinin (6.500 g/mol). Lyophilisierte Pulver. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

### *Methode*

Proteinlösungen wurden membranfiltriert (mittlere Porengröße: 0,20 µm) und in die Probenschleife des FPLC-Systems eingespritzt. Die Proben wurden über eine Trennzeit von 100 min bei einer Flussrate von 0,3 ml Puffer/min mit Tris-HCl-Puffer eluiert. Die spektralphotometrische Extinktion des Eluats wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm kontinuierlich erfasst. Es erfolgten Doppelbestimmungen.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Peakfläche der FPLC-Chromatogramme für einzelne Molmassenfraktionen integriert. Der Anteil einzelner Molmassenfraktionen am Gesamtprotein wird prozentual als Verhältnis aus der Peakfläche einer Molmassenfraktion und der Summe aller Peakflächen angegeben. Der Variationskoeffizient der Methode liegt zwischen 0,1% und 1,0%.

### **3.2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter nicht denaturierenden Bedingungen**

Proteine wurden durch PAGE (VDLUFA VI 30.6.4., 1996) auf ihre Molmassenverteilung untersucht. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass Proteine im elektrischen Feld nach Ladung aufgetrennt werden können, nachdem sie durch anionische SDS-Moleküle negativ aufgeladen wurden. Neben der Trennung nach Ladung ist durch den Molekularsiebeffekt von Polyacrylamidgradientengelen zusätzlich eine Auftrennung von Proteinen nach Molmassen möglich.

Eine Identifizierung verschiedener Molmassenfraktionen erfolgt durch einen Vergleich mit Molmassenstandardsubstanzen. Die Quantifizierung von Molmassenfraktionen ist durch densitometrische Auswertung der Proteinbanden möglich.

### *Material und Methode*

Material und Methoden entsprechen VDLUFA Methodenbuch VI, 30.6.4. (1996).

Polyacrylamidgradientengele (4%-23%) wurden mit Rotiphorese® NF Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und dem Gradientenmischer Hoefer SG 30 (Hoefer Inc., San Francisco, USA) hergestellt. Die Vorbehandlung der Proteine zur PAGE erfolgte nach Thalmann (2003) mit nichtdenaturierendem Probenpuffer über 30 min bei 20°C.

Es wurde die Elektrophoreseeinheit LKB Multiphor Electrophoresis Cell Model 2117 (LKB, Bromma, Schweden) mit Stromquelle Electrophoresis Constant Power Supply 300/150 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) und Kryostat Julabo 725 (JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach) eingesetzt.

Als Molmassenmarker wurde Rotimark Standard® (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit den Standardsubstanzen Lysozym (14.300 g/mol), Trypsininhibitor (20.000 g/mol), Carboanhydrase (29.000 g/mol), Ovalbumin (43.000 g/mol), Serumalbumin (66.000 g/mol),  $\beta$ -Galactosidase (119.000 g/mol) und Myosin (200.000 g/mol) verwendet. In den Abbildungen von Elektropherogrammen werden die Standardsubstanzen nach aufsteigender Molmasse jeweils mit den Buchstaben a (Lysozym) bis g (Myosin) bezeichnet.

Die Auswertung der PAGE erfolgte durch Densitometrie (TotalLab2.1 Software, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).



### 3.2.3.3. Aminosäurenanalyse

Eine Aminosäurenanalyse von Milcheiweiß erfolgte durch Kationenaustauschchromatographie nach VDLUFA Methodenbuch III, 4.11.1. (1997).

#### *Material*

- Probenverdünnungspuffer (pH 2,20). Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Natriumcitratpuffer (pH 3,35). Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Natriumcitratpuffer (pH 4,24). Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Natriumcitratpuffer (pH 9,35). Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Ninhydrin. Merck, Darmstadt.
- Hydrindantin. Merck, Darmstadt.
- Ethylenglycol. Merck, Darmstadt.
- Aminosäurenanalysator Alpha Plus 4151. Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Trennsäule: Ionenaustauscherharz 80-2038-45, Länge 202 mm, Durchmesser 4,6 mm. Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Aminosäurenstandard. Pharmacia Biotech, Freiburg.
- Speed-Vac Concentrator Savant SVC 100H. Bachhofer, Reutlingen.

#### *Methode*

Milcheiweiß wurde mit 6 mol/l Salzsäure und 1% Phenol über 24 h bei 110°C aufgeschlossen. Die Probe wurde mit entmineralisiertem Wasser gewaschen, lyophilisiert und in Probenverdünnungspuffer gelöst. Die Probelösung wurde auf das Ionenaustauscherharz des Aminosäurenanalysators aufgetragen. Die verschiedenen Aminosäuren wurden mit steigendem pH-Wert der Natriumcitrat-Laufpuffer von pH 2,20 bis pH 9,35 nach charakteristischen Retentionszeiten eluiert und durch Ninhydrinreaktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570$  nm und von  $\lambda = 440$  nm spektralphotometrisch erfasst.

Eine Identifizierung und eine Quantifizierung von Aminosäuren erfolgte durch einen Aminosäurenstandard (Pharmacia Biotech, Freiburg).

Es wurden Doppel- bis Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient der Methode liegt in den vorliegenden Untersuchungen zwischen 0,9% und 2,6%.

### 3.2.3.4. Löslicher Aminostickstoff

Der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß wurde mittels OPA-Reaktion (Frister et al. 1986) bestimmt. Das Prinzip der Reaktion besteht darin, dass lösliche Aminogruppen mit o-Phthaldialdehyd in Gegenwart von N,N-Dimethyl-2-Mercapto-ethylammoniumchlorid zu 1-Alkylthio-2-alkylisoindolen reagieren. 1-Alkylthio-2-alkylisoindole können bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm am Spektralphotometer quantifiziert werden.

#### *Material*

- o-Phthaldialdehyd. Merck, Darmstadt.
- N,N-Dimethyl-2-Mercaptoethylammoniumchlorid. Chemos GmbH, Regenstauf.
- Dinatriumtetraboratdecahydrat. Merck, Darmstadt.
- Natriumdodecylsulfat (SDS). Merck, Darmstadt.
- L-Leucin. Merck, Darmstadt.

*Method*

OPA-Reagenz wurde aus 40 mg o-Phthaldialdehyd und 100 mg N,N-Dimethyl-2-Mercaptoethylammoniumchlorid in 50 ml Dinatriumtetraboratdecahydratpuffer (0,1 mol/l, pH 9,3) hergestellt. 1 ml 10%ige SDS-Lösung wurde zugesetzt.

10 µl Probelösung wurden mit 1 ml OPA-Reagenz versetzt und die Extinktion der Lösung nach 2 min bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm gegen OPA-Reagenz als Blindwert gemessen. Die Messungen wurden im Abstand von 1 min solange wiederholt, bis sich konstante Messwerte einstellten. Die Messwerte wurden gemittelt und der Gehalt an löslichem Aminostickstoff nach Formel 3-1 berechnet. L-Leucin wurde in einer Konzentration von 131,2 mg Leucin/100 ml entmineralisiertes Wasser als Standardsubstanz verwendet.

Es erfolgten Dreifachbestimmungen.

$$\text{Löslicher Amino - N} [\mu\text{g N/mg Protein}] = \frac{C_{\text{Standard}} \times E_{\text{Probe}} \times M_{\text{N}}}{E_{\text{Standard}} \times V_{\text{Probe}} \times 1000 \times \text{VF}} \quad (3-1)$$

$C_{\text{Standard}}$	= Konzentration <sub>Standard</sub> = 100 nmol
$E_{\text{Probe}}$	= Extinktion <sub>Probe</sub> $\lambda = 340$ nm
$M_{\text{N}}$	= Molmasse <sub>Stickstoff</sub> = 16 g/mol
$E_{\text{Standard}}$	= Extinktion <sub>Standard</sub> $\lambda = 340$ nm
$V_{\text{Probe}}$	= 0,01 ml
1000	= Umrechnungsfaktor von [nmol] auf [ $\mu\text{g}$ ]
VF	= Verdünnungsfaktor = 10

**3.2.3.5. SH-Gruppen**

Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß wurden nach dem von Ellman (1959) beschriebenen Prinzip ermittelt, dass Sulfhydrylgruppen das Substrat 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure bei pH 8,0 reduzieren. Es entstehen gelb gefärbte Reaktionsprodukte, deren Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 412$  nm spektralphotometrisch erfasst werden kann.

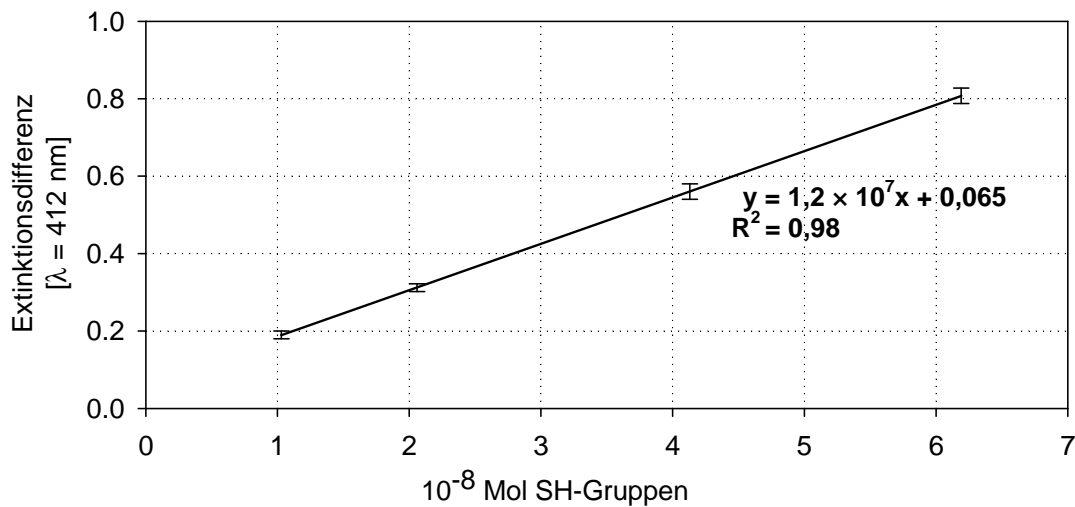
*Material*

- Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei. Merck, Darmstadt.
- Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei. Merck, Darmstadt.
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.
- Glutathion, reduziert. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

*Method*

Phosphatpufferlösung wurde aus Kaliumdihydrogenphosphat (w/w = 0,14416 g/l) und Dinatriumhydrogenphosphat (w/w = 2,69 g/l) in entmineralisiertem Wasser hergestellt. Für Ellman-Reagenz wurden 39,6 mg 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure in 10 ml Phosphatpuffer gelöst.

200  $\mu\text{l}$  Probelösung ( $w/w = 1\%$  Protein in entmineralisiertem Wasser) und 1000  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer wurden vermischt und die Extinktion bei  $\lambda = 412\text{ nm}$  gemessen ( $E_1$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Ellman-Reagenz gestartet und die Extinktion nach einer Reaktionszeit von 60 min bei 20°C erneut gemessen ( $E_2$ ). Die Extinktionsdifferenz  $\Delta E = E_2 - E_1$  wurde zur Berechnung der SH-Gruppen in der Probelösung zugrunde gelegt. Eine Kalibriergerade wurde mit  $1,0 \times 10^{-8}$  bis  $6,2 \times 10^{-8}$  Mol SH-Gruppen aus Glutathion erstellt. Aus der Geradengleichung der Kalibriergeraden (Abb. 3.1) konnten durch mathematische Umstellung und unter Berücksichtigung der Proteineinwaage SH-Gruppen in Probelösungen nach Formel 3-2 berechnet werden.



**Abb. 3.1.** Kalibriergerade Ellman-Test mit Standardsubstanz Glutathion

$$\text{SH - Gruppen } [\mu\text{mol SH/g Protein}] = \frac{(\Delta E_{\lambda=412\text{nm}} - 0,065) \times 500 \times 1000 \times 1000}{1,2 \times 10^7} \quad (3-2)$$

$\Delta E_{\lambda=412\text{ nm}}$  = Extinktionsänderung  $\lambda = 412\text{ nm}$  =  $E_2 - E_1$

### 3.2.3.6. Hydroxymethylfurfural (HMF)

Hydroxymethylfurfural in Milcheiweiß wurde modifiziert nach White (1979) bestimmt. Das Prinzip der Reaktion besteht in der Quantifizierung von HMF-Chromophoren anhand ihrer Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 284\text{ nm}$  am Spektralphotometer.

Proteinlösungen ( $w/w = 0,1\%$  Protein in entmineralisiertem Wasser) wurden durch Carrez-Klärung enteiweißt und filtriert. Das Filtrat wurde mit entmineralisiertem Wasser ( $v/v = 1/2$ ) vermischt und die Extinktion der Probelösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 284\text{ nm}$  und von

$\lambda = 336$  nm bestimmt ( $E_{\text{Probe}}$ ). Das Filtrat wurde mit 0,2%-iger Natriummetabisulfidlösung ( $v/v = 1/2$ ) vermischt und die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 284$  nm und von  $\lambda = 336$  nm bestimmt ( $E_{\text{Standard}}$ ).

Der Gehalt an Hydroxymethylfurfural in Milcheiweiß und in Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen konnte nach Formel 3-3 berechnet werden. Es wurden Doppelbestimmungen ausgeführt.

$$\text{HMF [mmol/g Pulver]} = \frac{V_{\text{Test}} \times (E_{\text{Probe } \lambda = 284 \text{ nm}} - E_{\text{Standard } \lambda = 284 \text{ nm}} - E_{\text{Probe } \lambda = 336 \text{ nm}} - E_{\text{Standard } \lambda = 336 \text{ nm}}) \times \text{PP}}{l \times \epsilon_{\text{HMF}} \times V_{\text{Probe}} \times 0,05} \quad (3-3)$$

$V_{\text{Test}}$	= Testvolumen [ml]
$E_{\text{Standard}}$	= Extinktion <sub>Standard</sub>
$E_{\text{Probe}}$	= Extinktion <sub>Probe</sub>
PP	= Proteingehalt im Pulver [g Protein/g Pulver]
$l$	= Schichtdicke der Küvette = 1 cm
$\epsilon_{\text{HMF}}$	= molarer Extinktionskoeffizient von HMF = $16830 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
$V_{\text{Probe}}$	= Probevolumen [ml]
0,05	= Faktor zur Umrechnung von [mol/l] auf [mmol/g]

### 3.2.4. Untersuchung der techno-funktionellen Eigenschaften von modifiziertem Milcheiweiß

Milcheiweiß wurde - sofern nicht anders angegeben - in entmineralisiertem Wasser bei pH 7,0 auf die techno-funktionellen Eigenschaften untersucht.

#### 3.2.4.1. Hitzestabilität

Die Hitzestabilität von Milcheiweiß wurde als die Zeit festgelegt, die zur sichtbaren Koagulation des Proteins bei 140°C benötigt wird.

Zur Untersuchung der Hitzestabilität von Milcheiweiß wurden Milcheiweißlösungen ( $w/w = 5\%$  Protein in entmineralisiertem Wasser) hergestellt. Jeweils 5 ml Milcheiweißlösung wurden in verschraubbare Reagenzgläser gefüllt, im Wasserbad auf 80°C vorgewärmt und im Ölbad bei 140°C bis zur sichtbaren Koagulation des Proteins erhitzt. Die Angabe der Hitzestabilität erfolgt in Minuten. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt.

#### 3.2.4.2. Oberflächenhydrophobizität

Die Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß wurde als die Bindung anionischer SDS-Moleküle an hydrophobe Aminosäurenreste der Moleküloberfläche von Proteinen bestimmt (Kato 1984).

#### Material

- Natriumdihydrogenphosphatdecahydrat. Merck, Darmstadt.
- Natriumdodecylsulfat (SDS). Merck, Darmstadt.

- Chloroform. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.
- Methylenblau. Merck, Darmstadt.
- Celluloseacetat-Dialysemembran. Trenngrenze: 12.000 g/mol. Medicell, London.

#### Methode

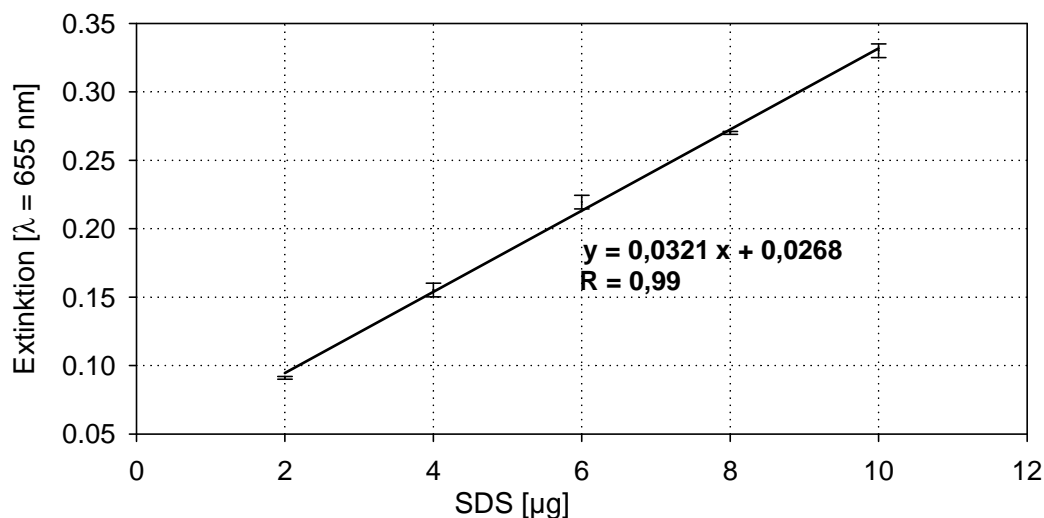
Natriumdihydrogenphosphatdecahydratpufferlösung (0,02 mol/l, pH 6,0) wurde in entmineralisiertem Wasser hergestellt. Proteine wurden in Natriumdihydrogenphosphatdecahydratpuffer (w/v = 1,0 g/l) gelöst. SDS-Reagenz wurde mit Natriumdihydrogenphosphatdecahydratpuffer (w/v = 40,37 mg SDS/l Puffer) hergestellt. Methylenblau (w/v = 24,0 mg/l Puffer) wurde in Natriumdihydrogenphosphatdecahydratpuffer gelöst.

Proteinlösung und SDS-Reagenz wurden vermischt (v/v = 1/2) und bei 20°C über 30 min miteinander inkubiert. Anschließend wurde die SDS-Protein-Lösung bei 20°C über 24 h gegen Natriumdihydrogenphosphatdecahydratpuffer (v/v = 1/25) dialysiert.

0,5 ml Dialysat, 2,5 ml Methylenblaulösung und 10,0 ml Chloroform wurden vermischt und zentrifugiert (2.500 x g, 5 min). Die Extinktion der Chloroformphase wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 655 \text{ nm}$  am Spektralphotometer (Libra S12, Biochrom, Bremen) gegen Chloroform als Blindwert erfasst.

Eine Kalibriergerade wurde für 0  $\mu\text{g}$  - 10  $\mu\text{g}$  SDS erstellt (Abb. 3.2). Durch mathematische Umstellung der linearen Regression zwischen SDS-Menge und Oberflächenhydrophobizität wurde die proteingebundene SDS-Menge nach Formel 3-4 berechnet.

Es erfolgten Dreifachbestimmungen.



**Abb. 3.2.** Kalibriergerade Oberflächenhydrophobizität mit Standardsubstanz SDS

$$\text{OFH}[\mu\text{g SDS}/500 \mu\text{g Protein}] = 62,3052 \times E_{\lambda = 655 \text{ nm}} - 0,8349 \quad (3-4)$$

OFH = Oberflächenhydrophobizität  
 $E_{\lambda = 655 \text{ nm}}$  = Extinktion  $\lambda = 655 \text{ nm}$

### 3.2.4.3. Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung ist die freie Grenzflächenenergie, aufgrund derer Phasensysteme durch eine Verkleinerung der Phasengrenze auf ein Energieminimum zustreben.

Experimentell wurde die Oberflächenspannung mit einem Tensiometer (Drop Shape Analysis System 10, Mk2, Krüss, Hamburg) nach der Pendant-Drop-Methode ermittelt. Eingesetzt wurden wässrige Proteinlösungen mit einem Proteingehalt von 1% - 5%. Die Kontur eines kapillar erzeugten Tropfens der Proteinlösung wurde über eine Messdauer von 20 min bei 20°C kontinuierlich optisch erfasst. Unter Zugrundelegen des Vergrößerungsmaßstabes und der Dichtedifferenz zwischen Luft und Proteinlösung wurde die dynamische Oberflächenspannung nach der Laplace-Gleichung ermittelt (Messprogramm Drop Shape Analysis 1.80, Krüss, Hamburg). Grundlage der Berechnung bildete die aus der Laplace-Gleichung hervorgehende Kenntnis, dass die Druckdifferenz zwischen der Innenseite und der Außenseite einer Grenzfläche umgekehrt proportional zu den Hauptkrümmungsradien der Grenzflächen-segmente ist.

Es erfolgten Dreifachbestimmungen.

### 3.2.4.4. Schaumbildungseigenschaften

Die Schaumbildungseigenschaften von Milcheiweiß wurden durch ein mechanisches Einschlagen von Luft in Proteinlösungen ermittelt.

Milcheiweißlösungen (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurden auf 40°C temperiert und in einem graduierten Messzylinder durch ein Airo-Latte-Rührwerk bei 2.000 U/min über 5 min aufgeschlagen. Schaumvolumen und Flüssigkeitsvolumen wurden nach dem Aufschäumen und während der Standzeit notiert.

Als Overrun wurde das prozentuale Verhältnis aus Gesamtvolumen nach dem Aufschlagen und dem Ausgangsvolumen der Proteinlösung ( $v = 15$  ml) berechnet.

Als Schaumstabilität wurde die Zeit definiert, in der sich das Aufschlagvolumen um die Hälfte vermindert.

Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 3.2.4.5. Emulgierereigenschaften

Die Emulgierereigenschaften von Milcheiweiß wurden als die spezifische Lichttrübung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 500$  nm ermittelt, die die Größe der Grenzfläche zwischen Ölphase und wässriger Phase von Emulsionen charakterisiert (Pearce und Kinsella 1978).

Die Emulgieraktivität von Milcheiweiß wurde definiert als der Emulsion Activity Index (EAI) frisch hergestellter Emulsionen, die Emulsionsstabilität als EAI von Emulsionen, die durch Lagerung (16 h, 20°C) und Zentrifugation (10 min, 4.000 x g, 15°C) gealtert wurden.

Milcheiweißlösungen (w/w = 0,1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurden bei 20°C über 30 s bei 35.000 U/min mit Öl emulgiert (Bühler Mixsystem; Bühler, Freiburg). Als Emulsionsöl wurde Triheptanoin (Spezialöl 107, Sasol Germany GmbH, Witten) eingesetzt. Das Verhältnis von Ölphase zu Wasserphase wurde auf  $v/v = 1/5$  festgelegt.

Emulsionen wurden im Verhältnis  $v/v = 1/100$  mit Verdünnungslösung (5,8 g Natriumchlorid + 1 g SDS/l entmineralisiertes Wasser) versetzt. Die spezifische Lichttrübung der verdünnten

Emulsionen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 500 \text{ nm}$  gegen Verdünnungslösung als Blindwert bestimmt (Spektralphotometer Libra S12, Biochrom, Bremen).

Es wurde in Doppelbestimmung emulgiert und jeweils in Dreifachbestimmung die Trübungsmessung durchgeführt. Der EAI wurde nach Formel 3-5 berechnet.

$$\text{EAI [m}^2/\text{g]} = \frac{4,6 \times E_{\lambda=500 \text{ nm}}}{\Phi \times c \times l} \quad (3-5)$$

$E_{\lambda=500 \text{ nm}}$  = Extinktion  $\lambda=500 \text{ nm}$  der verdünnten Emulsion  
 $\Phi$  = Anteil der Ölphase an der Emulsion = 0,2  
 $c$  = Proteinkonzentration der Emulsion = 1000 g/m<sup>3</sup>  
 $l$  = Schichtdicke der Küvette = 0,01 m

#### 3.2.4.6. Viskosität

Die Viskosität wurde als der Widerstand von Proteinlösungen definiert, die im Rotationsversuch zwischen der Messplatte und dem Messkegel eines Rheometers geschert wurden.

Ein Probenvolumen von 0,7 ml Proteinlösung (w/w = 1% - 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde bei einer Messtemperatur von 20°C zwischen Messplatte und Messkegel MK22 des Rheometers UDS 200 (Anton Paar GmbH, Ostfildern) bei einem Messspalt von 0,05 mm geschert. Nach Vorscherung (30 s) und Ruhephase (60 s) wurde die Viskosität der Probelösung bei ansteigender Scherrate (0/s bis 1000/s) und bei absinkender Scherrate (1000/s bis 0/s) ermittelt. Die Scherrate wurde stufenförmig im Abstand von 5 s um 50/s erhöht (0/s bis 1000/s) beziehungsweise abgesenkt (1000/s bis 0/s). Insgesamt wurden 40 Messpunkte pro Probe erfasst. Als durchschnittliche Viskosität wurden die Messwerte der Scherung bei 800/s, 850/s, 900/s, 950/s und 1000/s durch das Messprogramm UDS200 V2.21 (Anton Paar GmbH, Ostfildern) gemittelt.

Es erfolgten Dreifachbestimmungen.

#### 3.2.4.7. Antioxidative Eigenschaften

Die antioxidativen Eigenschaften von Milcheiweiß wurden modifiziert nach Pellegrini et al. (1999) mit der ABTS-Radikalkation-Methode bestimmt. Das Prinzip der Reaktion besteht in einer Inaktivierung von ABTS-Radikalen durch antioxidativ wirksame Moleküle, die durch eine Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 734 \text{ nm}$  quantifiziert werden kann.

##### *Material*

- 2,2'-Azinobis-(3-Ethylenbenzothiazolin-6-Sulfonsäure)-Diammoniumsalz. Fluka, Buchs.
- Kaliumperoxodisulfat. Fluka, Buchs.
- Glutathion, reduziert. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

*Methode*

Kaliumperoxodisulfatlösung (w/w = 140 mmol/l in entmineralisiertem Wasser) und ABTS-Lösung (w/w = 7 mmol/l in entmineralisiertem Wasser) wurden vermischt (v/v = 1/58) und über 16 h bei 20°C unter Lichtausschluss miteinander inkubiert. Die Lösung wurde mit entmineralisiertem Wasser verdünnt bis eine Extinktion von  $E = 0,70 \pm 0,02$  bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 734$  nm erreicht wurde (ABTS-Arbeitslösung).

Für die Reaktion wurden 10  $\mu$ l Proteinlösung (w/w = 0,1% Protein in entmineralisiertem Wasser) bei 30°C mit 1 ml ABTS-Arbeitslösung versetzt. Die Extinktion der Probe ( $E_{\text{Probe}}$ ) und die Extinktion der ABTS-Arbeitslösung ( $E_{\text{Standard}}$ ) wurden bei 30°C über 30 min im Abstand von 5 min gemessen.

Die antioxidativen Eigenschaften von Milcheiweiß wurden als die prozentuale Inaktivierung von ABTS-Radikalen über eine Reaktionszeit von 30 min nach Formel 3-6 berechnet.

Die Eignung der Methode zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Proteinen wurde mit 0  $\mu$ g - 2  $\mu$ g Glutathion als Referenzsubstanz nachgewiesen (ohne Abb./Tab.).

$$\text{Inaktivierung [\%]} = 100 - \frac{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \times 100 \quad (3-6)$$

$E_{\text{Probe}}$  = Extinktion<sub>Probe</sub> [Reaktionszeit: 30 min]  
 $E_{\text{Standard}}$  = Extinktion<sub>Standard</sub> [Reaktionszeit: 30 min]

**3.2.5. Untersuchung der in-vitro Proteolysierbarkeit von modifiziertem Milcheiweiß**

Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde über 60 min bei 37°C mit Pancreatin im Enzym/Substrat-Verhältnis E/S = 1/500 hydrolysiert. Der pH-Wert wurde auf pH 7,8 eingestellt und während der Hydrolyse im pH-Stat-System (Multi-Dosimat 645, Impulsomat 614, pH Meter 691 und Magnetrührer 649; Metrohm, Herisau, Schweiz) konstant gehalten.

Der Verbrauch an 0,1 mol/l Natriumhydroxidlösung zur Konstanthaltung des pH-Wertes wurde kontinuierlich erfasst. Aliquote der hydrolysierten Milcheiweißlösung wurden im Abstand von 5 min entnommen und auf Veränderungen von Molmasse (s. Kap. 3.2.3.1., Kap. 3.2.3.2.) und löslichem Aminostickstoff (s. Kap. 3.2.3.4.) untersucht.

Die Hydrolyse wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.



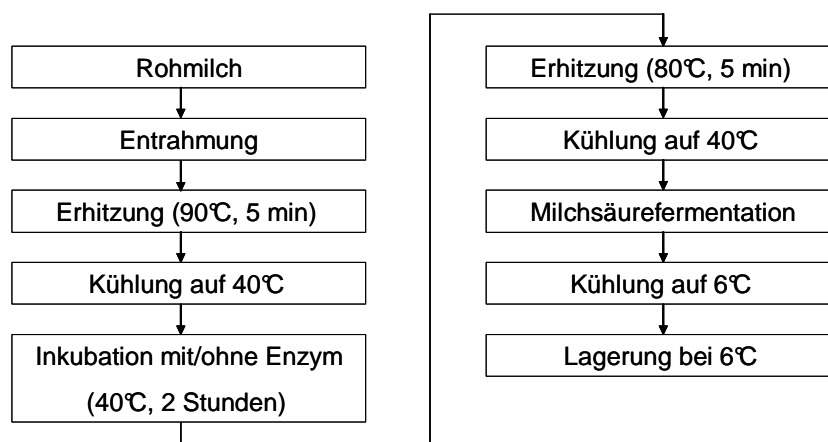
### 3.2.6. Methoden zur Herstellung von Magermilchjoghurt

#### 3.2.6.1. Herstellung von Magermilchjoghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch

Magermilchjoghurt wurde nach Abbildung 3.3 hergestellt. Gesamtmilcheiweiß in Joghurtmilch wurde über 2 Stunden bei 40°C mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase inkubiert (Tab. 3.2).

Als Starterkultur wurden thermophile Mehrspezies-Milchsäurebakterien (Bulk Set Y 502 LYO 500 I; Danisco Deutschland GmbH, Niebüll) eingesetzt. Die Milchsäurefermentation erfolgte bei 40°C bis zum Erreichen eines pH-Wertes von pH 4,68.

Die Joghurtproben wurden über 4 Wochen bei 6°C gelagert und während der Lagerzeit auf ihre chemisch-physikalischen und ihre sensorischen Eigenschaften untersucht.



**Abb. 3.3.** Fließschema zur Herstellung von Magermilchjoghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch

**Tab. 3.2.** Bedingungen der Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase

	Inkubationsbedingungen	
	U Enzym/mg Milcheiweiß	µmol Cofaktor/mg Milcheiweiß
Joghurtmilch	-	-
Joghurtmilch + LPO	8,00	-
Joghurtmilch + LPO	8,00	0,240 µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1)</sup>
Joghurtmilch + LPO <sup>2)</sup>	8,00	-
Joghurtmilch + PPO	0,01	0,015 µmol Chlorogensäure
Joghurtmilch + PPO	0,01	0,015 µmol PSGTE
Joghurtmilch + GOX <sup>2)</sup>	0,05	-

LPO = Lactoperoxidase, PPO = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, GOX = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>,  
 PSGTE = phenolische Substanzen aus Grünteextrakt

<sup>1)</sup> Inaktivierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 2-stündiger Inkubationszeit durch 0,13 U Catalase/mg Milcheiweiß (10 min, 40°C)

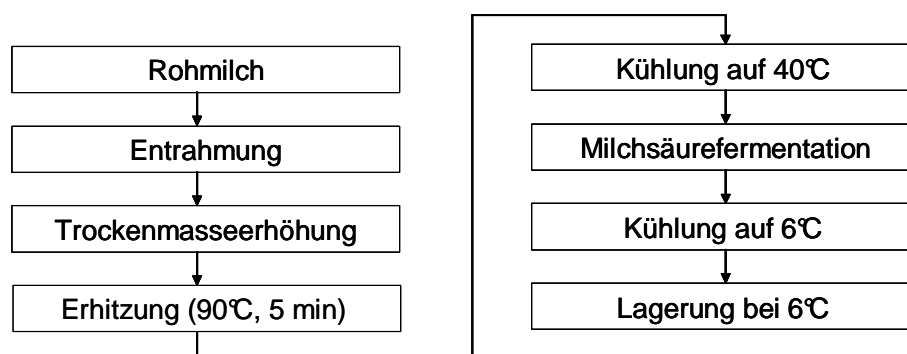
<sup>2)</sup> keine thermische Inaktivierung des Enzyms nach 2-stündiger Inkubationszeit

### 3.2.6.2. Herstellung von Magermilchjoghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte

Magermilchjoghurt wurde nach Abbildung 3.4 hergestellt. Die Trockenmasse von Joghurtmilch wurde durch Zusatz von unmodifizierten Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder durch Zusatz von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten erhöht (Tab. 3.3).

Als Starterkultur wurden thermophile Mehrspezies-Milchsäurebakterien (Bulk Set Y 502 LYO 500 I; Danisco Deutschland GmbH, Niebüll) eingesetzt. Die Milchsäurefermentation erfolgte bei 40°C bis zum Erreichen eines pH-Wertes von pH 4,68.

Die Joghurtproben wurden über 4 Wochen bei 6°C gelagert und während der Lagerzeit auf ihre chemisch-physikalischen und ihre sensorischen Eigenschaften untersucht.



**Abb. 3.4.** Fließschema zur Herstellung von Magermilchjoghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte

**Tab. 3.3.** Bedingungen der Trockenmasseerhöhung von Joghurtmilch durch Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte

Bedingungen der Trockenmasseerhöhung			
	$\Delta$ TM [% Protein]	Trockenmasse	<i>Maillard</i> -Reaktion
Joghurtmilch	+ 1,8	MP	-
Joghurtmilch	+ 1,8	MP	70°C, 65% r. F., 4 h
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Pektin	-
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Pektin	70°C, 65% r. F., 1 h
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Pektin	70°C, 65% r. F., 4 h
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Lactose	-
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Lactose	70°C, 65% r. F., 4 h
Joghurtmilch	+ 1,5	NC/Lactose	70°C, 65% r. F., 96 h

$\Delta$  TM = Trockenmasseveränderung, NC = Natriumcaseinat, MP = Magermilchpulver, r. F. = relative Feuchte

### 3.2.7. Untersuchung von Magermilchjoghurt auf chemisch-physikalische und auf sensorische Eigenschaften

#### 3.2.7.1. Azidität

Joghurt wurde auf die aktuelle (pH-Wert) und die potentielle (Säuregrad) Azidität untersucht. Der pH-Wert von Joghurt wurde mit einem pH-Meter (pH Meter 691; Metrohm, Herisau, Schweiz) gemessen.

Der Säuregrad von Joghurt wurde nach VDLUFA Methodenbuch VI, C 8.3 (2000) bestimmt. Es wurden 25,75 g Joghurt eingewogen und mit 0,1 mol/l Natriumhydroxidlösung bis zum Farbumschlag von Phenolphthalein (pH 8,3) als Indikator titriert. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

#### 3.2.7.2. Gelstärke

Die Gelstärke von Joghurt wurde als der mechanische Widerstand bestimmt, den Joghurtgele einem ins Gel eindringenden Prüfkörper entgegensetzen.

Dieser Punkturtest wurde mit dem LFRA-Texture-Analyzer (Stevens & Son Ltd., Laboratory Division, St. Albans, England) durchgeführt. Eingesetzt wurde ein zylindrischer Prüfkörper mit einer Auflagefläche von 5,07 cm<sup>2</sup>, der mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s über eine Strecke von 20 mm ins Joghurtgel gedrückt wurde. Der Widerstand des Joghurtgels gegenüber dem Prüfkörper wurde erfasst und nach Formel 3-7 zur Berechnung der Gelstärke zugrunde gelegt. Es erfolgten Doppelbestimmungen.

$$\text{Gelstärke [N/cm}^2\text{]} = \frac{F \times g}{a} \quad (3-7)$$

F = Kraft der Messapparatur [kg]  
g = Erdbeschleunigung = 9,81 m/s<sup>2</sup>  
a = Auflagefläche des Prüfkörpers = 5,07 cm<sup>2</sup>

#### 3.2.7.3. Viskosität

Die Viskosität von Magermilchjoghurt wurde als der Widerstand definiert, den ein Joghurtgel dem Messplatte/Messkegel-Meßsystem eines Rheometers im Rotationsversuch entgegensetzt. Wie bereits in Kapitel 3.2.4.6. für Proteinlösungen dargestellt, wurde ein Probevolumen von 0,7 ml Magermilchjoghurt bei einer Messtemperatur von 20°C zwischen Messplatte und Messkegel MK22 des Rheometers UDS 200 (Anton Paar GmbH, Ostfildern) bei einem Messspalt von 0,05 mm geschert. Als durchschnittliche Viskosität wurden die Messwerte der Scherung bei 800/s, 850/s, 900/s, 950/s und 1000/s durch das Messprogramm UDS200 V2.21 (Anton Paar GmbH, Ostfildern) gemittelt. Es erfolgten Dreifachbestimmungen.

### 3.2.7.4. Gelstruktur

Die Struktur von Joghurtgelen wurde lichtmikroskopisch erfasst. Joghurt wurde auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und das mikroskopische Bild bei 1.400-facher Vergrößerung am Durchlichtmikroskop (Axiolab Pol, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit einer Digitalkamera aufgezeichnet.

### 3.2.7.5. Molkenlässigkeit

Die Molkenlässigkeit von Magermilchjoghurt wurde anhand des Abtropfverhaltens stichfester Joghurtgele auf einem Analysensieb ermittelt.

Mit einem Speiseeisportionierer wurde eine halbkugelförmige Joghurtprobe entnommen und auf ein Analysensieb (11,5 x 11,5 cm Größe, 0,2 mm Maschenweite) aufgetragen. Über eine Standzeit von 2 Stunden bei 5°C wurde die abgetropfte Molke aufgefangen und ausgewogen. Die Molkenlässigkeit der Joghurtprobe wurde nach Formel 3-8 in Doppelbestimmung berechnet.

$$\text{Molkenlässigkeit [\%]} = \frac{\text{abgetropfte Molke [g]} \times 100}{\text{Einwaage [g]}} \quad (3-8)$$

### 3.2.7.6. Bestimmung von Lactose

Das Prinzip der Bestimmung von Lactose besteht in einer enzymatischen Spaltung von Lactose.  $\text{NADH} + \text{H}^+$  wird gebildet, das anhand einer Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  am Spektralphotometer quantifiziert werden kann.

#### *Material*

- Lactose/D-Glucose-Enzymtest, Best.-Nr. 10 986 119 035. Boehringer, Mannheim.
- Lactose/D-Galactose-Enzymtest, Best.-Nr. 10 176 303 035. Boehringer, Mannheim.

#### *Methode*

Joghurtproben wurden mit entmineralisiertem Wasser verdünnt, durch Carrez-Klärung und durch Erhitzung (15 min, 70°C) enteiweißt und filtriert. Das Filtrat wurde mit  $\beta$ -Galactosidase inkubiert. Zur Bestimmung von Glucose wurde anschließend mit Hexokinase und mit Glucose-6-Phosphatdehydrogenase inkubiert. Zur Bestimmung von Galactose wurde mit Galactosedehydrogenase inkubiert.

In Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  wurde  $\text{NADH} + \text{H}^+$  freigesetzt, dass durch eine Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  quantifiziert wurde und nach Formel 3-9 der Menge an Lactose in der Probelösung entspricht. Es erfolgten Doppelbestimmungen.

$$\text{Lactose [g/l Probelösung]} = \frac{V_{\text{Test}} \times M_{\text{Lactose}} \times \Delta E_{\lambda=340 \text{ nm}}}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times V_{\text{Probe}} \times 1000} \quad (3-9)$$

$V_{\text{Test}}$	= Testvolumen [ml]
$M_{\text{Lactose}}$	= Molmasse <sub>Lactose</sub> = 342,3 g/mol
$\Delta E_{\lambda=340 \text{ nm}}$	= Extinktionsänderung $\lambda = 340 \text{ nm}$
$l$	= Schichtdicke der Küvette = 1 cm
$\epsilon_{\text{NADH}}$	= molarer Extinktionskoeffizient von NADH = $6,3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
$V_{\text{Probe}}$	= Probevolumen [ml]

### 3.2.7.7. Acetaldehyd

Das Prinzip der Bestimmung von Acetaldehyd besteht in der enzymatischen Oxidation von Acetaldehyd zu Essigsäure. In Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  wird  $\text{NADH} + \text{H}^+$  gebildet, das durch eine Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  am Spektralphotometer quantifiziert werden kann.

#### Material

- Acetaldehyd-Enzymtest, Best.-Nr. 10 668 613 035. Boehringer, Mannheim.

#### Methode

Magermilchjoghurt wurde mit entmineralisiertem Wasser verdünnt, durch 20%ige Zitronensäurelösung enteweißt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Aldehyddehydrogenase inkubiert. In Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  wurde  $\text{NADH} + \text{H}^+$  freigesetzt, dass durch eine Extinktionsänderung bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  quantifiziert wurde und nach Formel 3-10 der Menge an Acetaldehyd in der Probelösung entspricht. Es erfolgten Doppelbestimmungen.

$$\text{Acetaldehyd [g/kg Joghurt]} = \frac{V_{\text{Test}} \times M_{\text{Acetaldehyd}} \times \Delta E_{\lambda=340 \text{ nm}} \times 1,01 \times 1,03}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times V_{\text{Probe}} \times 1000 \times 1,023} \quad (3-10)$$

$V_{\text{Test}}$	= Testvolumen [ml]
$M_{\text{Acetaldehyd}}$	= Molmasse <sub>Acetaldehyd</sub> = 44,1 g/mol
$\Delta E_{\lambda=340 \text{ nm}}$	= Extinktionsänderung $\lambda = 340 \text{ nm}$
$l$	= Schichtdicke der Küvette = 1 cm
$\epsilon_{\text{NADH}}$	= molarer Extinktionskoeffizient von NADH = $6,3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
$V_{\text{Probe}}$	= Probevolumen [ml]

### 3.2.7.8. Sensorische Eigenschaften von Joghurt

Joghurt wurde durch ein Taste-Panel nach DIN 10967-1 (Profilprüfung, Deutsches Institut für Normung, 1999) auf seine sensorischen Eigenschaften untersucht.

Joghurtproben aus unbehandelter Joghurtmilch wurden jeweils im Vergleich zu folgenden Joghurtproben aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch bewertet:

- Joghurt aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch (8 U Enzym/mg Milcheiweiß; 40°C, 2 h, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert),
- Joghurt aus laccasebehandelter Joghurtmilch (0,011 U Enzym und 15 µmol phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt/mg Milcheiweiß; 40°C, 2 h, pH 7,0),
- Joghurt aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch (0,05 U Enzym/mg Milcheiweiß; 40°C, 2 h, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert).

Joghurtproben aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unmodifizierte Protein/Saccharid-Pulvermischungen wurden jeweils im Vergleich zu folgenden Joghurtproben aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte bewertet:

- Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung (w/w = 5%) durch Magermilchpulver (70°C, 65% r. F., 4 h),
- Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung (w/w = 3%) durch Natriumcaseinat/ Pektin-*Maillard*-Produkte (70°C, 65% r. F., 4 h).

Die Joghurtproben wurden nach der Herstellung über 14 Tage bei 5°C gelagert und vor der sensorischen Prüfung auf Raumtemperatur temperiert.

Die sensorische Prüfung erfolgte durch ein ungeschultes Taste-Panel (n = 10 Prüfpersonen der BfEL, Kiel und/oder 20 studentische Prüfpersonen der CAU, Kiel im Alter von etwa 25 - 55 Jahren) mit Erfahrung in der Durchführung sensorischer Tests. Die sensorische Prüfung wurde in separaten Prüfkabinen bei Raumtemperatur und künstlicher Beleuchtung nach etwa 2-stündiger Nahrungskarenz der Prüfpersonen durchgeführt. Die Joghurtbecher wurden durch die einzelnen Prüfer jeweils frisch geöffnet und zunächst auf Geruch und Aussehen bewertet. Konsistenz und Geschmack des Joghurts wurde durch manuelles Rühren und gustatorische Prüfung beurteilt.

Die Produkteigenschaften Aussehen, Geruch, Geschmack und Konsistenz wurden nach einem vorab erarbeiteten Vokabular zur Bewertung von Joghurt (Tab. 3.4) beurteilt. Die Intensität der Ausprägung von Produkteigenschaften wurde auf einer Skala von 0 (keine Ausprägung) bis 5 (starke Ausprägung) bewertet. Die Bewertung der Prüfer wurde elektronisch erfasst und mit dem Programm FizzData 2.00M (Biosystemes, Couternon, Frankreich) ausgewertet.

**Tab. 3.4.** Vokabular<sup>1)</sup> zur sensorischen Bewertung von Joghurt nach Aussehen, Konsistenz, Geruch und Geschmack

Produkteigenschaften			
Aussehen	Konsistenz	Geruch	Geschmack
glatt, molkenlässig, grau	cremig, glatt, klumpig, mehlig, puddingartig, sandig, schleimig	Acetaldehyd, bitter, brandig, dumpf/muffig, fruchtig, gärig, hefig, Intensität, leer, metallisch, mild, molkelig, ranzig, sauer, seifig, süß	Acetaldehyd, adstringierend, aromatisch, bitter, brandig, dumpf/muffig, gärig, hefig, Intensität, fade/leer, malzig, metallisch, ranzig, sauer, seifig, süß, wässrig

<sup>1)</sup> erarbeitet durch das Taste-Panel nach DIN 10967-1

### 3.2.8. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse wurden in Mehrfachbestimmung ermittelt. Angegeben werden der Mittelwert (Formel 3-11), die Standardabweichung (Formel 3-12) und der Variationskoeffizient (Formel 3-13), die nach den angegebenen Formeln berechnet wurden.

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{n} \quad (3-11)$$

$$\text{Standardabweichung } s_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2 \right)} \quad (3-12)$$

$$\text{Variationskoeffizient } \text{VarK} [\%] = \frac{\bar{x}}{s_x} \times 100 \quad (3-13)$$

n = Stichprobenumfang  
x = Messwert

Zur Validierung der eingesetzten Methoden wurden die techno-funktionellen Eigenschaften von unbehandeltem Milcheiweiß in Zehnfachbestimmung ermittelt. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der Messwerte, die nach Kapitel 3.2.4. für Natriumcaseinat, Molkenproteinisolat und Gesamtmilchprotein ermittelt wurden, sind in Tabelle A.5 angegeben.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

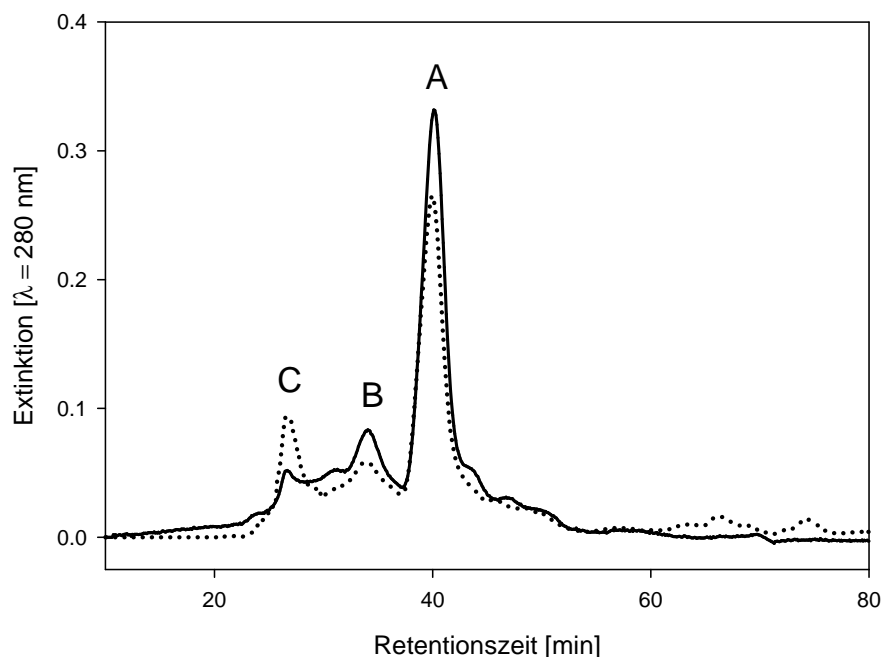
### 4.1. Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß

#### 4.1.1. Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase

Milcheiweiß wurde in entmineralisiertem Wasser mit Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid inkubiert und auf Veränderungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften untersucht.

Durch Größenausschlusschromatographie (FPLC) wurde ermittelt, wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase verändert. Molmassenfractionen konnten durch einen Vergleich von experimentell ermittelten Chromatogrammen mit Chromatogrammen von Molmassenstandardsubstanzen  $>2 \times 10^5$  g/mol (Abb. A.1A), von  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  g/mol (Abb. A.1B) und  $<2 \times 10^4$  g/mol (Abb. A.1C) identifiziert werden.

Abbildung 4.1 zeigt die Größenausschlusschromatogramme von unbehandeltem und von lactoperoxidasebehandeltem Natriumcaseinat. Es ist dargestellt, dass unbehandeltes Natriumcaseinat im Wesentlichen aus Proteinmolekülen besteht, die in Peak A ( $2,5 \times 10^4$  -  $4,3 \times 10^4$  g/mol) eluiert werden. Lactoperoxidasebehandeltes Natriumcaseinat weist eine geringere Absorption in Peak A ( $2,5 \times 10^4$  -  $4,3 \times 10^4$  g/mol) und in Peak B ( $1,6 \times 10^5$  -  $2,3 \times 10^5$  g/mol) auf als unbehandeltes Natriumcaseinat. Eine höhere Absorption ist im Bereich von Peak C dargestellt, der Proteinmolekülen mit Molmassen von  $6,7 \times 10^5$  -  $>2 \times 10^6$  g/mol entspricht.



**Abb. 4.1.** Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von unbehandeltem (—) und von lactoperoxidasebehandeltem<sup>1)</sup> (----) Natriumcaseinat

Peak A =  $2,5 \times 10^4$  -  $4,3 \times 10^4$  g/mol, Peak B =  $1,6 \times 10^5$  -  $2,3 \times 10^5$  g/mol, Peak C =  $6,7 \times 10^5$  -  $>2 \times 10^6$  g/mol

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und  $1,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ , 24 h, 40°C, pH 7,0

**Tab. 4.1.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von unbehandeltem und von lactoperoxidasebehandeltem Milcheiweiß

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfaktionen [g/mol]			
	$>2 \times 10^6$	$2 \times 10^5 -$ $2 \times 10^6$	$2 \times 10^4 -$ $2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC	16,7	12,3	22,8	48,2
NC + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	21,9	8,1	15,2	54,8
MPI	4,7	3,6	5,2	86,5
MPI + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	6,1	11,4	15,2	67,3
MP	n.e.	3,4	70,1	26,5
MP + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	n.e.	3,3	80,3	16,4
MPMM	n.e.	0,2	71,4	28,4
MPMM + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>3)</sup>	n.e.	5,3	81,3	13,4
MPRM	n.e.	0,1	70,2	29,7
MPRM + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>3)</sup>	n.e.	7,6	80,2	12,2

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, MPMM = Gesamtmilchprotein in unerhitzter Magermilch, MPRM = Gesamtmilchprotein in Rohmilch, LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid, n.e. = nicht erfasst

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC für Natriumcaseinat und für Molkenproteinisolat, ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung für Gesamtmilchprotein; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

Proteinmonomere in unbehandeltem Natriumcaseinat, die im Wesentlichen in Peak A eluiert werden (Abb. 4.1), werden durch Inkubation mit Lactoperoxidase hauptsächlich zu Proteinpolymeren bis  $>2 \times 10^6$  g/mol (Peak C) umgesetzt.

Tabelle 4.1 quantifiziert den Anteil einzelner Molmassenfaktionen in unbehandeltem Milcheiweiß und in lactoperoxidasebehandeltem Milcheiweiß. Nach Tabelle 4.1 werden durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Lactoperoxidase Reaktionsprodukte gebildet, die zu 21,9% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $>2 \times 10^6$  g/mol bestehen. Proteinmoleküle mit Molmassen von  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$  g/mol in Natriumcaseinat werden durch Inkubation mit Lactoperoxidase prozentual vermindert (Tab. 4.1). Da einzelne Caseinfaktionen in Natriumcaseinat durch FPLC nicht voneinander differenziert werden (Abb. 4.1), konnte durch SDS-PAGE ermittelt werden, dass Lactoperoxidase besonders die  $\beta$ -Casein-Fraktion in Natriumcaseinat umsetzt (Tab. A.1).

In der Literatur wurde über eine Quervernetzung von Aminosäurenresten in Casein durch Inkubation mit Peroxidase/Wasserstoffperoxid berichtet (Aeschbach et al. 1976, Østdal et al. 2000, Thomas und Aune 1977). Die Aktivität der Lactoperoxidase wurde nach Fonteh et al. (2005) jedoch durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Caseinmolekülen herabgesetzt.

Tabelle 4.1 zeigt für die Molmassenverteilung von Natriumcaseinat, dass der prozentuale Gehalt an Protein  $<2 \times 10^4$  g/mol durch Inkubation mit Lactoperoxidase von 48,2% auf 54,8% ansteigt. Davies (1987) und Matheis und Whitaker (1984) bestätigten, dass durch Peroxidase Reaktionsprodukte gebildet werden können, die eine niedrigere Molmasse aufweisen als

Moleküle in unbehandeltem Protein. Dean et al. (1997) und Østdal et al. (2000) beschrieben, dass durch eine enzymatisch-induzierte Oxidation sowohl eine Quervernetzung als auch eine Fragmentierung von Proteinmolekülen auftreten kann. Nach Davies und Delsignore (1987) bilden die durch Fragmentierung gebildeten Peptide und Proteine teilweise untereinander Aggregate durch nicht kovalente Wechselwirkungen aus.

Nach Tabelle 4.1 kann eine Fragmentierung von Milcheiweiß beziehungsweise eine quantitative Zunahme an Protein  $< 2 \times 10^4$  g/mol durch Inkubation mit Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid nur für Natriumcaseinat beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, dass besonders Proteinmoleküle in Natriumcaseinat durch ihre offenkettige Tertiärstruktur (Walstra et al. 2006) enzymatisch-induziert fragmentiert werden.

Tabelle 4.1 zeigt, dass Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Lactoperoxidase im Wesentlichen zu oligomeren Reaktionsprodukten mit Molmassen von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  g/mol umgesetzt wird. Proteinmonomere - ausgedrückt als Proteinfraction  $< 2 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.1) - werden durch Inkubation mit Lactoperoxidase von 86,6% in unbehandeltem Molkenproteinisolat auf 67,3% in lactoperoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat vermindert. Lactoperoxidase-behandeltes Molkenproteinisolat besteht zu 15,2% aus Proteinoligomeren mit Molmassen von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und zu 11,4% aus Proteinoligomeren von  $2 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  g/mol (Tab. 4.1).  $\beta$ -Lactoglobulin in Molkenproteinisolat wird durch Inkubation mit Lactoperoxidase quantitativ stärker modifiziert als  $\alpha$ -Lactalbumin (Tab. A.2).

Eine enzymatische Quervernetzung von Aminosäurenresten in Molkenprotein durch Peroxidase/Wasserstoffperoxid wurde durch Færgemand et al. (1998a), Aeschbach et al. (1976) und Østdal et al. (2000) berichtet. Stahmann et al. (1977) wiesen nach, dass Molkenproteindimere bis -pentamere durch kovalente Bindungen, durch hydrophobe Wechselwirkungen und durch Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Færgemand et al. (1998a) synthetisierten durch Peroxidase Molkenproteinoligomere bis -polymere. Davies und Delsignore (1987) wiesen nach, dass die Tertiärstruktur von Blutseryalbumin durch enzymatisch-induzierte Oxidation entfaltet wird und dass sich Di-, Tri- und Tetramere ausbilden. Die Beobachtung, dass  $\beta$ -Lactoglobulin enzymatisch stärker umgesetzt wird als  $\alpha$ -Lactalbumin (Tab. A.2), bestätigten Færgemand et al. (1998a).

Gesamtmilchprotein konnte nur durch densitometrische SDS-PAGE auf seine Molmassenverteilung untersucht werden, da die Reaktionsprodukte zur FPLC-Untersuchung nicht membranfiltriert werden konnten (Kap. 3.2.3.1.). Daher wird der Molmassenbereich  $> 2 \times 10^5$  g/mol in Tabelle 4.1 nicht genauer differenziert. Tabelle 4.1 zeigt jedoch, dass Molmassen  $< 2 \times 10^4$  g/mol durch Inkubation mit Lactoperoxidase prozentual vermindert werden, Molmassen  $> 2 \times 10^4$  g/mol prozentual ansteigen. Nach Tabelle 4.1 modifiziert Lactoperoxidase sowohl Gesamtmilchprotein in rekonstituiertem Magermilchpulver als auch Gesamtmilchprotein in unerhitzter Magermilch und in Rohmilch. Nach Tabelle A.3 werden durch Inkubation von Gesamtmilchprotein mit Lactoperoxidase Caseinmonomere quantitativ stärker modifiziert als Molkenproteinmonomere.

Østdal et al. (2000) beschrieben eine Oxidation von Aminosäurenresten in Gesamtmilchprotein durch Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid. Nach Fonteh et al. (2005) hemmt die Quartärstruktur von Caseinen in Milch die Aktivität der Lactoperoxidase sterisch; die Gegenwart von Lactose in Milch fördert die Aktivität der Lactoperoxidase.

Oudgenoeg et al. (2001) gingen davon aus, dass unterschiedliche globuläre und/oder offenkettige Moleküle oxidativ miteinander quervernetzt werden können. Ob jedoch neben Casein/Casein- und Molkenprotein/Molkenprotein-Produkten auch Casein/Molkenprotein-Produkte gebildet wurden, konnte in den vorliegenden Untersuchungen analytisch nicht differenziert werden.

In der Literatur wird eine enzymatisch-induzierte Oxidation von Proteinen mit unspezifischen Oxidationsreaktionen von Aminosäurenresten und der Bildung klassischer Proteinoxidationsprodukte, wie Dityrosin, in Verbindung gebracht (Stahmann et al. 1977). Da Proteinoxidationsprodukte als weitgehend stabil gegenüber einer Säurehydrolyse gelten (Aeschbach et al. 1976, Takasaki et al. 2005, Hanft und Köhler 2005), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten in Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase abgeleitet werden.

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem Milcheiweiß und in lactoperoxidasebehandeltem Milcheiweiß.

Tabelle 4.2 zeigt, dass Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Leucin, Tyrosin und Lysin in Milcheiweiß durch Lactoperoxidase modifiziert werden. Tyrosin wird um bis zu 75% modifiziert, Methionin um bis zu 100% (Tab. 4.2). In lactoperoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat und in lactoperoxidasebehandeltem Gesamtmilchprotein ist bis zu 52% weniger Alanin nachweisbar (Tab. 4.2), in lactoperoxidasebehandeltem Natriumcaseinat 68% weniger Glutaminsäure (Tab. 4.2). Für lactoperoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat zeigt Tabelle 4.2 zusätzlich eine Abnahme im Gehalt an Asparaginsäure um 30%, an Leucin um 29% und an Lysin um 24%.

**Tab. 4.2.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in lactoperoxidasebehandeltem<sup>2)</sup> Milcheiweiß

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC	NC + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MPI	MPI + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MP	MP + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Asparaginsäure	6,34	6,64	<b>10,43</b>	<b>7,32</b>	7,46	7,61
Glutaminsäure	<b>20,30</b>	<b>6,42</b>	17,24	18,31	19,96	19,82
Alanin	4,01	4,21	<b>8,94</b>	<b>4,28</b>	<b>5,09</b>	<b>4,37</b>
Methionin	<b>3,28</b>	<b>1,42</b>	<b>3,26</b>	<b>0,00</b>	<b>2,61</b>	<b>0,84</b>
Leucin	9,83	10,08	<b>14,28</b>	<b>10,17</b>	11,04	10,37
Tyrosin	<b>4,52</b>	<b>3,34</b>	<b>2,46</b>	<b>0,91</b>	<b>3,49</b>	<b>0,88</b>
Lysin	6,84	7,25	<b>9,53</b>	<b>7,26</b>	7,94	7,51

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

In Abhängigkeit vom Substrat werden durch Lactoperoxidase verschiedene Aminosäurenreste modifiziert (Tab. 4.2). Nach Østdal et al. (2000), Michon et al. (1999), Thomas und Aune (1977), Aeschbach et al. (1976) und Boeriu et al. (2004) wird die Umsetzung von Aminosäurenresten durch Peroxidase bestimmt durch die Konzentration, die sterische Verfügbarkeit und die Oxidationsempfindlichkeit der Aminosäurenreste im Proteinmolekül. Davies et al. (1987a) wiesen nach, dass grundsätzlich alle Aminosäurenreste in Blutserumalbumin oxidiert werden können. In Übereinstimmung mit Tabelle 4.2 berichteten Dean et al. (1997), Matheis und Whitaker (1984), Davies (1987), Davies et al. (1987a) und Stahmann et al. (1977), dass besonders die Aminosäurenreste Tyrosin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Methionin, Cystein, Tryptophan und Phenylalanin leicht oxidiert werden können.

Der Gehalt an Tyrosin nimmt sowohl in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat als auch in Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid ab (Tab. 4.2). Oudgenoeg et al. (2001), Aeschbach et al. (1976), Michon et al. (1999), Peyron et al. (2001) und Schooneveld-Bergmans et al. (1999) bestätigten eine Abnahme an Tyrosin. Sie beschrieben die Ausbildung von Isodityrosin, das durch verschiedene Bindungspositionen an den aromatischen Ringen der Tyrosinreste verknüpft ist. Die Bindungsposition wird nach Grabber et al. (2000) bestimmt durch die Inkubationsbedingungen, nach Oudgenoeg et al. (2001) durch die Aminosäuren, die in der Primärstruktur benachbart zum Tyrosin angeordnet sind. Die Bindungsposition zwischen Tyrosinresten bestimmt die Struktur und die funktionellen Eigenschaften der Vernetzungsprodukte (Oudgenoeg et al. 2001). Aeschbach et al. (1976) ermittelten für eine Inkubation von Casein und von Blutserumalbumin mit Peroxidase eine Abnahme von Tyrosin um bis zu 30% und eine Bildung von Dityrosin in Mengen von etwa 1,4%. Østdal et al. (2000) konnten für Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid in Milch eine Bildung von 2,0% Dityrosin nachweisen. Für Getreideeiprotein mit Peroxidase/Wasserstoffperoxid berichteten Michon et al. (1999) die Bildung von Dityrosin aus bis zu 12,0% der Tyrosinreste. Davies (1987) konnte neben einer Bildung von Dityrosin auch eine Verminderung an Tryptophan um bis zu 70% in Blutserumalbumin und um bis zu 30% in  $\alpha_5$ -Casein durch Oxidation nachweisen.

Ergänzend zu Tabelle 4.2 gibt Tabelle 4.3 den Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in lactoperoxidasebehandeltem Milcheiweiß an. Tabelle 4.3 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase ansteigt und dass der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß um bis zu 20% absinkt.

Eine Abnahme an SH-Gruppen (Tab. 4.3) und an Methionin (Tab. 4.2) in Milcheiweiß korrespondiert mit der durch Marin et al. (2005), Dean et al. (1997), Østdal et al. (2000) und Özer et al. (2003) beschriebenen Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren zu Disulfidbrückenbindungen (Matheis und Whitaker 1984). Thomas und Aune (1977) geben an, dass 1 mol Wasserstoffperoxid 1 mol SH-Gruppen in Blutserumalbumin oder in  $\beta$ -Lactoglobulin oxidiert. Marin et al. (2005) konnten unter dem Einfluss einer Kaltsterilisierung von Kuhmilch durch Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid eine Umsetzung von Methionin um bis zu 80% und von Cystein um bis zu 50% in Gesamtmilchprotein nachweisen.

Ein Anstieg an löslichem Aminostickstoff (Tab. 4.3) korrespondiert mit einer Entfaltung der Proteinstruktur durch Oxidation und mit einer Fragmentierung von Proteinmolekülen (Davies und Delsignore 1987).

**Tab. 4.3.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in lactoperoxidasebehandeltem<sup>1)</sup> Milcheiweiß

	Gehalt der Lösung an	
	löslichem Aminostickstoff [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]	SH-Gruppen [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ Protein]
NC	4,07 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,01
NC mit LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,69 $\pm$ 0,24	0,26 $\pm$ 0,01
MPI	12,24 $\pm$ 0,35	2,10 $\pm$ 0,03
MPI mit LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,97 $\pm$ 0,31	1,87 $\pm$ 0,02
MP	8,36 $\pm$ 0,26	0,44 $\pm$ 0,02
MP mit LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,75 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,01

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver,  
LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase,  
47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu\text{mol}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

#### 4.1.1.1. Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase

Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde über 24 Stunden bei 40°C und pH 7,0 mit 47,5 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol Wasserstoffperoxid inkubiert (Kap. 3.2.1.1.). Ausgehend von diesen Inkubationsbedingungen wurden jeweils einzelne Bedingungen variiert, um die optimalen Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase zu ermitteln. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die Inkubationsbedingungen, unter denen durch Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der höchste Umsatz an Proteinmonomeren in Milcheiweiß ermittelt werden konnte.

**Tab. 4.4.** Optimale Inkubationsbedingungen<sup>1)</sup> von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase

		Inkubationsbedingungen		
		NC	MPI	MP
Proteinkonzentration [%]	[1...10]	5	5 - 10	5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Substrat [µmol/mg]	[0,0...18,0]	1,8	≥18,0	1,8
Enzymaktivität/Substrat [U/mg]	[0,0...47,5]	≥47,5	≥47,5	4,8
Inkubationstemperatur [°C]	[20...50]	40	50	50
Inkubationszeit [h]	[0...24]	16	1	1
pH-Wert	[pH 4...pH 12]	pH 5	pH 4	pH 5

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC- oder densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

#### Proteinkonzentration

Milcheiweiß wird unter den gegebenen Bedingungen bei einer Proteinkonzentration von ~5% am stärksten durch Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modifiziert (Tab. 4.4, Abb. A.2A).

In der Literatur wurde für Arbeiten mit Peroxidase Protein in einer Konzentration von ≤10% eingesetzt (Færgemand et al. 1998a, Oudgenoeg et al. 2001, Thomas und Aune 1977, Aeschbach et al. 1976, Stahmann et al. 1977, Boeriu et al. 2004).

#### Wasserstoffperoxidkonzentration

Die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration zur Modifizierung von Natriumcaseinat und von Gesamtmilchprotein durch Lactoperoxidase beträgt unter den gewählten Bedingungen 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg Milcheiweiß, zur Modifizierung von Molkenproteinisolat ≥18 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg Milcheiweiß (Tab. 4.4, Abb. A.2B).

Boeriu et al. (2004), Oudgenoeg et al. (2001), Hanft und Köhler (2005), Aeschbach et al. (1976) und Stahmann et al. (1977) arbeiteten mit Peroxidase und 0,3 µmol - 12,5 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg Protein. Østdal et al. (2000) nutzten zur Aktivierung der Lactoperoxidase in Kuhmilch 1,0 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je Liter Milch.

Nach Færgemand et al. (1998a) erhöht sich mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration die sterische Verfügbarkeit von Aminosäurenresten in der Struktur von Molkenproteinen und damit potenziell der Grad einer enzymatischen Quernetzung durch Peroxidase.

Aus Abbildung A.2B geht zusätzlich hervor, dass Milcheiweiß durch Lactoperoxidase auch in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid umgesetzt wird. Eine Anwendung von Peroxidase auf Getreideeiweiße führte nach Takasaki et al. (2005) jedoch nur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zur Bildung von Isodityrosin.

### Enzym/Substrat-Verhältnis

Die Umsetzung von Natriumcaseinat und von Molkenproteinisolat durch Lactoperoxidase steigt unter den gegebenen Bedingungen mit der Enzymmenge bis  $\geq 47,5$  U Enzym/mg Milcheiweiß an. Gesamtmilchprotein wird durch 4,8 U Enzym/mg Milcheiweiß am stärksten umgesetzt (Tab. 4.4, Abb. A.2C). Es ist anzunehmen, dass zur enzymatischen Modifizierung von Gesamtmilchprotein eine vergleichsweise niedrigere Enzymmenge benötigt wird als zur Modifizierung von Natriumcaseinat oder von Molkenproteinisolat, da Fonteh et al. (2005) nachwies, dass die Gegenwart von Lactose in Milch die Aktivität der Lactoperoxidase fördert.

Die Enzymaktivität pro mg Substrat wurde in der Literatur mit 0,9 U - 50,0 U Lactoperoxidase je mg Protein berichtet (Oudgenoeg et al. 2001, Aeschbach et al. 1976, Boeriu et al. 2004, Stahmann et al. 1977). Færgemand et al. (1998a) glichen eine geringe Enzymaktivität durch eine höhere Konzentration an Wasserstoffperoxid aus.

### Inkubationszeit

Die Umsetzung einzelner Molmassenfraktionen von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase/ $H_2O_2$  wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erfasst und ist in Abbildung 4.2 am Beispiel von Natriumcaseinat dargestellt.

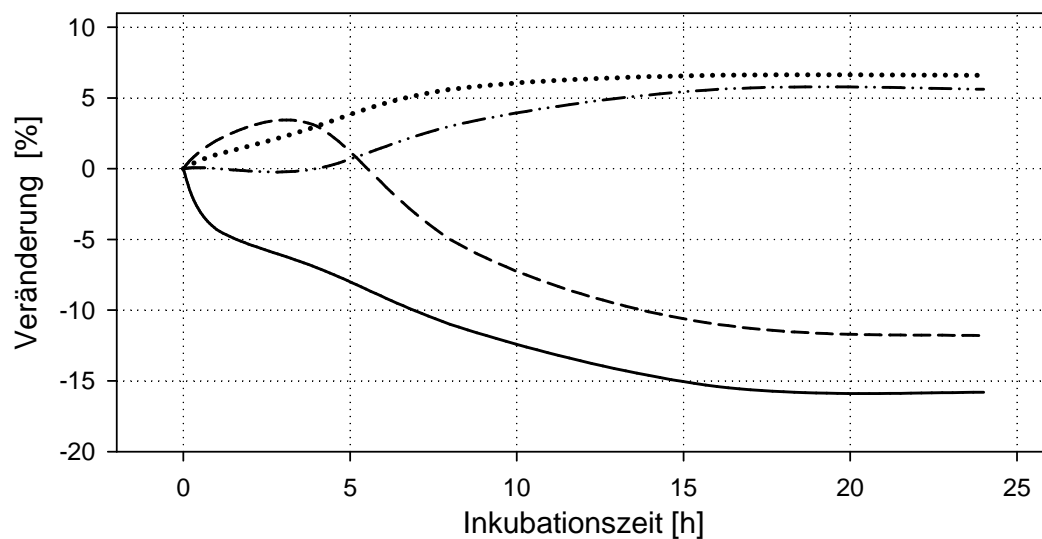
Abbildung 4.2 zeigt, dass Caseinmonomere in Natriumcaseinat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit kontinuierlich vermindert werden. Østdal et al. (2000) und Schooneveld-Bergmans et al. (1999) konnten erste radikalische Intermediate und Isodityrosin bereits nach einigen Minuten Inkubationszeit nachweisen.

Nach Abbildung 4.2 werden Proteinpolymere  $> 2 \times 10^6$  g/mol durch Lactoperoxidase ab einer Inkubationszeit von 4 Stunden synthetisiert. Proteinoligomere mit Molmassen von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  g/mol treten als Intermediate der enzymatischen Reaktion innerhalb der ersten 6 Stunden Inkubationszeit auf. Proteinmoleküle  $< 2 \times 10^4$  g/mol werden innerhalb der ersten 10 Stunden Inkubationszeit mit Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid gebildet. Nach Abbildung 4.2 ist die enzymatische Umsetzung von Natriumcaseinat nach 16 Stunden Inkubationszeit abgeschlossen.

In Bezug auf die Inkubation von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilcheiweiß mit Lactoperoxidase wurde der höchste Anteil an Proteinvernetzungsprodukten  $> 2 \times 10^4$  g/mol innerhalb einer Inkubationszeit von 1 Stunde synthetisiert (Tab. 4.4, Abb. A.3, Abb. A.4).

In der Literatur werden Inkubationszeiten von Milcheiweiß mit Peroxidase von 2 h - 8 h (Stahmann et al. 1977) und von 24 h berichtet (Færgemand et al. 1998a, Aeschbach et al. 1976, Schooneveld-Bergmans et al. 1999).





**Abb. 4.2.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Lactoperoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Caseinmonomere (—), Molmasse  $< 2 \times 10^4$  g/mol (....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^6$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ , 24 h, 40°C, pH 7,0

### Inkubationstemperatur

Im untersuchten Temperaturbereich von 20°C - 50°C beträgt die optimale Inkubationstemperatur mit Lactoperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  für Natriumcaseinat 40°C und für Molkenproteinisolat beziehungsweise für Gesamtmilchprotein 50°C (Tab. 4.4). Eine enzymatische Umsetzung von Milchprotein durch Lactoperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ist im gesamten Temperaturbereich von 20°C - 50°C nachzuweisen (Abb. A.2D).

Oudgenoeg et al. (2001), Peyron et al. (2001), Thomas und Aune (1977), Stahmann et al. (1977), Østdal et al. (2000), Schooneveld-Bergmans et al. (1999) und Boeriu et al. (2004) arbeiteten mit Peroxidasen bei Raumtemperatur. Eine oxidative Quervernetzung von Protein durch Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  berichteten Færgemand et al. (1998a) und Aeschbach et al. (1976) bei 40°C.

### pH-Wert

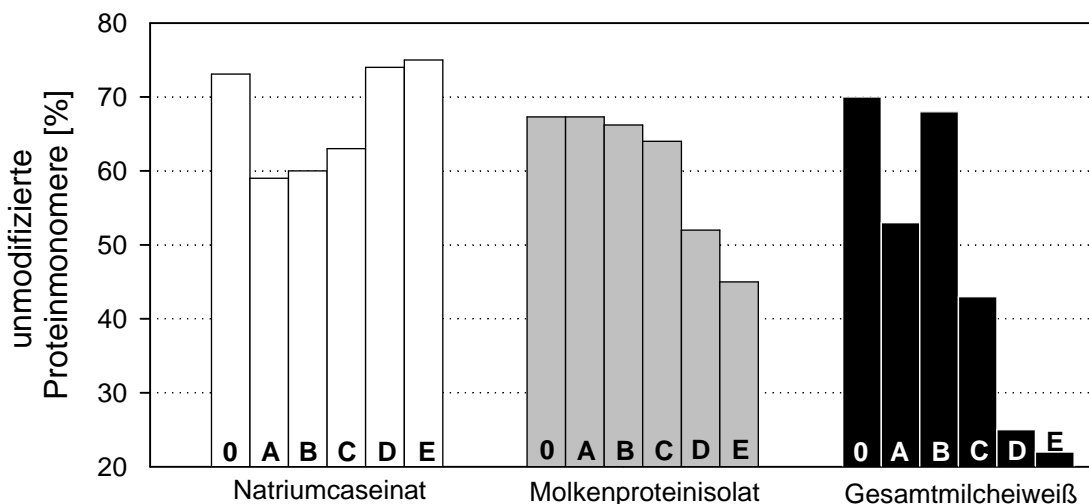
Die stärkste Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde um pH 5 erzielt (Tab. 4.4). Dieser pH-Wert entspricht dem pH-Optimum von Peroxidasen (Seifu et al. 2005) und wurde in der Literatur für Arbeiten mit Peroxidasen eingesetzt (Peyron et al. 2001, Norsker et al. 2000, Schooneveld-Bergmans et al. 1999). Michon et al. (1999), Stahmann et al. (1977), Østdal et al. (2000) und Boeriu et al. (2004) arbeiteten mit Peroxidase um pH 7.

Hohe Grade der Modifizierung von Milcheiweiß konnten auch durch Inkubation mit Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei pH-Werten von pH  $\geq$ 8 erzielt werden (Abb. A.2E). In diesem pH-Bereich überschneidet sich die enzymatische Quervernetzung von Protein durch Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit chemisch-physikalischen Quervernetzungsreaktionen durch den alkalischen pH-Wert (Færgemand et al. 1998a). Aeschbach et al. (1976), Færgemand et al. (1998a) und Oudgenoeg et al. (2001) arbeiteten mit Peroxidase bei alkalischem pH-Wert, um hohe Vernetzungsgrade von Proteinen zu erzielen. Nach Seifu et al. (2005) liegt bei pH 9,6 jedoch der isoelektrische Punkt der Lactoperoxidase.

Neben dem pH-Wert beeinflussen auch Puffersysteme die Aktivität der Lactoperoxidase. Hiller und Lorenzen (2008) wiesen nach, dass Puffersysteme wie Natriumtetraboratpuffer oder Phosphatpuffer, die für Arbeiten mit Peroxidase verwendet wurden, eine enzymatische Quervernetzung von Milcheiweiß vortäuschen können.

### Vorbehandlung von Milcheiweiß

Milcheiweiß wurde mit Ascorbinsäure, Cystein, Cystin und Hitze chemisch-physikalisch modifiziert und anschließend mit Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Abbildung 4.3 stellt dar, wie sich eine chemisch-physikalische Vorbehandlung von Milcheiweiß auf die enzymatische Umsetzung von Proteinmonomeren durch Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auswirkt.



**Abb. 4.3.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC- oder densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> ohne Vorbehandlung (0), Vorbehandlung mit 0,05 mg Ascorbinsäure/mg Protein (A), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystein/mg Protein (B), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystin/mg Protein (C), thermische Vorbehandlung (80°C, 10 min) (D), thermische Vorbehandlung (80°C, 20 min) (E)

Abbildung 4.3 zeigt, dass die enzymatische Modifizierung von Natriumcaseinat und von Gesamtmilcheiweiß durch Vorbehandlung mit Ascorbinsäure, Cystein und Cystin verstärkt wird. Molkenproteinisolat und Gesamtmilcheiweiß werden besonders nach einer thermischen Vorbehandlung stärker durch Lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt.

Michon et al. (1999) berichteten, dass ein höherer Grad der Quervernetzung globulärer Proteine durch Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erreicht werden kann, wenn ihre Tertiärstruktur prä-enzymatisch durch chemisch-physikalische Verfahren entfaltet wird.

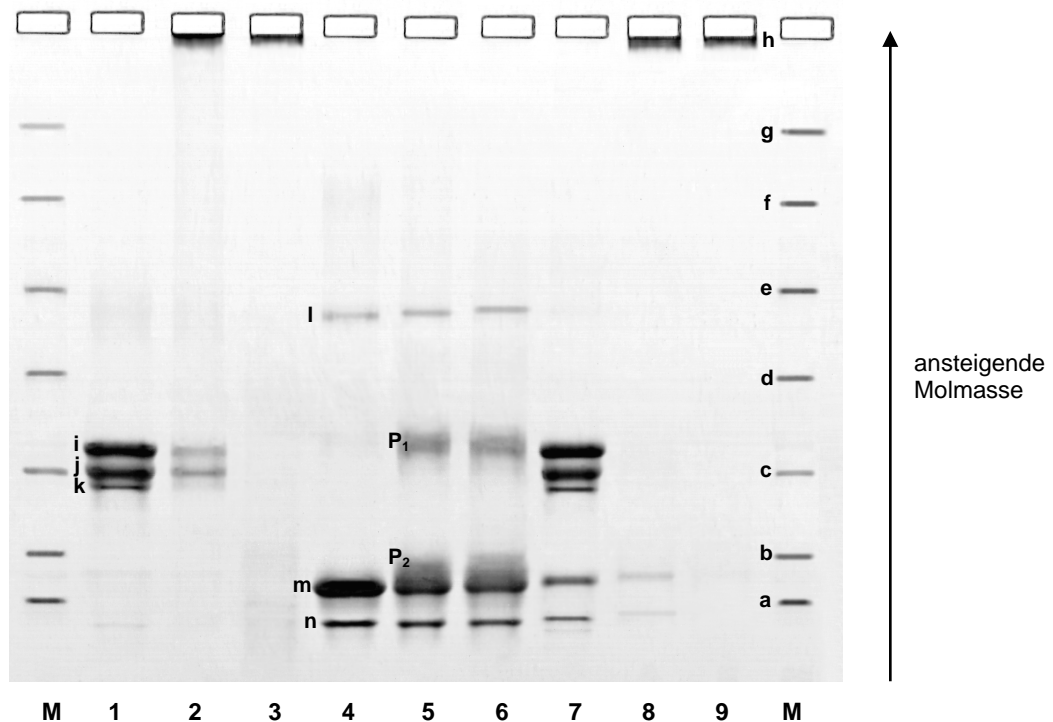
Für eine Anwendung von Peroxidase auf Getreideeiweiße gaben Tilley et al. (2001), Rodriguez-Mateos (2006) und Hanft und Köhler (2005) eine geringere Wirkung von Peroxidase in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure an.

#### 4.1.2. Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase

Milcheiweiß wurde in entmineralisiertem Wasser mit Laccase inkubiert und auf Veränderungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften untersucht.

Abbildung 4.4 stellt Veränderungen der Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase/Chlorogensäure dar, die durch SDS-PAGE ermittelt wurden. Anhand der Banden der Elektropherogramme von Molmassenstandards war eine Identifizierung von Molmassen in Proteinproben möglich. Eine Untersuchung von laccasebehandeltem Milcheiweiß durch Größenausschlusschromatographie konnte nicht durchgeführt werden, da die Reaktionsprodukte zur FPLC-Untersuchung nicht membranfiltriert werden konnten (Kap. 3.2.3.1.).

Abbildung 4.4 zeigt, dass Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase abgeschwächt werden und dass Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse gebildet werden.



**Abb. 4.4.** Elektropherogramme von unbehandeltem und von laccasebehandeltem<sup>1)</sup> Milcheiweiß

1 = NC; 2 = NC + PPO<sup>OT</sup>/CA; 3 = NC + PPO<sup>MT</sup>/CA; 4 = MPI; 5 = MPI + PPO<sup>OT</sup>/CA;  
6 = MPI + PPO<sup>MT</sup>/CA; 7 = MP; 8 = MP + PPO<sup>OT</sup>/CA; 9 = MP + PPO<sup>MT</sup>/CA; M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver,  
PPO<sup>OT</sup> = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, PPO<sup>MT</sup> = Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup>, CA = Chlorogensäure;  
a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein, j =  $\beta$ -Casein,  
k =  $\kappa$ -Casein, l = Serumalbumin, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin;  
P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> = Reaktionsprodukte aus Molkenproteinisolat

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase,  
0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu$ mol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.4, Banden „i“, „j“, „k“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.4, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden besonders durch Inkubation mit Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup> stark bis nahezu vollständig vermindert. Durch Inkubation von Natriumcaseinat und von Gesamtmilchprotein mit Laccase entstehen Reaktionsprodukte, die an der mit „h“ bezeichneten Trenngrenze ( $\geq 3 \times 10^5$  g/mol) des PAGE-Gels abgebildet sind. Durch enzymatische Modifizierung von Molkenproteinisolat entstehen im Wesentlichen Reaktionsprodukte, die in den Elektropherogrammen von laccasebehandeltem Molkenproteinisolat als „P<sub>1</sub>“ und „P<sub>2</sub>“ bezeichnet werden (Abb. 4.4, Elektropherogramm 5, Elektropherogramm 6).

Tabelle 4.5 zeigt einen Überblick über die prozentuale Molmassenverteilung von unbehandeltem und von laccasebehandeltem Milcheiweiß, die durch densitometrische PAGE-Auswertung quantifiziert werden konnte.

Eine Inkubation von Natriumcaseinat mit Laccase/Chlorogensäure führt zu einem Anstieg an Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.5). Besonders durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup> werden Reaktionsprodukte gebildet, die zu 74,0% - 82,3% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol bestehen. Durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> werden nur in Gegenwart von Chlorogensäure 50,2% Proteinpolymere  $> 2 \times 10^5$  g/mol gebildet (Tab. 4.5). Nach Tabelle A.1 wird  $\kappa$ -Casein quantitativ stärker durch Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> modifiziert als  $\alpha_S$ -Casein und  $\alpha_S$ -Casein stärker als  $\beta$ -Casein.

In der Literatur wurde ein Anstieg der Molmasse von Casein berichtet als Folge einer Inkubation von Casein mit Laccase (Shotaro 2002) oder als Folge einer Inkubation von Casein mit Tyrosinase (Hurrell et al. 1982, Halaouli et al. 2005).

In den eigenen Untersuchungen konnten keine Veränderungen der Molmassenverteilung von Natriumcaseinat durch Chlorogensäure in Abwesenheit von Laccase beobachtet werden (Tab. 4.5). Jöbstl et al. (2006) wiesen jedoch auch in Abwesenheit von Laccase nach, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Epigallocatechingallat und  $\beta$ -Casein ausgebildet werden.

Tabelle 4.5 stellt dar, dass Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Laccase/Chlorogensäure im Wesentlichen zu oligomeren Reaktionsprodukten mit Molmassen von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt wird. In Abbildung 4.4 werden die Reaktionsprodukte aus Molkenproteinisolat als „P<sub>1</sub>“ und „P<sub>2</sub>“ bezeichnet (Abb. 4.4, Elektropherogramm 5, Elektropherogramm 6). Bis zu 48,1% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol können in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat nachgewiesen werden (Tab. 4.5). Molkenproteinmonomere - ausgedrückt als Proteinfraction  $< 2 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.5) - werden durch Inkubation mit Laccase/Chlorogensäure von 85,9% in unbehandeltem Molkenproteinisolat auf bis zu 46,3% in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat vermindert. Nach Tabelle A.2 wird  $\beta$ -Lactoglobulin in Molkenproteinisolat quantitativ stärker durch Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> modifiziert als  $\alpha$ -Lactalbumin. Die Umsetzung von Molkenprotein durch Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> und durch Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup> unterscheidet sich nach Tabelle 4.5 quantitativ nicht. Die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat wird weder durch Laccase allein noch durch Chlorogensäure allein beeinflusst (Tab. 4.5).

**Tab. 4.5.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von unbehandeltem und von laccasebehandeltem Milcheiweiß

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfractionen [g/mol]		
	>2 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>	<2 x 10 <sup>4</sup>
NC	19,0	56,8	24,2
NC + CA <sup>2)</sup>	18,1	55,6	26,3
NC + PPO <sup>OT</sup> 2)	19,2	52,8	28,0
NC + PPO <sup>OT</sup> /CA <sup>2)</sup>	50,2	38,0	11,8
NC + PPO <sup>MT</sup> 2)	82,3	2,3	15,4
NC + PPO <sup>MT</sup> /CA <sup>2)</sup>	74,0	5,7	20,3
MPI	0,9	13,2	85,9
MPI + CA <sup>2)</sup>	0,1	10,2	89,7
MPI + PPO <sup>OT</sup> 2)	0,5	13,0	86,5
MPI + PPO <sup>OT</sup> /CA <sup>2)</sup>	5,6	48,1	46,3
MPI + PPO <sup>MT</sup> 2)	1,8	15,1	83,1
MPI + PPO <sup>MT</sup> /CA <sup>2)</sup>	5,5	47,9	46,6
MP	3,4	70,1	26,5
MP + CA <sup>2)</sup>	11,9	66,1	22,0
MP + PPO <sup>OT</sup> 2)	56,7	30,7	12,6
MP + PPO <sup>OT</sup> /CA <sup>2)</sup>	93,1	3,4	3,5
MP + PPO <sup>MT</sup> 2)	87,8	3,5	8,7
MP + PPO <sup>MT</sup> /CA <sup>2)</sup>	93,2	3,2	3,6
MPMM	0,2	71,4	28,4
MPMM + PPO <sup>OT</sup> /CA <sup>3)</sup>	62,6	25,2	12,2
MPRM	0,1	70,2	29,7
MPRM + PPO <sup>OT</sup> /CA <sup>3)</sup>	50,1	36,4	13,5

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, MPMM = Gesamtmilchprotein in unerhitzter Magermilch, MPRM = Gesamtmilchprotein in Rohmilch, PPO<sup>OT</sup> = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, PPO<sup>MT</sup> = Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup>, CA = Chlorogensäure

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase, 0,53 U/mg Milcheiweiß und/oder 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation mit Laccase, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

Færgemand et al. (1998a) und Shotaro (2002) wiesen die Bildung von Molkenprotein-oligomeren durch Laccase nach, Thalmann (2003) die Bildung von Molkenproteinpolymeren durch Tyrosinase.

Færgemand et al. (1998a) berichteten eine Proteinmodifizierung durch Laccase nur in Gegenwart von Chlorogensäure. Nach Thalmann (2003) wird α-Lactalbumin durch Tyrosinase auch in Abwesenheit von Kaffeesäure quervernetzt. Es wurde diskutiert, dass Tyrosinreste von α-Lactalbumin neben Kaffeesäure phenolische Substrate für Phenoloxidasen darstellen.

Nach Færgemand et al. (1998a) wird - abweichend von den vorliegenden Ergebnissen (Tab. A.2) - besonders  $\alpha$ -Lactalbumin durch Laccase umgesetzt. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass die Autoren höhere Konzentrationen an Chlorogensäure einsetzten und dass die Umsetzung von  $\alpha$ -Lactalbumin nach Tabelle A.4 mit der Konzentration an Chlorogensäure prozentual stärker ansteigt als die Umsetzung von  $\beta$ -Lactoglobulin.

Færgemand et al. (1998a) konnten keine Wechselwirkungen zwischen Molkenproteinmolekülen und Chlorogensäure in Abwesenheit von Laccase nachweisen. Seifert et al. (2004), Petzke et al. (2005), Rawel et al. (2002), Rawel et al. (2005), Prigent et al. (2003) und Prigent (2005) beschrieben jedoch zwischen Molkenprotein und Phenolen Wechselwirkungen, die die Tertiärstruktur des Proteins teilweise entfalten. Nach Rawel et al. (2005) verstärken sich die Wechselwirkungen zwischen Protein und Phenol mit steigendem pH-Wert bis hin zur Ausbildung kovalenter Bindungen.

Tabelle 4.5 zeigt, dass Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Laccase besonders stark umgesetzt wird. Die Reaktionsprodukte bestehen aus bis zu 93,2% Proteinpolymeren mit Molmassen  $>2 \times 10^5$  g/mol. Proteinmonomere und Proteinoligomere bis  $2 \times 10^5$  g/mol in Gesamtmilchprotein werden durch Inkubation mit Laccase/Chlorogensäure nahezu vollständig enzymatisch modifiziert (Tab. 4.5, Abb. 4.4). Nach densitometrischer PAGE-Auswertung werden Caseinmonomere quantitativ stärker umgesetzt als Molkenproteinmonomere (Tab. A.3). Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> und Laccase<sup>mit Tyrosinaseaktivität</sup> führen nach Tabelle 4.5 auch in Abwesenheit von Chlorogensäure zur Modifizierung der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein. In unerhitzter Magermilch und in Rohmilch werden durch Laccase/Chlorogensäure bis zu 62,6% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol gebildet.

Nach Tabelle 4.5 wird nur Gesamtmilchprotein, nicht Natriumcaseinat oder Molkenproteinisolat, auch in Abwesenheit von Chlorogensäure durch Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> modifiziert. Mattinen et al. (2006), Selinheimo et al. (2007) und Matheis und Whitaker (1984) bestätigten, dass es möglich ist, Aminosäureseitenketten von Protein auch in Abwesenheit phenolischer Substanzen durch Laccase zu modifizieren.

In der Literatur wird eine enzymatisch-induzierte Oxidation von Proteinen durch Phenoloxidasen mit unspezifischen Oxidationsreaktionen von Aminosäurenresten und der Bildung von Proteinoxidationsprodukten in Verbindung gebracht (Lantto et al. 2005, Matheis und Whitaker 1984, Hurrell et al. 1982). Da Proteinoxidationsprodukte als weitgehend stabil gegenüber einer Säurehydrolyse gelten (Jee et al. 2000, Hurrell et al. 1982), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase abgeleitet werden.

Tabelle 4.6 gibt einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem Milcheiweiß und in laccasebehandeltem Milcheiweiß. Tabelle 4.6 zeigt, dass durch Inkubation von Milcheiweiß mit Laccase Asparaginsäure, Threonin, Alanin, Methionin, Isoleucin, Leucin und Lysin modifiziert werden. Leucin wird um bis zu 47% umgesetzt, Isoleucin um bis zu 26% (Tab. 4.6). Asparaginsäure, Alanin und Lysin werden durch Inkubation von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilchprotein mit Laccase modifiziert (Tab. 4.6). In laccasebehandeltem Natriumcaseinat wurde 94% weniger Methionin nachgewiesen als in unbehandeltem Natriumcaseinat, in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat 12% weniger Threonin als in unbehandeltem Molkenprotein (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in laccasebehandeltem<sup>2)</sup> Milcheiweiß

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC	NC + PPO/CA	MPI	MPI + PPO/CA	MP	MP + PPO/CA
Asparaginsäure	6,34	6,54	<b>10,43</b>	<b>6,82</b>	<b>7,46</b>	<b>7,36</b>
Threonin	4,76	5,04	<b>5,71</b>	<b>5,03</b>	4,91	5,03
Alanin	4,01	4,07	<b>8,94</b>	<b>3,80</b>	<b>5,09</b>	<b>4,10</b>
Methionin	<b>3,28</b>	<b>0,21</b>	3,26	3,14	2,61	2,81
Isoleucin	<b>4,61</b>	<b>3,42</b>	<b>5,33</b>	<b>4,64</b>	<b>4,67</b>	<b>4,55</b>
Leucin	<b>9,83</b>	<b>5,24</b>	<b>14,28</b>	<b>9,63</b>	<b>11,04</b>	<b>10,43</b>
Lysin	6,84	7,09	<b>9,53</b>	<b>6,42</b>	<b>7,94</b>	<b>7,07</b>
Tyrosin	4,52	4,51	2,46	2,44	3,49	3,45

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, PPO/CA = Laccase/Chlorogensäure

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

In Abhängigkeit vom Substrat werden durch Laccase verschiedene Aminosäurenreste modifiziert (Tab. 4.6). Nach Færgemand et al. (1998a) und Mattinen et al. (2005) wird die Umsetzung von Aminosäurenresten durch Laccase bestimmt durch die Konzentration, die sterische Verfügbarkeit und die Oxidationsempfindlichkeit der Aminosäurenreste im Proteinmolekül. Nach Dean et al. (1997), Matheis und Whitaker (1984), Davies (1987) und Davies et al. (1987a) werden die Aminosäurenreste Tyrosin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Methionin, Cystein, Tryptophan und Phenylalanin in Protein besonders leicht oxidiert.

Tabelle 4.6 zeigt, dass Leucin und Isoleucin in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein umgesetzt werden. Hurrell et al. (1982) beobachteten nur eine geringfügige Modifizierung von Leucin und von Isoleucin in tyrosinasebehandeltem Casein.

Eine Umsetzung von Lysinresten (Lantto et al. 2005, Lantto et al. 2007b, Matheis und Whitaker 1984, Petzke et al. 2005, Rawel et al. 2002, Prigent 2005, Hurrell et al. 1982), von Histidinresten (Matheis und Whitaker 1984, Shotaro 2002, Prigent 2005, Hurrell et al. 1982), von Resten schwefelhaltiger Aminosäuren (Lantto et al. 2005, Lantto et al. 2007b, Shotaro 2002, Petzke et al. 2005, Rawel et al. 2002, Mattinen et al. 2006, Matheis und Whitaker 1984, Hurrell et al. 1982), von Tryptophanresten (Matheis und Whitaker 1984, Petzke et al. 2005, Rawel et al. 2002, Prigent 2005, Mattinen et al. 2006, Hurrell et al. 1982) und von Phenylalaninresten (Hurrell et al. 1982) wurde in der Literatur nachgewiesen für eine Modifizierung von Protein mit Phenoloxidasen oder aber eine chemisch-physikalische Wechselwirkung von Protein- und Phenolmolekülen.

Eine Oxidation von Tyrosinresten durch Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> kann nach Tabelle 4.6 nicht beobachtet werden. Als Ursache muss diskutiert werden, dass Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> in Gegenwart von Chlorogensäure zur Modifizierung von Milcheiweiß eingesetzt wurde. Nach



Færgemand et al. (1998a) ist Chlorogensäure das bevorzugte Substrat von Laccase im Vergleich zu aromatischen Ringsystemen von Aminosäureseitenketten (von zum Beispiel Tyrosin) in Proteinmolekülen. Lantto et al. (2005), Lantto et al. (2007b), Jee et al. (2000) und Mattinen et al. (2006) konnten eine Umsetzung von Tyrosin durch Phenoloxidasen nachweisen. Prigent (2005) berichtete über eine Abnahme an Tyrosin durch nicht-enzymatisch ausgebildete Protein/Phenol-Wechselwirkungen. Mattinen et al. (2005) wiesen in laccasebehandeltem Muskelfaserprotein Isodityrosin nach, dass durch unterschiedliche Bindungspositionen an den aromatischen Ringen der Tyrosinreste verbunden war.

Tabelle 4.7 gibt zusätzlich zu Tabelle 4.6 an, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase um bis zu 230% ansteigt, dass der Gehalt an Sulfhydrylgruppen jedoch um bis zu 70% vermindert wird.

Ein geringerer Gehalt an Sulfhydrylgruppen (Tab. 4.7) wie auch eine Umsetzung von Methionin (Tab. 4.6) korrespondieren mit einer enzymatisch-induzierten Oxidation von Seitenketten schwefelhaltiger Aminosäuren (Lantto et al. 2005, Shotaro 2002, Mattinen et al. 2005, Matheis und Whitaker 1984). Disulfidbrückenbindungen und weitere heterogen zusammengesetzte Reaktionsprodukte oxidiertes Seitenketten von schwefelhaltigen Aminosäuren (Lantto et al. 2007b) werden ausgebildet.

Nach Matheis und Whitaker (1984) werden durch Inkubation mit Phenoloxidasen neben Sulfhydrylgruppen auch Aminogruppen in Proteinen umgesetzt. Es ist wahrscheinlich, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase nach Tabelle 4.7 durch eine Entfaltung der Tertiärstruktur von Milcheiweißmolekülen ansteigt. Eine Entfaltung von Proteinmolekülen wird als Folge einer enzymatisch-induzierten Oxidation von Protein (Davies und Delsignore 1987) diskutiert oder als Folge einer sterischen Entfaltung der Tertiärstruktur von Protein durch die Bindung von Molekülen phenolischer Substanzen (Barbeau und Kinsella 1985) an Aminosäureseitenketten. Claus (2004) und Lantto et al. (2005) beschrieben auch eine spontane Fragmentierung von Proteinmolekülen durch Laccase.

**Tab. 4.7.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in laccasebehandeltem<sup>1)</sup> Milcheiweiß

	Gehalt der Lösung an	
	löslichem Aminostickstoff [µg/mg Protein]	SH-Gruppen [µmol/g Protein]
NC	4,07 ± 0,07	0,33 ± 0,01
NC+ PPO/CA	13,33 ± 0,45	0,11 ± 0,01
MPI	12,24 ± 0,35	2,10 ± 0,03
MPI + PPO/CA	14,71 ± 0,39	1,56 ± 0,02
MP	8,36 ± 0,26	0,44 ± 0,01
MP+ PPO/CA	12,20 ± 0,21	0,13 ± 0,01

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, PPO/CA = Laccase/Chlorogensäure

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

#### 4.1.2.1. Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Laccase

Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde über 24 Stunden bei 40°C und pH 7,0 mit 0,53 U Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure inkubiert (Kap. 3.2.1.1.). Ausgehend von diesen Inkubationsbedingungen wurden jeweils einzelne Bedingungen variiert, um die optimalen Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Laccase zu ermitteln. Tabelle 4.8 gibt einen Überblick über die Inkubationsbedingungen, unter denen durch Laccase/Chlorogensäure der höchste Umsatz an Proteinmonomeren in Milcheiweiß ermittelt werden konnte.

**Tab. 4.8.** Optimale Inkubationsbedingungen<sup>1)</sup> von Milcheiweiß mit Laccase

		Inkubationsbedingungen		
		NC	MPI	MP
Proteinkonzentration [%]	[1...10]	≤5	5	≤5
CA/Substrat [µmol/mg]	[0,00...0,08]	0,08	0,08	0,02
Enzymaktivität/Substrat [U/mg]	[0,011...0,530]	0,011	0,011	0,011
Inkubationstemperatur [°C]	[5...50]	40 - 50	40 - 50	40 - 50
Inkubationszeit [h]	[0...24]	16	1	1
pH-Wert	[pH 4...pH 12]	pH 4	pH 4 - pH 5	pH 4 - pH 7

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, CA = Chlorogensäure

<sup>1)</sup> ermittelt densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

#### Proteinkonzentration

Milcheiweiß wurde unter den gegebenen Bedingungen bei einer Proteinkonzentration von ≤5% am stärksten durch Laccase modifiziert (Tab. 4.8, Abb. A.5A).

In der Literatur wurde für Arbeiten mit Laccase ≤10% Protein eingesetzt (Færgemand et al. 1998a, Lantto et al. 2005, Shotaro 2002, Mattinen et al. 2005). Thalmann (2003) und Jee et al. (2000) modifizierten Protein mit Tyrosinase bei ≤1% Protein.

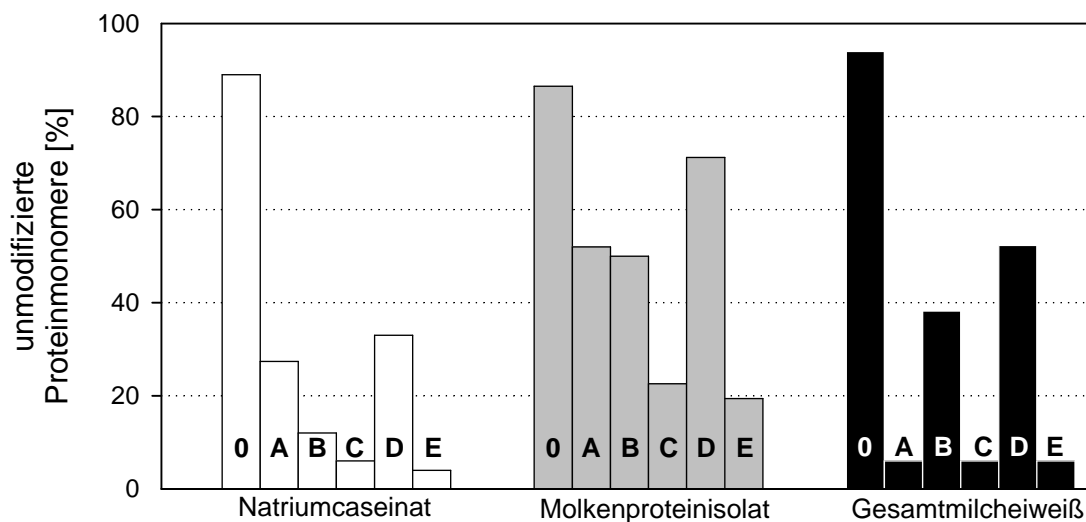
#### Chlorogensäurekonzentration

Die optimale Konzentration an Chlorogensäure zur Modifizierung von Gesamtmilchprotein durch Laccase beträgt unter den gegebenen Bedingungen 0,02 µmol/mg Milcheiweiß (Tab. 4.8). Nach Tabelle 4.5 wird Gesamtmilchprotein auch in Abwesenheit von Chlorogensäure durch Laccase modifiziert. Die Umsetzung von Natriumcaseinat und von Molkenproteinisolat steigt nach Abbildung A.5B im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,00 µmol - 0,08 µmol Chlorogensäure/mg Milcheiweiß an.

Thalmann (2003) und Hurrell et al. (1982) arbeiteten mit vergleichbaren Konzentrationen an Kaffeesäure. Færgemand et al. (1998a) setzten zur enzymatischen Modifizierung von Molkenprotein mit Laccase eine um den Faktor 10 höhere Chlorogensäurekonzentration ein. Nach Hurrell et al. (1982) steigt der Grad einer Quervernetzung von Protein mit der Konzentration an Kaffeesäure. Thalmann (2003) und Færgemand et al. (1998a) ermittelten, dass eine hohe Konzentration an Chlorogensäure oder an Kaffeesäure zu einem geringen Grad der enzymatischen Quervernetzung von Protein führt. Proteinbindungsstellen werden mit Phenolmolekülen abgesättigt und es entstehen weniger intermolekulare Protein/Protein-Wechselwirkungen (Thalmann 2003).

### Phenolische Substrate

Ausgehend von Chlorogensäure als dem phenolischen Substrat der Laccase wurde untersucht, ob auch Phenolsubstanzen aus Pflanzenextrakten zur enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß eingesetzt werden können. Abbildung 4.5 stellt die quantitative Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch Laccase in Abhängigkeit von der Phenolquelle dar. Abbildung 4.5 zeigt, dass Proteinmonomere sowohl durch Chlorogensäure als auch durch Phenolsubstanzen aus Blaubeer-, Grüntee-, Johannisbeer- und Weinextrakt durch Laccase modifiziert werden.



**Abb. 4.5.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Phenolquelle<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol phenolische Substanzen, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> unmodifiziertes Milcheiweiß (0), Milcheiweiß mit Laccase/Chlorogensäure (A), Milcheiweiß mit Laccase/Blaubeerextrakt (B), Milcheiweiß mit Laccase/Grünteeextrakt (C), Milcheiweiß mit Laccase/Johannisbeerextrakt (D), Milcheiweiß mit Laccase/Weinextrakt (E)

Die stärkste Umsetzung von Milcheiweiß durch Laccase ist für Phenole aus Grüntee- und Weinextrakt abgebildet (Abb. 4.5). Natriumcaseinat und Molkenproteinisolat werden in Gegenwart von Phenolsubstanzen aus Blaubeer-, Grüntee- und Weinextrakt prozentual stärker durch Laccase modifiziert als in Gegenwart von Chlorogensäure (Abb. 4.5).

Nach Shotaro (2002) können Hydrochinon, Catechol, Guaiacol, Ferulasäure, Vanillinsäure, p-Cumarsäure, Syringaldehyd und p-Phenylendiamin als Phenolquellen der Laccase eingesetzt werden, nach Heimdal et al. (1997) Chlorogensäure und Epicatechin.

### **Enzym/Substrat-Verhältnis**

Der Grad der Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase unterscheidet sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,011 U - 0,530 U Laccase/mg Milcheiweiß nicht wesentlich (Abb. A.5C). Die Enzymaktivität wurde daher für weitergehende Untersuchungen (Kap. 4.1.5. - 4.1.7.) auf 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß festgelegt (Tab. 4.8).

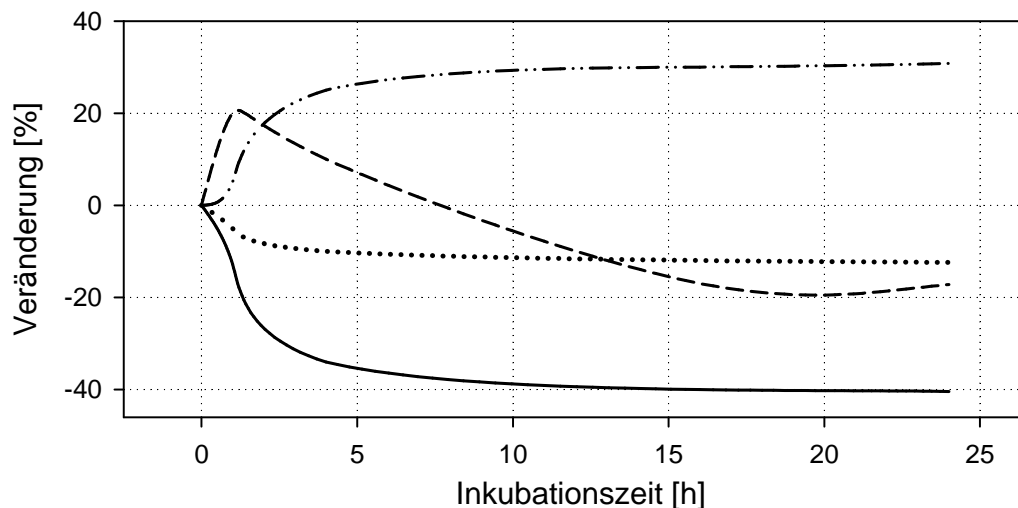
Shotaro (2002), Færgemand et al. (1998a), Lantto et al. (2005) und Mattinen et al. (2005) setzten zur Modifizierung von Protein <1 U Laccase/mg Substratprotein ein. Thalmann (2003) inkubierte Molkenprotein mit 220 U Tyrosinase/mg Substratprotein.

### **Inkubationszeit**

Die Umsetzung einzelner Molmassenfraktionen von Milcheiweiß durch Laccase/Chlorogensäure wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erfasst und ist in Abbildung 4.6 am Beispiel von Natriumcaseinat dargestellt.

Abbildung 4.6 zeigt, dass Caseinmonomere in Natriumcaseinat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit exponentiell vermindert werden. Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol können ab einer Inkubationszeit von 1 Stunde nachgewiesen werden. Die Bildung von Caseinpolymeren ist im Wesentlichen nach 6-stündiger Inkubation mit Laccase abgeschlossen. Proteinoligomere mit Molmassen von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol treten als Intermediate der enzymatischen Reaktion innerhalb der ersten 7 Stunden Inkubationszeit auf. Nach Abbildung 4.6 ist die enzymatische Umsetzung von Natriumcaseinat nach 16 Stunden Inkubationszeit mit Laccase abgeschlossen. In Bezug auf die Inkubation von Molkenproteinisolat und von Gesamtmilcheiweiß mit Laccase wurde festgestellt, dass die enzymatische Reaktion nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 Stunden im Wesentlichen abgeschlossen ist. (Abb. A.6, Abb. A.7).

Nach Shotaro (2002) können die ersten Reaktionsprodukte der Laccase nach einer Inkubationszeit von 10 Sekunden nachgewiesen werden. Eine vollständige Vernetzung von Protein durch Tyrosinase wird nach Thalmann (2003) und Jee et al. (2000) innerhalb von 3 - 4 Stunden erreicht. Vernetzungsreaktionen von Proteinen durch Phenoloxidasen (Hurrel et al. 1982, Thalmann 2003) sind nach 24 - 48 Stunden abgeschlossen (Shotaro 2002, Lantto et al. 2005, Mattinen et al. 2005, Færgemand et al. 1998a).



**Abb. 4.6.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Laccase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Caseinmonomere (—), Molmasse  $< 2 \times 10^4$  g/mol (....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu\text{mol}$  Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

### Inkubationstemperatur

Milcheiweiß wird unter den gegebenen Bedingungen bei Inkubationstemperaturen von 5°C - 50°C durch Laccase umgesetzt (Abb. A.5D), am stärksten bei Inkubationstemperaturen von 40°C - 50°C (Tab. 4.8, Abb. A.5D).

Shotaro (2002) und Heimdal et al. (1997) wiesen eine Quervernetzung von Proteinmolekülen durch Phenoloxidasen bei Inkubationstemperaturen von 5°C - 80°C nach. Zur enzymatischen Modifizierung von Protein durch Phenoloxidasen wurden Inkubationstemperaturen von 20°C - 60°C eingesetzt (Mattinen et al. 2005, Shotaro 2002, Thalmann 2003, Færgemand et al. 1998a, Lantto et al. 2005, Halaouli et al. 2005, Jee et al. 2000, Heimdal et al. 1997, Hurrell et al. 1982).

### pH-Wert

Die stärkste Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase wurde unter den gegebenen Bedingungen bei pH 4 bis pH 5 erzielt (Tab. 4.8, Abb. A.5E). pH-Werte um pH 5 entsprechen dem pH-Optimum von Phenoloxidasen (Heimdal et al. 1997) und wurden durch Heimdal et al. (1997), Thalmann (2003), Figueroa-Espinoza und Rouau (1999), Norsker et al. (2000) und Mattinen et al. (2005) zur enzymatischen Modifizierung von Eiweiß gewählt. Færgemand et al. (1998a), Halaouli et al. 2005, Hurrell et al. (1982), Lantto et al. (2005) und Jee et al. (2000) inkubierten Protein mit Phenoloxidasen um pH 7. Shotaro (2002) berichtete, dass Laccase Protein bei pH 2 bis pH 10 umsetzen kann.

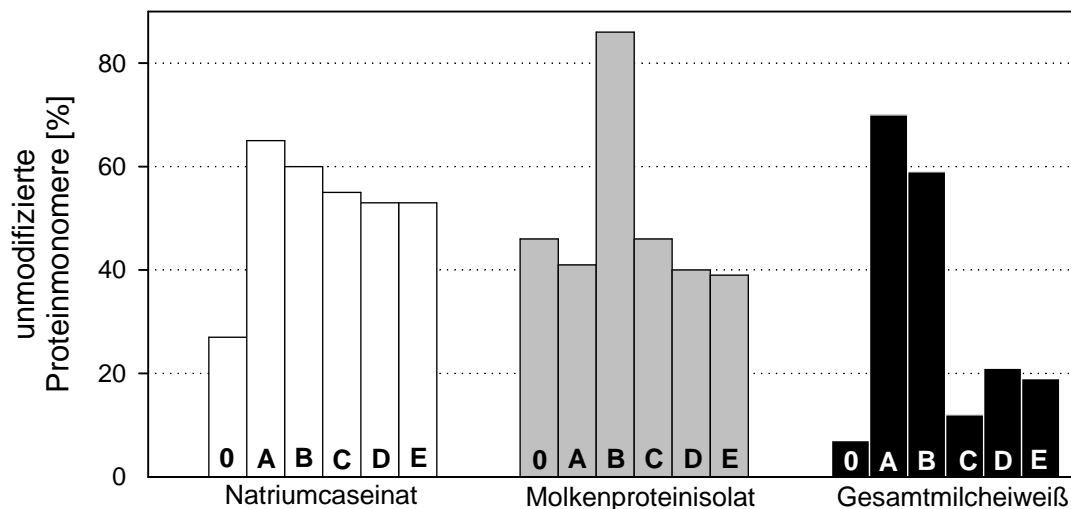
Hohe Grade der Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase konnten auch für eine Inkubation bei pH-Werten von  $\text{pH} \geq 8$  erzielt werden (Abb. A.5E). In diesem pH-Bereich überschneidet sich die enzymatisch-induzierte Quervernetzung durch Laccase mit einer chemisch-physikalischen Quervernetzungsreaktion durch den alkalischen pH-Wert (Færgemand et al. 1998a).

Neben dem pH-Wert wurde für Puffersysteme berichtet (Hiller und Lorenzen 2008), dass Phosphatpuffer - der in verschiedenen Studien für Arbeiten mit Laccase verwendet wurde - eine enzymatische Quervernetzung von Milcheiweiß vortäuschen kann.

### Proteinvorbehandlung

Milcheiweiß wurde mit Ascorbinsäure, Cystein, Cystin und Hitze chemisch-physikalisch modifiziert und anschließend mit Laccase inkubiert. Abbildung 4.7 stellt dar, wie sich eine chemisch-physikalische Vorbehandlung auf die enzymatische Umsetzung von Proteinmonomeren durch Laccase auswirkt.

Abbildung 4.7 zeigt, dass die enzymatische Modifizierung von Natriumcaseinat und von Gesamtmilcheiweiß durch chemisch-physikalische Vorbehandlung im Wesentlichen negativ beeinflusst wird.



**Abb. 4.7.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu\text{mol}$  Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> ohne Vorbehandlung (0), Vorbehandlung mit 0,05 mg Ascorbinsäure/mg Protein (A), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystein/mg Protein (B), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystin/mg Protein (C), thermische Vorbehandlung (80°C, 10 min) (D), thermische Vorbehandlung (80°C, 20 min) (E)

Die enzymatische Umsetzung von Molkenproteinmonomeren kann nach Abbildung 4.7 tendenziell durch Erhitzung und durch eine Modifizierung mit Ascorbinsäure gesteigert werden. Es ist anzunehmen, dass die globuläre Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen (Walstra et al. 2006) durch eine prä-enzymatische Behandlung mit Ascorbinsäure oder mit Hitze teilweise chemisch-physikalisch entfaltet wird. Dabei erhöht sich potenziell die Verfügbarkeit von Aminosäureseitenketten in Molkenproteinisolat, die durch Laccase modifiziert werden können.

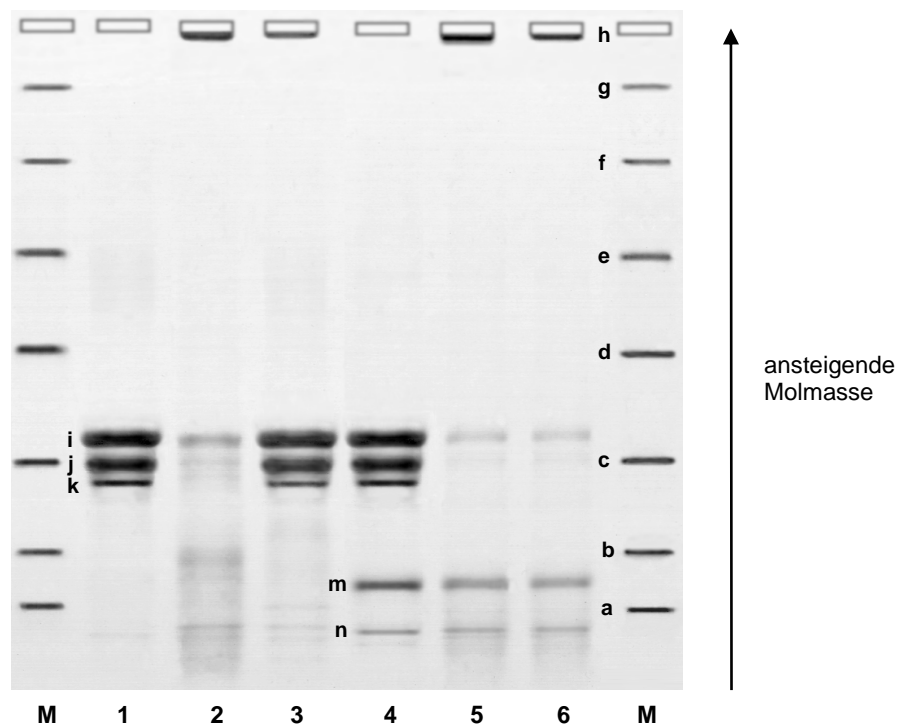
Rojas-Graü et al. (2006) und Eidwin et al. (2006) wiesen nach, dass enzymatische Bräunungsreaktionen in Lebensmitteln durch die Reduktionsmittel N-Acetylcystein, Sulfit, Resorcinol, Cystein, Glutathion und Ascorbinsäure gehemmt werden.

#### 4.1.3. Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase

Milcheiweiß wurde in entmineralisiertem Wasser mit Glucoseoxidase inkubiert und auf Veränderungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften untersucht.

Abbildung 4.8 stellt Veränderungen der Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase dar, die durch SDS-PAGE ermittelt wurden. Anhand der Banden der Elektropherogramme von Molmassenstandards ist eine Identifizierung von Molmassen in Proteinproben möglich. Eine Untersuchung von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß durch Größenausschlusschromatographie konnte nicht durchgeführt werden, da die Reaktionsprodukte zur FPLC-Untersuchung nicht membranfiltriert werden konnten (Kap. 3.2.3.1.).

Abbildung 4.8 zeigt, dass Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase abgeschwächt werden und dass Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse gebildet werden.



**Abb. 4.8.** Elektropherogramme von unbehandeltem und von glucoseoxidasebehandeltem<sup>1)</sup> Milcheiweiß

1 = NC; 2 = NC + GOX<sup>GC</sup>; 3 = NC + GOX<sup>SC</sup>; 4 = MP; 5 = MP + GOX<sup>GC</sup>; 6 = MP + GOX<sup>SC</sup>;  
M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, GOX<sup>GC</sup> = Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, GOX<sup>SC</sup> = Glucoseoxidase mit starker Catalaseaktivität,  
a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha_S$ -Casein, j =  $\beta$ -Casein,  
k =  $\kappa$ -Casein, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0



Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.8, Banden „i“, „j“, „k“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.8, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden besonders durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> stark vermindert. Es werden Reaktionsprodukte an der mit „h“ bezeichneten Trenngrenze ( $\geq 3 \times 10^5$  g/mol) des PAGE-Gels synthetisiert (Abb. 4.8). Zusätzlich ist für Reaktionsprodukte aus Natriumcaseinat dargestellt, dass durch Inkubation mit Glucoseoxidase auch Reaktionsprodukte mit Molmassen unterhalb der Monomerenbanden (Abb. 4.8, Banden „i“, „j“, „k“) im Bereich von Molmassenstandard „a“ ( $1,4 \times 10^4$  g/mol) und „b“ ( $2 \times 10^4$  g/mol) gebildet werden.

Tabelle 4.9 zeigt einen Überblick über die prozentuale Molmassenverteilung von unbehandeltem und von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß, die durch densitometrische PAGE-Auswertung quantifiziert werden konnte.

Durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Glucoseoxidase werden Reaktionsprodukte gebildet, die zu 24,4% - 36,1% aus Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol bestehen (Tab. 4.9). Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> bildet prozentual mehr Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol als Glucoseoxidase<sup>mit starker Catalaseaktivität</sup>. Nach Tabelle A.1 wird  $\beta$ -Casein quantitativ stärker durch Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> modifiziert als  $\kappa$ -Casein und  $\kappa$ -Casein stärker als  $\alpha_S$ -Casein.

**Tab. 4.9.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von unbehandeltem und von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfaktionen [g/mol]		
	$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC	19,0	56,8	24,2
NC + GOX <sup>GC 2)</sup>	36,1	19,7	44,2
NC + GOX <sup>SC 2)</sup>	24,4	49,5	26,1
MPI	0,9	13,2	85,9
MPI + GOX <sup>GC 2)</sup>	0,3	10,1	89,6
MPI + GOX <sup>SC 2)</sup>	0,6	11,7	87,7
MP	3,4	70,1	26,5
MP + GOX <sup>GC 2)</sup>	50,6	15,6	33,8
MP + GOX <sup>SC 2)</sup>	52,9	15,2	31,9
MPMM	0,2	71,4	28,4
MPMM + GOX <sup>GC 3)</sup>	43,6	22,4	34,0
MPRM	0,1	70,2	29,7
MPRM + GOX <sup>GC 3)</sup>	43,0	23,1	33,9

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, MPMM = Gesamtmilchprotein in unerhitzter Magermilch, MPRM = Gesamtmilchprotein in Rohmilch, GOX<sup>GC</sup> = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, GOX<sup>SC</sup> = Glucoseoxidase<sup>mit starker Catalaseaktivität</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation mit Glucoseoxidase, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

Die Inkubation von Natriumcaseinat mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> führt im Vergleich zur Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit starker Catalaseaktivität</sup> zu einem höheren Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren, zu einer quantitativ stärkeren Synthese von Caseinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol und zu einer Bildung von Protein mit Molmassen  $<2 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.9). Protein  $<2 \times 10^4$  g/mol wird vermutlich durch eine enzymatisch-induzierte Fragmentierung von Proteinmolekülen gebildet (Dean et al. 1997, Davies 1987).

Die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat wird nach Tabelle 4.9 weder durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> noch durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit starker Catalaseaktivität</sup> wesentlich verändert.

Gesamtmilchprotein wird durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> oder mit Glucoseoxidase<sup>mit starker Catalaseaktivität</sup> zu Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt. Der Anteil von Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol am Gesamtprotein steigt auf bis zu 52,9% an (Tab. 4.9). Durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> werden Caseinmonomere in Gesamtmilchprotein von 76,2% in unbehandeltem Protein auf 10,1% in glucoseoxidase-behandeltem Protein vermindert, Molkenproteinmonomere von 17,6% in unbehandeltem Protein auf 12,3% in glucoseoxidasebehandeltem Protein (Tab. A.3). Gesamtmilchprotein in Rohmilch und in Magermilch wird durch Inkubation mit Glucoseoxidase zu ~43% Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt (Tab. 4.9).

Eine Modifizierung der Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase wurde in der Literatur bisher nicht berichtet. Die Ausbildung von Proteinpolymeren durch Isodityrosin-, Disulfid- und Protein/Arabinosylan-Quervernetzung wurde nur für Gluten (Bonet et al. 2006, Primo-Martin et al. 2003, Dunnewind et al. 2002, Polusen und Bak Hostrup 1998), Albumine und Globuline (Vernulapalli et al. 1998, Rosell et al. 2003, Rasiah et al. 2005) aus Getreideeiweiß nachgewiesen.

Molkenproteinisolat ist - anders als Natriumcaseinat und Gesamtmilchprotein - nach Tabelle 4.9 als Substrat der Glucoseoxidase ungeeignet. Montgomery (1986) beschrieb, dass Zuckerstoffe in rekonstituiertem Milchpulver durch Glucoseoxidase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Wu und Monnier (2003) ermittelten, dass Hexoseoxidasen proteingebundene Zuckermoleküle umsetzen können. Natriumcaseinat und Gesamtmilchprotein enthalten in der  $\kappa$ -Casein-Fraktion proteingebundene Zuckerstoffe wie Glucose, Galactose und N-Acetyl-Glucosamin (Walstra et al. 2006), die potenzielle Substrate für Glucoseoxidase darstellen könnten.

In der Literatur wird eine enzymatisch-induzierte Oxidation von Proteinen mit unspezifischen Oxidationsreaktionen von Aminosäurenresten und der Bildung von Proteinoxidationsprodukten wie Dityrosin in Verbindung gebracht (Tilley et al. 2001, Haarasilta und Pullinen 1992, Schooneveld-Bergmans et al. 1999). Da Proteinoxidationsprodukte als weitgehend stabil gegenüber einer Säurehydrolyse gelten (Aeschbach et al. 1976, Hanft und Köhler 2005), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten in Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase abgeleitet werden.

Tabelle 4.10 gibt den Gehalt an Aminosäuren in unbehandeltem Milcheiweiß und in glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß an. Tabelle 4.10 zeigt, dass Glutaminsäure, Alanin,

Methionin, Leucin und Lysin in Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase modifiziert werden. In glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß werden nach Tabelle 4.10 bis zu 7% weniger Glutaminsäure, bis zu 27% weniger Alanin, bis zu 20% weniger Leucin und bis zu 11% weniger Lysin nachgewiesen. Durch Inkubation mit Glucoseoxidase sinkt der Gehalt an Methionin in Natriumcaseinat und in Molkenproteinisolat um bis zu 24% ab (Tab. 4.10).

Die Tabellen 4.9 und 4.10 zeigen, dass die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat durch Glucoseoxidase nicht verändert wird, dass aber dennoch eine Modifizierung von Aminosäuren nachgewiesen werden kann. Es ist anzunehmen, dass Glucoseoxidase im Wesentlichen zu intramolekularen Modifizierungsreaktionen von Aminosäureseitenketten in Molkenproteinisolat führt.

**Tab. 4.10.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in glucoseoxidasebehandeltem<sup>2)</sup> Milcheiweiß

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC	NC + GOX	MPI	MPI + GOX	MP	MP + GOX
Asparaginsäure	6,34	6,36	10,43	10,36	7,46	7,28
Serin	6,60	6,45	4,56	4,25	6,14	6,11
Glutaminsäure	<b>20,30</b>	<b>19,52</b>	<b>17,24</b>	<b>16,57</b>	<b>19,96</b>	<b>18,60</b>
Alanin	<b>4,01</b>	<b>3,23</b>	<b>8,94</b>	<b>6,57</b>	<b>5,09</b>	<b>3,73</b>
Methionin	<b>3,28</b>	<b>2,61</b>	<b>3,26</b>	<b>2,49</b>	2,61	2,70
Leucin	<b>9,83</b>	<b>8,73</b>	<b>14,28</b>	<b>12,71</b>	<b>11,04</b>	<b>9,04</b>
Tyrosin	4,52	4,53	2,46	2,50	3,49	3,44
Lysin	<b>6,84</b>	<b>6,30</b>	<b>9,53</b>	<b>9,29</b>	<b>7,94</b>	<b>7,06</b>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, GOX = Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

Ergänzend zu Tabelle 4.10 gibt Tabelle 4.11 den Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß an. Tabelle 4.11 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase nicht wesentlich verändert wird. Der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß steigt durch Inkubation mit Glucoseoxidase tendenziell an (Tab. 4.11).

Die Ergebnisse zeigen, dass Alanin, Leucin, Lysin, Glutaminsäure und weitere Aminosäuren in Abhängigkeit vom Substrat, das mit Glucoseoxidase inkubiert wird, umgesetzt werden.

Die Umsetzung von Aminosäurenresten durch enzymatisch-induzierte Oxidation ist nach Matheis und Whitaker (1984) abhängig von der Verfügbarkeit und der Oxidationsempfindlichkeit

von Aminosäurenresten in Substratmolekülen. Dean et al. (1997), Davies (1987) und Davies et al. (1987a) stellten fest, dass besonders die Aminosäurenreste Tyrosin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Methionin, Cystein, Tryptophan und Phenylalanin durch Oxidationsreaktionen umgesetzt werden.

Der Gehalt an Tyrosin in Milcheiweiß wird in den vorliegenden Untersuchungen durch Inkubation mit Glucoseoxidase nicht beeinflusst (Tab. 4.10). Eine Umsetzung von Tyrosin in Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase wurde durch Tilley et al. (2001), Haarasilta und Pullinen (1992), Schooneveld-Bergmans et al. (1999) und Bonet et al. (2006) nachgewiesen. Schooneveld-Bergmans et al. (1999) wiesen Isodityrosin nach, das durch verschiedene Bindungspositionen an den aromatischen Ringen der Tyrosinreste verknüpft ist. Hanft und Köhler (2006) konnten die Bildung von Isodityrosin in Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase jedoch nur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid beobachten.

Davies (1987) konnte neben einer Bildung von Isodityrosin auch eine Verminderung an Tryptophan um bis zu 70% in Blutserumalbumin und um bis zu 30% in  $\alpha_S$ -Casein durch Oxidation nachweisen.

Eine Abnahme an Methionin (Tab. 4.10) und tendenziell an SH-Gruppen (Tab. 4.11) in Milcheiweiß korrespondiert mit der durch Primo-Martin et al. (2005), Schooneveld-Bergmans et al. (1999), Vernullapalli und Hosney (1998), Poulsen und Bak Høstrup (1998), Bonet et al. (2006), Marin et al. (2005) und Dean et al. (1997) beschriebenen Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren und der Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen. Thomas und Aune (1977) gaben an, dass 1 mol Wasserstoffperoxid 1 mol SH-Gruppen in Blutserumalbumin oder in  $\beta$ -Lactoglobulin oxidiert. Hanft und Köhler (2006) konnten die Bildung von Disulfid in Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase nur in Gegenwart hoher Konzentrationen an Wasserstoffperoxid nachweisen.

**Tab. 4.11.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff und an Sulfhydrylgruppen in unbehandeltem und in glucoseoxidasebehandeltem<sup>1)</sup> Milcheiweiß

	Gehalt der Lösung an	
	löslichem Aminostickstoff [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]	SH-Gruppen [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ Protein]
NC	4,07 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,01
NC + GOX	6,54 $\pm$ 0,38	0,32 $\pm$ 0,01
MPI	12,24 $\pm$ 0,35	2,10 $\pm$ 0,03
MPI + GOX	12,65 $\pm$ 0,39	2,08 $\pm$ 0,03
MP	8,36 $\pm$ 0,26	0,44 $\pm$ 0,01
MP + GOX	10,64 $\pm$ 0,22	0,42 $\pm$ 0,01

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, GOX = Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

Es ist wahrscheinlich, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß (Tab. 4.11) als Folge einer teilweisen Entfaltung der Proteinstruktur (Davies und Delsignore 1987) durch enzymatisch-induzierte Oxidationsreaktionen ansteigt. Auch eine enzymatisch-induzierte Fragmentierung (Dean et al. 1997) von Milcheiweiß kann dazu führen, dass beispielsweise Peptidbindungen in Proteinmolekülen gespalten werden und so der Gehalt an löslichem Aminostickstoff ansteigt.

#### 4.1.3.1. Optimierung der Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase

Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) wurde über 24 Stunden bei 40°C und pH 7,0 mit 0,5 U Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>/mg Milcheiweiß inkubiert (Kap. 3.2.1.1.). Ausgehend von diesen Inkubationsbedingungen wurden jeweils einzelne Bedingungen variiert, um die optimalen Inkubationsbedingungen von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase zu ermitteln. Tabelle 4.12 gibt einen Überblick über die Inkubationsbedingungen, unter denen durch Glucoseoxidase der höchste Umsatz an Proteinmonomeren in Milcheiweiß ermittelt werden konnte.

Da die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat im Wesentlichen nicht durch Glucoseoxidase beeinflusst wurde, werden im Folgenden die Ergebnisse diskutiert, die für Natriumcaseinat und für Gesamtmilchprotein ermittelt wurden.

**Tab 4.12.** Optimale Inkubationsbedingungen<sup>1)</sup> von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase

		Inkubationsbedingungen		
		NC	MPI	MP
Proteinkonzentration [%]	[1...10]	1	-	1
Glucose/Protein [mg/mg]	[0...10]	>3	-	0
Enzymaktivität/Substrat [U/mg]	[0,01...0,50]	≥0,50	-	0,01
Inkubationstemperatur [°C]	[20...50]	40	-	40
Inkubationszeit [h]	[0...24]	16	-	16
pH-Wert	[pH 4...pH 12]	pH 5, pH 7	pH >7	pH 4, pH 7 - pH 8

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver

<sup>1)</sup> ermittelt densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

#### Proteinkonzentration

Die optimale Proteinkonzentration zur Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase wurde unter den gegebenen Bedingungen mit w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser (Tab. 4.12, Abb. A.8A) ermittelt.

### Zuckerstoffe

Es wurde untersucht, wie sich die Gegenwart von Zuckerstoffen auf eine Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase auswirkt. Die Gegenwart von Lactose (w/w  $\leq 10$  mg Lactose/mg Milcheiweiß) beeinflusste die enzymatische Umsetzung von Milcheiweiß nicht (ohne Abb./Tab.). Die Gegenwart von Glucose (w/w  $\leq 3$  mg Glucose/mg Natriumcaseinat oder w/w  $\leq 10$  mg Glucose/mg Gesamtmilchprotein) verminderte die Umsetzung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase unter den gegebenen Bedingungen (Abb. A.8B). Proteinmonomere in Natriumcaseinat wurden in Gegenwart von  $>3$  mg Glucose/mg Protein geringfügig stärker durch Glucoseoxidase modifiziert als in Abwesenheit von Glucose (Abb. A.8B).

Für eine Modifizierung von Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase wurden bis zu 13 mg Glucose je g Mehl eingesetzt (Primo-Martin et al. 2003, Schooneveld-Bergmans et al. 1999, Hanft und Köhler 2006). Hanft und Köhler (2006) berichteten, dass der Mechanismus der Modifizierung von Getreideeiweiß durch Glucoseoxidase von der Gegenwart von Glucose abhängig ist. Sie konnten nur in Gegenwart von Glucose eine enzymatische Modifizierung von Tyrosin und von schwefelhaltigen Aminosäuren in Proteinen feststellen. Diskutiert wurde, dass in Gegenwart von Glucose Wasserstoffperoxid in einer Konzentration gebildet wird, die eine Oxidation und eine indirekte Vernetzung von Eiweißmolekülen bewirkt. In Abwesenheit von Glucose werden die Teigeigenschaften nach Hanft und Köhler (2006) im Wesentlichen durch die Tyrosinase-Nebenaktivität der Glucoseoxidase modifiziert.

### Enzym/Substrat-Verhältnis

Die enzymatische Modifizierung von Proteinmonomeren in Natriumcaseinat steigt mit der Enzymaktivität im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 U - 0,50 U Enzym je mg Natriumcaseinat an (Tab. 4.12, Abb. A8.C). Die Umsetzung von Gesamtmilchprotein ist vergleichsweise unabhängig von der Enzymaktivität (Abb. A8.C); die optimale Enzymaktivität wurde auf 0,01 U Enzym/mg Gesamtmilchprotein festgelegt (Tab. 4.12).

Getreideeiweiß wurde nach Literaturangaben durch  $<0,01$  U Glucoseoxidase/mg Mehl modifiziert (Hilhorst et al. 1999, Primo-Martin et al. 2003, Primo-Martin et al. 2005, Bonet et al. 2006, Rosell et al. 2003, Hanft und Köhler 2006, Dunnewind et al. 2002). In Mehl sind jedoch neben Getreideeiweißen Arabinoxylane enthalten, die potenzielle Substratmoleküle für Glucoseoxidase darstellen (Primo-Martin et al. 2003).

### Inkubationstemperatur

Eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase konnte unter den gegebenen Bedingungen bei Temperaturen von 20°C - 50°C festgestellt werden (Abb. A8.D), am stärksten bei 40°C (Tab. 4.12).

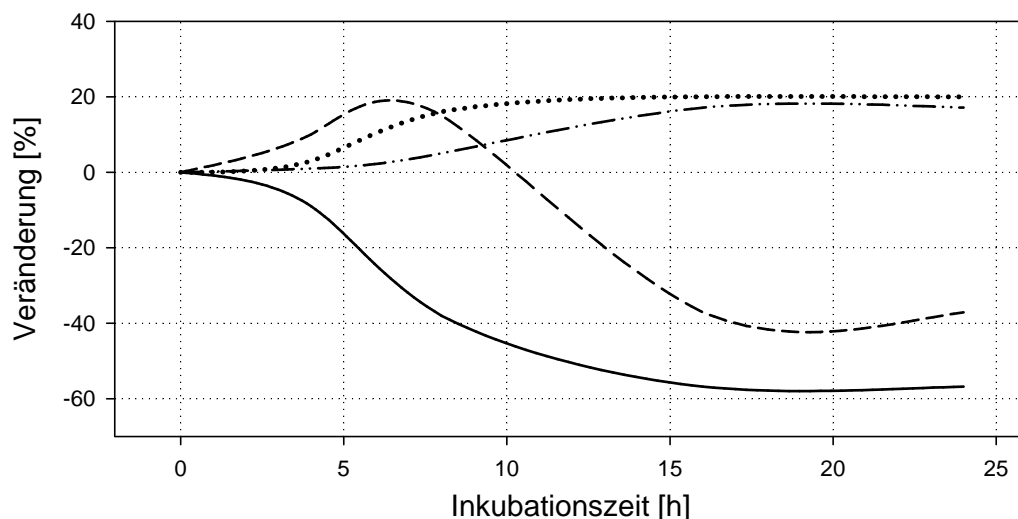
Hilhorst et al. (1999), Rosell et al. (2003), Primo-Martin et al. (2005), Schooneveld-Bergmans et al. (1999), Dunnewind et al. (2002), Bonet et al. (2006) und Hanft und Köhler (2006) inkubierten Getreideeiweiß während der Teigruhe von Teigwaren bei Temperaturen von 20°C - 30°C mit Glucoseoxidase.

### Inkubationszeit

Die Umsetzung einzelner Molmassenfractionen von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erfasst und ist in Abbildung 4.9 am Beispiel von Natriumcaseinat dargestellt.

Abbildung 4.9 zeigt, dass wesentliche Veränderungen der Molmassenverteilung von Natriumcaseinat nach einer Inkubationszeit von etwa 2 - 3 Stunden mit Glucoseoxidase eintreten. Tsuge et al. (1975) und Pazur und Kleppe (1964) bestätigten eine langsame Reaktion, wenn andere Substratmoleküle als  $\beta$ -D-Glucose durch Glucoseoxidase umgesetzt werden. Nach etwa 3-stündiger Inkubation werden Caseinmonomere durch Glucoseoxidase kontinuierlich vermindert (Abb. 4.9). Caseinoligomere mit Molmassen von  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol treten als Intermediate der Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucoseoxidase innerhalb einer Inkubationszeit von 1 - 10 Stunden auf. Caseinpolymere  $> 2 \times 10^5$  g/mol werden ab einer Inkubationszeit von 4 Stunden synthetisiert. Protein  $< 2 \times 10^4$  g/mol wird ab 7 Stunden Inkubationszeit gebildet. Die enzymatische Umsetzung von Natriumcaseinat (Abb. 4.9) und von Gesamtmilchprotein (Abb. A.9) ist nach 16 Stunden Inkubationszeit im Wesentlichen abgeschlossen.

Getreideeiweiß in Teigwaren wurde während der Teigruhe 30 min - 90 min mit Glucoseoxidase inkubiert (Hilhorst et al. 1999, Primo-Martin et al. 2003, Dunnewind et al. 2002, Bonet et al. 2006, Hanft und Köhler 2006). Rosell et al. (2003) und Schooneveld-Bergmans et al. (1999) nutzten Inkubationszeiten von Getreideeiweiß mit Glucoseoxidase von 16 - 24 Stunden.



**Abb. 4.9.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Natriumcaseinat durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Caseinmonomere (—), Molmasse  $< 2 \times 10^4$  g/mol (....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

### **pH-Wert**

Ein hoher Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren durch Glucoseoxidase wurde unter den gegebenen Bedingungen für Natriumcaseinat bei pH 5 und bei pH 7 ermittelt (Tab. 4.12) und für Gesamtmilchprotein bei pH 7 - pH 8. Pazur und Kleppe (1964), Tsuge et al. (1975) und Hanft und Köhler (2006) berichteten eine Aktivität der Glucoseoxidase im pH-Bereich von pH 4 bis pH 7, optimal bei pH 5,5. Nach Pazur und Kleppe (1964) liegt der isoelektrische Bereich von Glucoseoxidase jedoch bei pH 4,2. Schooneveld-Bergmans et al. (1999) modifizierten Getreideeiweiß mit Glucoseoxidase bei pH 6, Dunnewind et al. (2002) bei pH 5,4.

Hohe Grade der Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase konnten auch für eine Inkubation bei pH-Werten von pH >10 erzielt werden (Abb. A.8E). In diesem pH-Bereich treten neben einer enzymatischen Quervernetzung durch Glucoseoxidase auch chemisch-physikalische Quervernetzungsreaktionen durch den alkalischen pH-Wert auf (Færgemand et al. 1998a). Dass der Anteil einer chemisch-physikalischen Modifizierung von Milcheiweiß den Anteil einer enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß durch Glucoseoxidase bei pH  $\geq 9$  übersteigt, kann für Molkenproteinisolat festgestellt werden (Abb. A.8E). Monomere in Molkenproteinisolat werden nach Abbildung A.8A-D nicht durch Glucoseoxidase modifiziert. pH-Werte >pH 10 führen zu einer sichtbaren Verminderung an Proteinmonomeren in Molkenproteinisolat (Abb. A.8E), die durch Færgemand et al. (1998a) mit einer chemisch-physikalischen Entfaltung der Proteinstruktur und einer Quervernetzung von Proteinmolekülen durch Disulfidbrückenbindungen in Verbindung gebracht wurde.

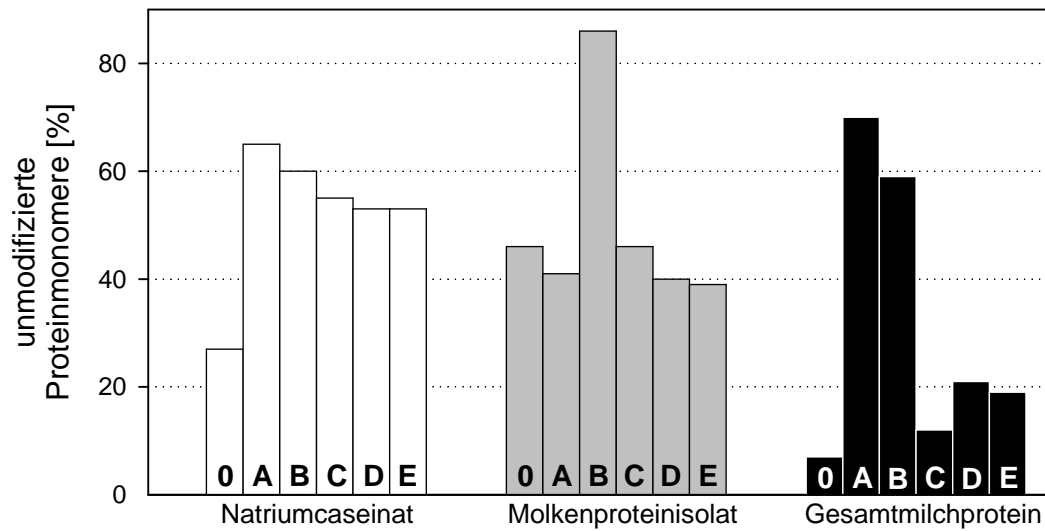
### **Proteinvorbehandlung**

Milcheiweiß wurde mit Ascorbinsäure, Cystein, Cystin und Hitze chemisch-physikalisch modifiziert und anschließend mit Glucoseoxidase inkubiert. Abbildung 4.10 stellt dar, wie sich eine chemisch-physikalische Vorbehandlung auf die enzymatische Umsetzung von Proteinmonomeren durch Glucoseoxidase auswirkt.

Abbildung 4.10 zeigt, dass die enzymatische Modifizierung von Proteinmonomeren durch chemisch-physikalische Vorbehandlung im Wesentlichen vermindert wird. Ein Anstieg des Modifizierungsgrades durch Glucoseoxidase ist nur für Molkenproteinisolat dargestellt, dass mit Ascorbinsäure oder durch Hitze vorbehandelt wurde.

Vernullapalli et al. (1998) wiesen nach, dass die Wirkung von Glucoseoxidase auf Getreideeiweiß durch Radikalfänger wie Ascorbinsäure abgeschwächt wird. Eine Erhitzung von Weizenprotein hat nach Vernullapalli und Hosney (1998) keinen Einfluss auf die Proteinmodifizierung durch Glucoseoxidase.





**Abb. 4.10.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von einer chemisch-physikalischen Vorbehandlung<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> ohne Vorbehandlung (**0**), Vorbehandlung mit 0,05 mg Ascorbinsäure/mg Protein (**A**), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystein/mg Protein (**B**), Vorbehandlung mit 0,05 mg Cystin/mg Protein (**C**), thermische Vorbehandlung (80°C, 10 min) (**D**), thermische Vorbehandlung (80°C, 20 min) (**E**)

#### 4.1.4. Herstellung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

Die Inkubationsbedingungen, die für die Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase (Kap. 4.1.1.1.), mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup> (Kap. 4.1.2.1.) und mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup> (Kap. 4.1.3.1.) als optimal ermittelt wurden, wurden mit folgenden Abweichungen zugrunde gelegt, um enzymatisch modifiziertes Milcheiweiß herzustellen:

- Natriumcaseinat wurde mit Laccase und 0,02 µmol (Tab. 3.1) statt 0,08 µmol (Tab. 4.8) Chlorogensäure/mg Milcheiweiß inkubiert. Reaktionsprodukte aus Natriumcaseinat, die durch Inkubation mit Laccase und 0,08 µmol Chlorogensäure/mg Milcheiweiß gebildet wurden, präzipitierten nach eigenen Beobachtungen teilweise aus der Lösung.
- Gesamtmilcheiweiß bildete unter optimalen Inkubationsbedingungen mit Laccase und mit Glucoseoxidase Gele aus. Daher wurde Gesamtmilcheiweiß mit Laccase und 0,08 µmol (Tab. 3.1) statt 0,02 µmol (Tab. 4.8) Chlorogensäure/mg Milcheiweiß inkubiert beziehungsweise mit Glucoseoxidase bei 20°C (Tab. 3.1) statt bei 40°C (Tab. 4.12) Inkubationstemperatur inkubiert.
- Da die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Glucoseoxidase nicht verändert wurde (Tab. 4.9), aber Aminosäurenreste in Molkenproteinisolat modifiziert wurden (Tab. 4.10), wurde Molkenproteinisolat unter den Inkubationsbedingungen modifiziert, die für Natriumcaseinat mit Glucoseoxidase als optimal ermittelt wurden (Tab. 4.12).
- Die Inkubation erfolgte in entmineralisiertem Wasser bei pH 6,8 für Natriumcaseinat, bei pH 7,2 für Molkenproteinisolat und bei pH 7,0 für Gesamtmilcheiweiß (Tab. 3.1).
- Milcheiweiß wurde vor der enzymatischen Modifizierung nicht chemisch-physikalisch vorbehandelt.
- Milcheiweiß wurde ohne Zusatz von Glucose (Tab. 4.12) mit Glucoseoxidase inkubiert.

Tabelle 4.13 gibt einen Überblick über die prozentuale Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß, die durch eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase unter den gewählten Inkubationsbedingungen (Kap. 3.2.1.3.) erreicht wurde. Die Reaktionsprodukte wurden zur weiteren Untersuchung der techno-funktionellen Eigenschaften (Kap. 4.1.5.) und der in-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß (Kap. 4.1.6.) eingesetzt.

**Tab. 4.13.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase

	Modifizierte Proteinmonomere [%]		
	NC	MPI	MP
LPO	39,8 <sup>2)</sup>	45,9 <sup>3)</sup>	57,9 <sup>4)</sup>
PPO	90,5 <sup>5)</sup>	51,3 <sup>6)</sup>	92,0 <sup>7)</sup>
GOX	70,3 <sup>8)</sup>	2,0 <sup>9)</sup>	86,1 <sup>10)</sup>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein, LPO = Lactoperoxidase, PPO = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, GOX = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; berechnet nach der Formel:

$$\text{Modifizierte Proteinmonomere [\%]} = 100 - \frac{\text{Proteinmonomere in enzymatisch modifiziertem Protein} \times 100}{\text{Proteinmonomere in unbehandeltem Protein}}$$

<sup>2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)</sup> enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser)

<sup>2)</sup> 47,5 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>3)</sup> 47,5 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,2

<sup>4)</sup> 4,75 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,0

<sup>5)</sup> 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>6)</sup> 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,2

<sup>7)</sup> 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,0

<sup>8)</sup> 0,5 U Glucoseoxidase/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>9)</sup> 0,5 U Glucoseoxidase/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 7,2

<sup>10)</sup> 0,01 U Glucoseoxidase/mg Milcheiweiß, 16 h, 20°C, pH 7,0

#### 4.1.5. Techno-funktionelle Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

Es wurde untersucht, wie sich eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase unter den in Kapitel 3.2.1.3. angegebenen Inkubationsbedingungen auf die techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß auswirkt.

Abbildungen 4.11 - 4.13 stellen die techno-funktionellen Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß als prozentuale Veränderung gegenüber unmodifiziertem Milcheiweiß dar. Die Messwerte, die für unbehandeltes Milcheiweiß ermittelt wurden, sind in der Anlage (Tab. A.5) angegeben.

#### Hitzestabilität

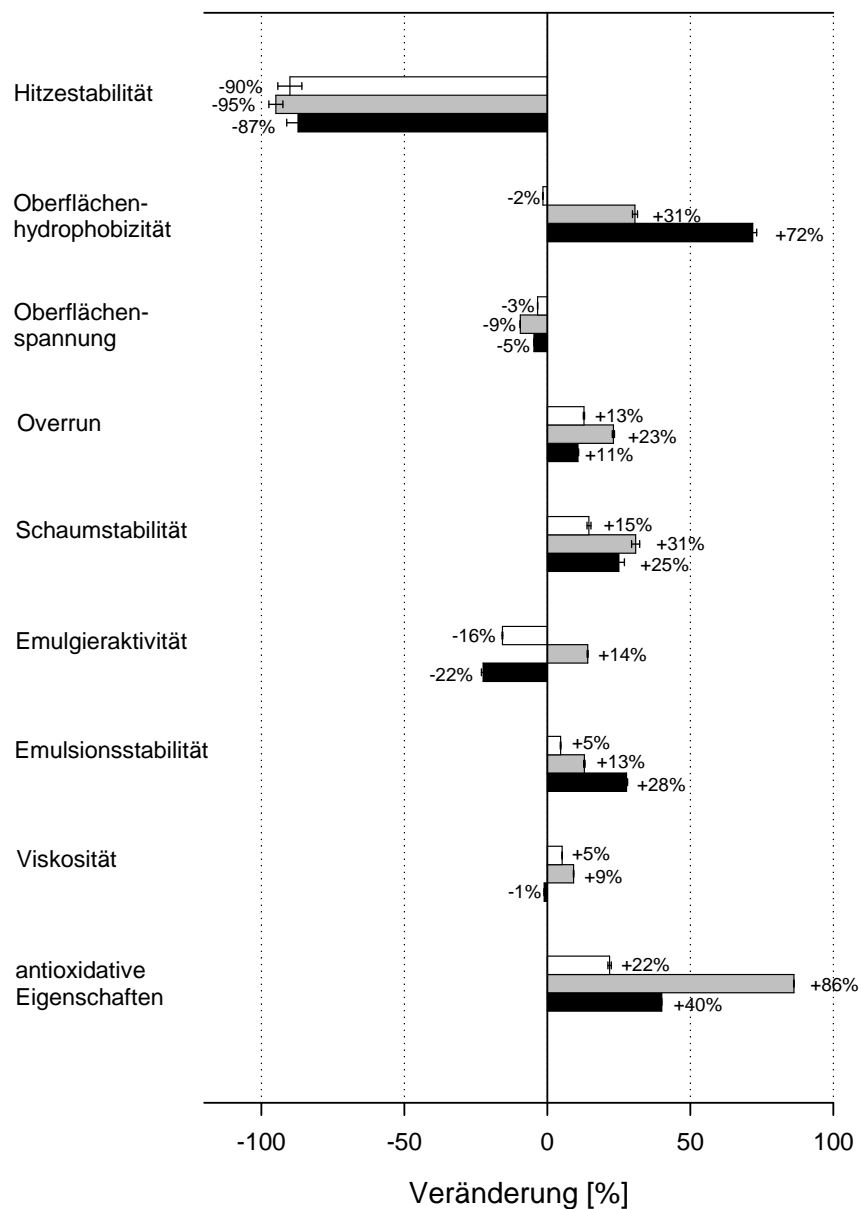
Die Hitzestabilität von Milcheiweiß sinkt durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase um 39% - 99% ab (Abb. 4.11 - 4.13). Die stärkste Verminderung der Hitzestabilität wurde für enzymatisch modifiziertes Molkenproteinisolat ermittelt (Abb. 4.11 - 4.13). Die Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase vermindert die Hitzestabilität insgesamt stärker (Abb. 4.13) als die Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase (Abb. 4.11) oder mit Laccase (Abb. 4.12).

In der Literatur wurden bisher keine Untersuchungen zum Einfluss einer enzymatisch-induzierten Oxidation auf die Hitzestabilität von Milcheiweiß berichtet. Liu et al. (2000) wiesen nach, dass die Hitzestabilität von Muskelfaserprotein durch eine chemisch-physikalische Oxidation abnimmt (Liu et al. 2000). Rawel et al. (2002) und Prigent et al. (2003) stellten fest, dass die Hitzestabilität von Blutserumalbumin beziehungsweise von Lysozym durch Wechselwirkungen mit phenolischen Substanzen wie Chlorogensäure vermindert wird.

Tang et al. (2005) diskutierten, dass die hohe Hitzestabilität von transglutaminasebehandeltem Natriumcaseinat im Wesentlichen darauf zurückzuführen ist, dass durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Transglutaminase Reaktionsprodukte mit kompakter Molekülstruktur gebildet werden. Es ist anzunehmen, dass lactoperoxidase-, laccase- und glucoseoxidase-behandeltes Milcheiweiß weniger hitzestabil ist als unbehandeltes Milcheiweiß (Abb. 4.11 - 4.13), da die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur von Proteinmolekülen durch Oxidationsreaktion entfaltet wird (Dean et al. 1997, Davies und Delsignore 1987) und - als Folge - Reaktionsprodukte mit einer nur wenig kompakten Molekülstruktur entstehen.

Es ist auch wahrscheinlich, dass die Hitzestabilität von Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase abnimmt, da bei einer enzymatisch-induzierten Oxidation ähnliche Veränderungen der Proteinstruktur auftreten (Matheis und Whitaker 1984) wie bei einer thermischen Denaturierung von Milcheiweiß (Sava et al. 2005). Eine Entfaltung der Proteinstruktur und eine Oxidation von Sulfhydrylgruppen in Aminosäureseitenketten zu Disulfidbrückenbindungen konnten beispielsweise sowohl für eine enzymatisch-induzierte Oxidation (Özer et al. 2003, Özer und Atamer 1999, Matheis und Whitaker 1984, Hirano et al. 1999) als auch für eine thermische Denaturierung (Sava et al. 2005) von Milcheiweiß nachgewiesen werden.

Lantto et al. (2005) stellten fest, dass die Hitzestabilität von Actin und von Myosin als Folge einer enzymatischen Modifizierung durch Laccase ansteigt. Die Autoren diskutierten, dass durch Inkubation mit Laccase intramolekulare Bindungen ausgebildet werden, die das Protein thermisch stabilisieren.

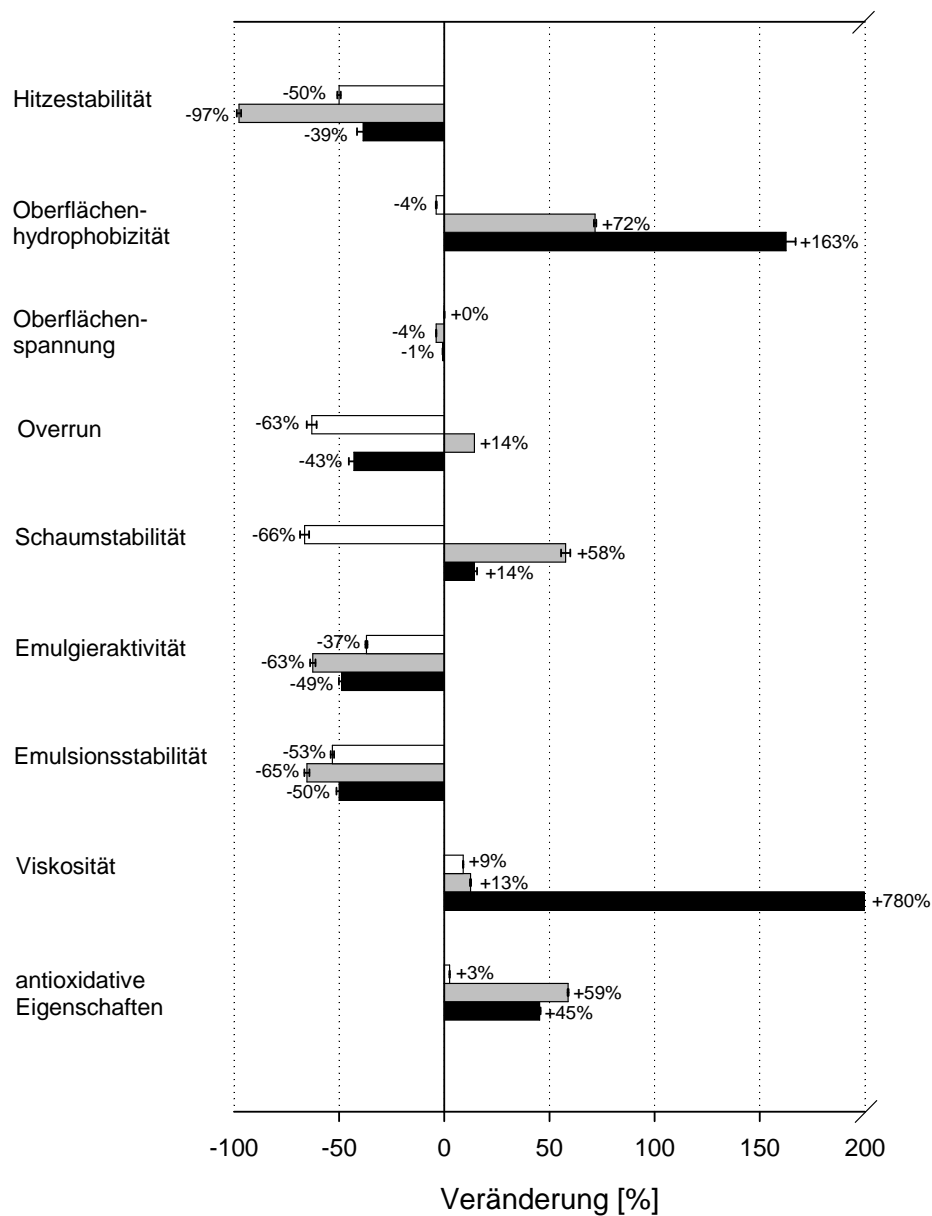


**Abb. 4.11.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat<sup>1)</sup> (□), von Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (■) und von Gesamtmilchprotein<sup>3)</sup> (■) durch Inkubation mit Lactoperoxidase

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,2

<sup>3)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 4,75 U/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,0

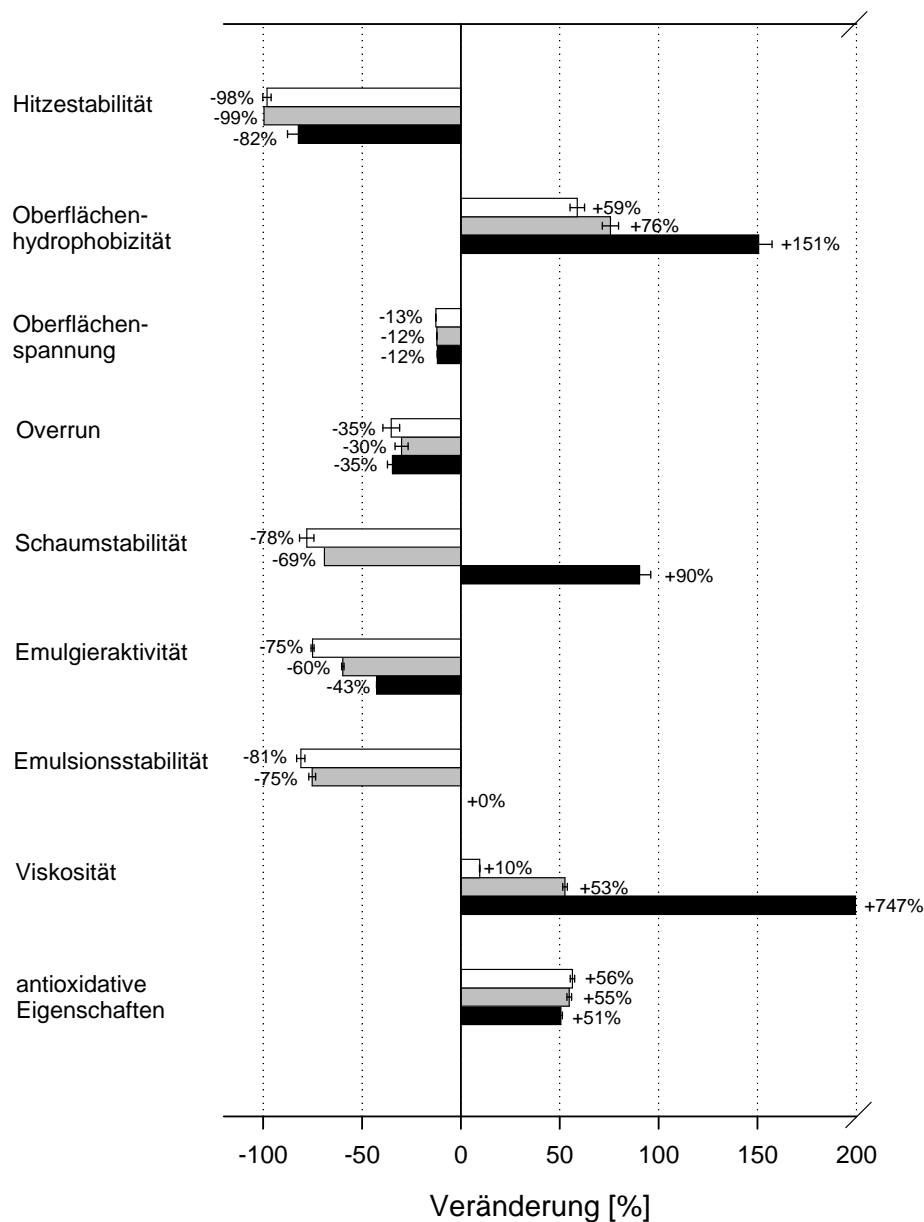


**Abb. 4.12.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat<sup>1)</sup> (□), von Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (■) und von Gesamtmilchprotein<sup>3)</sup> (■) durch Inkubation mit Laccase

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sub>ohne Tyrosinaseaktivität</sub>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sub>ohne Tyrosinaseaktivität</sub>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,2

<sup>3)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sub>ohne Tyrosinaseaktivität</sub>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. 4.13.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat<sup>1)</sup> (□), von Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (■) und von Gesamtmilchprotein<sup>3)</sup> (■) durch Inkubation mit Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 7,2

<sup>3)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase mit geringer Catalaseaktivität, 0,01 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 20°C, pH 7,0

### **Oberflächenhydrophobizität**

Die Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß steigt durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase im Wesentlichen an. Die Oberflächenhydrophobizität von Gesamtmilcheiweiß steigt um bis 163% an (Abb. 4.11 - 4.13), die Oberflächenhydrophobizität von Molkenproteinisolat um bis zu 76% (Abb. 4.11 - 4.13).

Es ist anzunehmen, dass die Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß ansteigt, da die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur von Proteinmolekülen nach Dean et al. (1997) und Davies und Delsignore (1987) als Folge von enzymatisch-induzierten Oxidationsreaktionen teilweise entfaltet wird. Aminosäurenreste hydrophober Aminosäuren, die vor einer Oxidation im Inneren von Proteinmolekülen angeordnet waren, werden durch Oxidation freigelegt.

Hirano et al. (1998b) und Khalid und Masud (2004) diskutierten, dass ein Anstieg der Hydrophobizität von Milchprotein durch Lactoperoxidase zur Ausbildung weicher Joghurtgele aus lactoperoxidasebehandelter Milch führt. Rawel et al. (2002) berichteten, dass auch Wechselwirkungen von Blutserumalbumin mit Chlorogensäure in Abwesenheit von Laccase zu höheren Werten der Oberflächenhydrophobizität von Blutserumalbumin führen.

In der Literatur werden bisher keine vergleichenden Untersuchungen zur Oberflächenhydrophobizität von lactoperoxidase-, von laccase- und von glucoseoxidase-behandeltem Protein berichtet. Es kann daher nicht abschließend erklärt werden, weshalb die Oberflächenhydrophobizität von Natriumcaseinat als Folge einer Inkubation mit Glucoseoxidase um 59% ansteigt (Abb. 4.13). Es wird beschrieben, dass Caseinmoleküle eine im Wesentlichen offenkettige Molekülstruktur aufweisen (Walstra et al. 2006). Eine Entfaltung der Molekülstruktur durch enzymatisch-induzierte Oxidation führt also nach theoretischen Überlegungen - wie für die Inkubation mit Lactoperoxidase und mit Laccase festgestellt wurde (Abb. 4.11, Abb. 4.12) - nicht zu wesentlichen Veränderungen der Oberflächenhydrophobizität von Natriumcaseinat. Es ist jedoch möglich, dass Wechselwirkungen, die in unbehandeltem Natriumcaseinat zwischen Proteinmolekülen auftreten (Oommen et al. 2001), durch Inkubation mit Glucoseoxidase abgeschwächt werden; als Folge können vermutlich quantitativ mehr hydrophobe Gruppen an der Oberfläche von Proteinmolekülen in glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat nachgewiesen werden.

### **Oberflächenspannung**

Die Oberflächenspannung von Milcheiweißlösungen sinkt durch Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase geringfügig ab (Abb. 4.11 - Abb. 4.13).

Eine Verminderung der Oberflächenspannung von Milcheiweißlösungen beziehungsweise eine höhere Aktivität von Milcheiweiß zur Ausbildung von Grenzflächen (Borcherding 2004) korrespondiert nach theoretischen Überlegungen mit dem Anstieg der Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß durch enzymatische Modifizierung, der in den Abbildungen 4.11 - 4.13 dargestellt ist. Kato und Nakai (1979), Keshavarz und Nakai (1979) und Kristinsson und Hultin (2003) bestätigten einen negativen Zusammenhang zwischen der Oberflächenspannung von Proteinlösungen und der Oberflächenhydrophobizität von Protein.

Es ist wahrscheinlich, dass Lösungen von lactoperoxidase-, laccase- oder glucoseoxidase-behandeltem Milcheiweiß auch deshalb eine geringere Oberflächenspannung als unbehandeltes Milcheiweiß ausbilden, da die Tertiärstruktur von Milcheiweißmolekülen entfaltet wird (Davies und Delsignore 1987) und da die Nettoladung von Proteinmolekülen durch



enzymatisch-induzierte Oxidation (Rawel et al. 2002, Stahmann et al. 1977) ansteigt. Es gilt als gesichert, dass besonders die kationischen, hydrophoben Aminosäurereste an der Oberfläche von Proteinmolekülen die Oberflächeneigenschaften von Milcheiweiß bestimmen (Patel und Kilara 1990, Cardamone und Puri 1992).

### **Overrun**

Der Overrun von Milcheiweißlösungen steigt durch Inkubation mit Lactoperoxidase um 11% - 23% an (Abb. 4.11). Durch Inkubation mit Laccase steigt der Overrun von Lösungen aus Molkenproteinisolat um 14% an (Abb. 4.12). Lösungen von laccasebehandeltem Natriumcaseinat und von laccasebehandeltem Gesamtmilchprotein bilden - im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Milcheiweiß - einen geringeren Overrun aus (Abb. 4.12). Eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase vermindert den Overrun von Milcheiweißlösungen um 30% - 35% (Abb. 4.13).

Nach theoretischen Überlegungen korreliert ein Anstieg der Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß (Patel und Kilara 1990, Belloque und Smith 1998, Lieske und Konrad 1994, Cardamone und Puri 1992) und eine Abnahme der Oberflächenspannung von Proteinlösungen (Keshavarz und Nakai 1979, Kristinsson und Hultin 2003) mit der Fähigkeit von Milcheiweißlösungen, Grenzflächen und Schäume auszubilden.

Nach Borchering (2004) werden die Schaumbildungseigenschaften von Milcheiweiß jedoch durch verschiedene chemisch-physikalische Faktoren wie Partikelgröße, Molmasse, Viskosität, Oberflächenspannung und Oberflächenhydrophobizität bestimmt.

Für den Zusammenhang zwischen der Aufschlagfähigkeit und der Molmassenverteilung von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß berichteten Lorenzen (2000a) und Flanagan et al. (2003), dass Proteinpolymere in transglutaminasebehandeltem Milcheiweiß eine geringe Aktivität zur Ausbildung von Grenzflächen aufweisen. Auch in den eigenen Untersuchungen bildeten Lösungen von Natriumcaseinat und von Gesamtmilchprotein, die durch Inkubation mit Laccase und mit Glucoseoxidase im Wesentlichen zu Proteinpolymeren umgesetzt wurden (Kap. 4.1.2., Kap. 4.1.3.), einen geringeren Overrun aus als Lösungen von unbehandeltem Natriumcaseinat beziehungsweise von unbehandeltem Gesamtmilchprotein (Abb. 4.12, Abb. 4.13). Lösungen von Molkenproteinisolat, das durch Inkubation mit Lactoperoxidase oder mit Laccase im Wesentlichen zu Proteinoligomeren umgesetzt wurde (Kap. 4.1.1., Kap. 4.1.2.), bildete dagegen einen höheren Overrun aus als Lösungen von unbehandeltem Molkenproteinisolat (Abb. 4.11, Abb. 4.12).

Da Untersuchungen zu den Grenzflächeneigenschaften von lactoperoxidasebehandeltem und von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß in der Literatur bisher nicht berichtet wurden, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend erklärt werden, weshalb lactoperoxidasebehandeltes Milcheiweiß insgesamt verbesserte Grenzflächeneigenschaften aufweist (Abb. 4.11) und glucoseoxidasebehandeltes Milcheiweiß insgesamt unzureichende Grenzflächeneigenschaften (Abb. 4.13).

Untersuchungen zu den Schaumbildungseigenschaften von Milcheiweiß, dass durch enzymatisch-induzierte Oxidation modifiziert wurde, werden bisher nur für tyrosinasebehandeltes Molkenprotein berichtet. Nach Thalmann (2003) bilden Lösungen von tyrosinasebehandeltem Molkenprotein im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Molkenprotein einen geringeren Overrun bei pH 7 aus und einen höheren Overrun bei pH 5.

### Schaumstabilität

Die Stabilität von Milcheiweißschäumen steigt durch Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase um 11% - 23% an (Abb. 4.11). Durch Inkubation mit Laccase steigt die Schaumstabilität von Molkenprotein- und von Gesamtmilchproteinschäumen an (Abb. 4.12). Durch Modifizierung mit Glucoseoxidase steigt nur die Stabilität von Gesamtmilchproteinschäumen um 90% an, während die Stabilität von Natriumcaseinat- und Molkenproteinschäumen um 69% - 78% absinkt (Abb. 4.13).

Thalmann (2003) wies eine höhere Stabilität für Proteinschäume aus tyrosinasebehandeltem Molkenprotein nach als für Proteinschäume aus unbehandeltem Molkenprotein.

Ein Anstieg der Stabilität von Proteinschäumen, die durch quervernetztes Milcheiweiß stabilisiert werden, wurde in der Literatur darauf zurückgeführt, dass die Gasbläschen in Milcheiweißschäumen durch die Bildung dicker Grenzflächenfilme sterisch stabilisiert werden (Flanagan et al. 2003, Lorenzen 2000a, Liu und Damodaran 1999). Flanagan (2003) diskutierten jedoch, dass große verzweigte Moleküle von enzymatisch quervernetztem Milcheiweiß disperse Systeme destabilisieren können, wenn sie an der Grenzflächenmembran mehrerer Gasbläschen beteiligt sind.

### Emulgierereigenschaften

Emulgieraktivität und Emulsionsstabilität von Milcheiweiß sinken durch Inkubation mit Laccase um bis zu 65% (Abb. 4.12) und durch Inkubation mit Glucoseoxidase um bis zu 81% (Abb. 4.13) ab. Lactoperoxidasebehandeltes Milcheiweiß bildet im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß um 5% - 28% stabilere Emulsionen aus (Abb. 4.11). Die Emulgieraktivität von Molkenproteinisolat steigt durch Inkubation mit Lactoperoxidase um 14% an (Abb. 4.11).

Wie bereits für die Schaumbildungseigenschaften von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß beschrieben wurde, werden die Emulgierereigenschaften von Milcheiweiß durch verschiedene chemisch-physikalische Faktoren bestimmt. Die Emulgierereigenschaften werden besonders durch die hohe Molmasse von enzymatisch quervernetztem Milcheiweiß bestimmt, die die Adsorption von Proteinmolekülen an Grenzflächen und die Ausbildung von Emulsionen verzögert (Liu und Damodaran 1999, Lorenzen 2000a, Færgemand et al. 1998b, Sharma et al. 2002, Tang et al. 2005).

Nach Lorenzen (2000a) steigt die Emulsionsstabilität von O/W-Emulsionen durch eine enzymatische Quervernetzung von Milcheiweiß an, da dicke Grenzflächenfilme aus enzymatisch quervernetztem Milcheiweiß ausgebildet werden, die Öltröpfchen sterisch gegen Aggregation und Aufräumung stabilisieren. Flanagan et al. (2003) diskutierten, dass große verzweigte Moleküle von enzymatisch quervernetztem Milcheiweiß Emulsionen destabilisieren können, wenn die Proteinmoleküle an die Grenzfläche mehrerer Öltröpfchen adsorbiert werden.

Nach Moreau et al. (2003) bestimmt im Wesentlichen die Ladung von Milcheiweißmolekülen die Stabilität von O/W-Emulsionen als Folge einer elektrostatischen Hinderung von Öltröpfchen an einer Aggregation. Es ist daher nicht auszuschließen, dass ein Anstieg der Nettoladung von Milcheiweiß durch enzymatisch-induzierte Oxidation (Rawel et al. 2002, Stahmann et al. 1977, Prigent 2005, Kroll et al. 2000) an den Veränderungen der Emulgierereigenschaften von Milcheiweiß durch enzymatische Modifizierung beteiligt ist, die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelt wurden (Abb. 4.11 - 4.13).

### Viskosität

Im Vergleich zu unmodifiziertem Milcheiweiß bildet enzymatisch modifiziertes Natriumcaseinat um bis zu 10% viskosere Lösungen aus, enzymatisch modifiziertes Molkenproteinisolat um bis zu 86% viskosere Lösungen und enzymatisch modifiziertes Gesamtmilchprotein um bis zu 780% viskosere Lösungen (Abb. 4.11 - 4.13). Nach eigenen Beobachtungen gelieren Lösungen von Gesamtmilchprotein unter optimalen Inkubationsbedingungen (Tab. 4.8, Tab. 4.12) als Folge einer Inkubation mit Laccase oder mit Glucoseoxidase.

Ein Anstieg der Viskosität von Proteinlösungen wurde in der Literatur berichtet für eine Inkubation von Milcheiweiß mit Peroxidase (Færgemand et al. 1998a, Schooneveld-Bergmans et al. 1999) und mit Laccase (Færgemand et al. 1998a, Shotaro 2002). Nachgewiesen wurde auch eine höhere Viskosität von Getreideeiweißlösungen nach Inkubation mit Peroxidase (Peyron et al. 2001) oder mit Glucoseoxidase (Schooneveld-Bergmans et al. 1999, Vernullapalli und Hosenev 1998).

Shotaro (2002) berichtete, dass die Viskosität von Caseinlösungen und von Blutserumalbuminlösungen durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ansteigt. Die Ausbildung von Gelen aus Milcheiweiß durch Inkubation mit Laccase (Matheis und Whitaker 1984) wurde bei einer Proteinkonzentration >1% festgestellt (Shotaro 2002). Norsker et al. (2000) wiesen nach, dass Milch, der 2% Pektin zugesetzt wurden, durch Inkubation mit Peroxidase oder mit Laccase Gele ausgebildet. Nach Lantto et al. (2005) und Lantto et al. (2006) führt die Inkubation von Muskelfaserprotein mit Laccase zur Bildung elastischer Proteingele.

### Antioxidative Eigenschaften

Die antioxidativen Eigenschaften von Milcheiweiß steigen durch enzymatische Modifizierung um 3% - 86% an (Abb. 4.11 - 4.13). Für enzymatisch modifiziertes Molkenproteinisolat können - verglichen mit Natriumcaseinat und mit Gesamtmilchprotein - die stärksten Steigerungen der antioxidativen Eigenschaften gegenüber unbehandeltem Milcheiweiß festgestellt werden (Abb. 4.11 - 4.13).

Untersuchungen zu antioxidativen Eigenschaften von lactoperoxidase-, laccase- und glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß werden in der Literatur bisher nicht berichtet. Es ist wahrscheinlich, dass antioxidativ wirksame, funktionelle Gruppen in Aminosäureseitenketten von Milcheiweißmolekülen als Folge einer enzymatisch-induzierten Entfaltung der Molekülstruktur (Dean et al. 1997) freigelegt werden. Die antioxidativen Eigenschaften von laccasebehandeltem Milcheiweiß steigen vermutlich auch als Folge einer Bindung von Molekülen phenolischer Substanzen wie Chlorogensäure an Proteinmoleküle (Barbeau und Kinsella 1985).

Halaoui et al. (2005) wiesen für die Inkubation von Casein mit Tyrosinase nach, dass antioxidativ wirksame Reaktionsprodukte entstehen.

**Weitere techno-funktionelle Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem Protein**

Über die untersuchten techno-funktionellen Eigenschaften von lactoperoxidase-, von laccase- und von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß hinaus wurde in der Literatur berichtet, dass die Wasserbindungseigenschaften (Lantto et al. 2005, Lantto et al. 2006, Lantto et al. 2007b) und die Filmbildungseigenschaften (Michon et al. 1999) von Protein durch enzymatisch-induzierte Oxidation verbessert werden.

Decker et al. (1993) wiesen für Muskelfaserprotein eine Verminderung der Gelstärke, eine Abnahme der Löslichkeit und eine Verminderung der Wasserbindung als Folge einer chemisch-physikalischen Oxidation des Proteins nach.

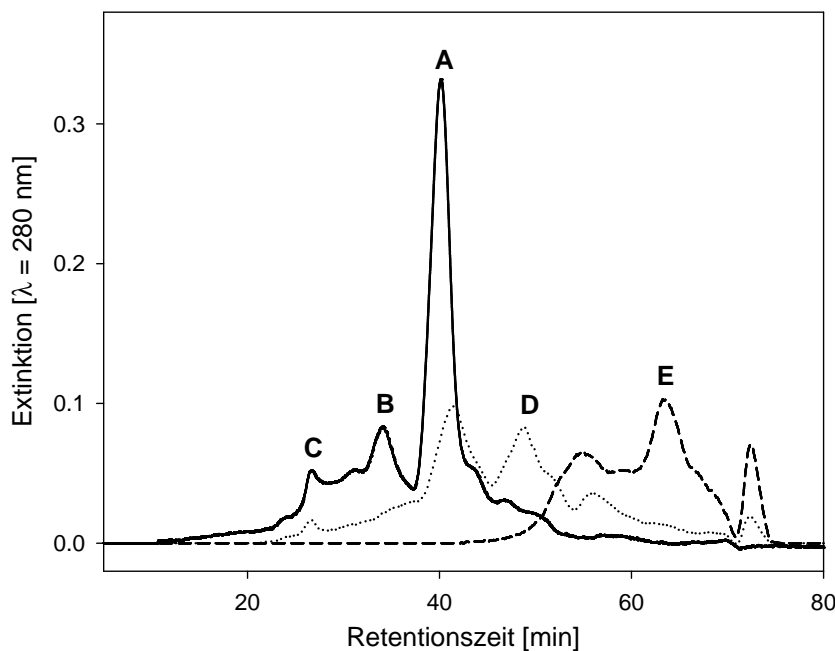
Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen und Molekülen phenolischer Substanzen führen nach Rawel et al. (2005), Prigent (2005) und Kroll et al. (2000) zu einer Verschiebung des isoelektrischen Bereichs von Molkenprotein auf einen niedrigeren pH-Wert.

#### 4.1.6. In-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

Es wurde untersucht, wie sich eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Inkubation mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase unter den in Tabelle 3.1 angegebenen Inkubationsbedingungen auf die in-vitro Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß auswirkt.

Unbehandeltes Milcheiweiß und enzymatisch modifiziertes Milcheiweiß wurden mit Pancreatin inkubiert. Die Molmassenverteilung von Milcheiweiß und von Hydrolysaten aus Milcheiweiß wurde durch Größenausschlusschromatographie (FPLC) ermittelt und ist in Abbildung 4.14 am Beispiel von Natriumcaseinat dargestellt.

Abbildung 4.14 zeigt, dass unmodifiziertes Natriumcaseinat im Wesentlichen aus Proteinmolekülen besteht, die in Peak A ( $2,5 \times 10^4 - 4,3 \times 10^4$  g/mol) eluiert werden. Eine geringe Absorption ist für Moleküle mit Molmassen von  $1,6 \times 10^5 - 2,3 \times 10^5$  g/mol (Peak B) und für Moleküle mit Molmassen von  $6,7 \times 10^5 - >2 \times 10^6$  g/mol (Peak C) dargestellt. Durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Pancreatin werden Peak A, Peak B und Peak C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit vermindert. Es entstehen im Wesentlichen Reaktionsprodukte mit Molmassen  $<2 \times 10^4$  g/mol, die nach einer Retentionszeit  $\geq 40$  min nachgewiesen werden (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14.** Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat<sup>1)</sup>

Natriumcaseinat-Hydrolysat [0 min] (—), Natriumcaseinat-Hydrolysat [5 min] (---),  
Natriumcaseinat-Hydrolysat [30 min] (---)

Peak A =  $2,5 \times 10^4 - 4,3 \times 10^4$  g/mol, Peak B =  $1,6 \times 10^5 - 2,3 \times 10^5$  g/mol,

Peak C =  $6,7 \times 10^5 - >2 \times 10^6$  g/mol, Peak D =  $1,3 \times 10^4$  g/mol, Peak E =  $1,1 \times 10^3 - 6,5 \times 10^3$  g/mol

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 0 min - 30 min, 37°C, pH 7,8

Tabelle 4.14 zeigt einen Überblick über die Molmassenverteilung von Milcheiweiß, von Hydrolysaten aus Milcheiweiß, von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß und von Hydrolysaten aus enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß, die durch densitometrische PAGE-Auswertung quantifiziert werden konnte.

**Tab. 4.14.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Milcheiweiß, von Hydrolysaten aus Milcheiweiß, von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß und von Hydrolysaten aus enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

		Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen			
		Molmassenfaktionen [g/mol]			
		>2 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup>	<1 x 10 <sup>4</sup>
<b>[A]</b>	NC	19,0	56,8	13,9	10,3
	NC + LPO <sup>3)</sup>	39,8	35,2	12,8	12,2
	NC + PPO <sup>4)</sup>	80,9	12,3	4,7	2,1
	NC + GOX <sup>5)</sup>	44,1	17,7	19,2	19,0
<b>[B]</b>	NC <sup>2)</sup>	0,1	0,7	33,5	65,7
	NC + LPO <sup>3), 2)</sup>	0,0	0,9	29,9	69,2
	NC + PPO <sup>4), 2)</sup>	0,2	6,4	33,6	59,8
	NC + GOX <sup>5), 2)</sup>	0,0	0,3	16,4	83,3
<b>[C]</b>	MPI	0,9	13,2	82,1	3,8
	MPI + LPO <sup>6)</sup>	3,8	37,6	56,1	2,5
	MPI + PPO <sup>7)</sup>	5,6	48,1	44,0	2,3
	MPI + GOX <sup>8)</sup>	0,3	10,1	85,6	4,0
<b>[D]</b>	MPI <sup>2)</sup>	0,1	0,3	80,3	19,3
	MPI + LPO <sup>6), 2)</sup>	0,0	3,4	40,1	56,5
	MPI + PPO <sup>7), 2)</sup>	0,3	10,5	68,4	20,8
	MPI + GOX <sup>8), 2)</sup>	0,0	0,3	77,4	22,3

**[A]** und **[C]** = Milcheiweiß und enzymatisch modifiziertes Milcheiweiß

**[B]** und **[D]** = Hydrolysate aus Milcheiweiß und Hydrolysate aus enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, LPO = Lactoperoxidase, PPO = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>,  
GOX = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 15 min, 37°C, pH 7,8

<sup>3), 4), 5), 6), 7), 8)</sup> enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser)

<sup>3)</sup> 47,5 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>4)</sup> 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>5)</sup> 0,5 U Glucoseoxidase/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 6,8

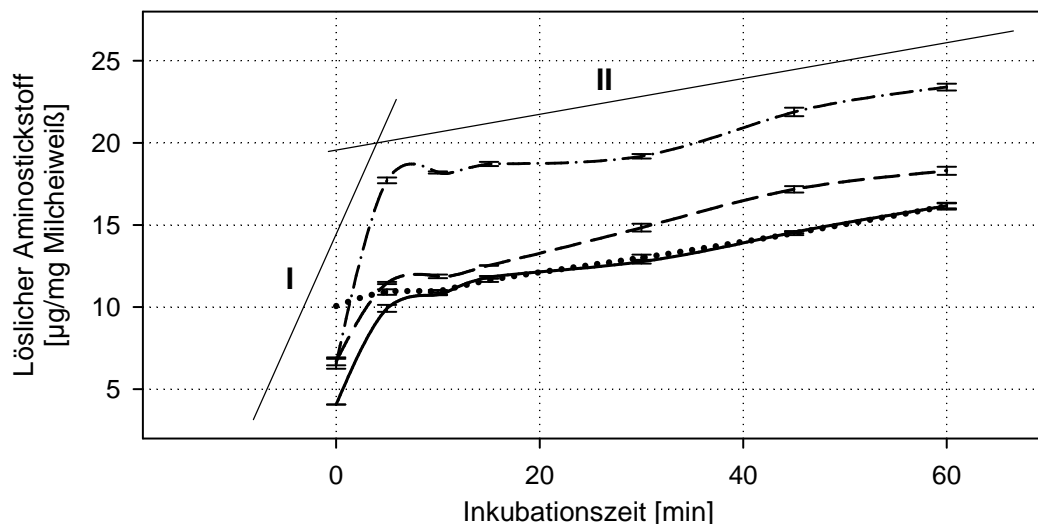
<sup>6)</sup> 47,5 U Lactoperoxidase/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,2

<sup>7)</sup> 0,011 U Laccase/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,2

<sup>8)</sup> 0,5 U Glucoseoxidase/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 7,2

Nach Tabelle 4.14 unterscheidet sich die Molmassenverteilung von unbehandeltem und von enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat besonders in Bezug auf Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol. In unbehandeltem Natriumcaseinat werden 19,0% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen, in enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat bis zu 80,9% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.14 [A]).

Die Molmassenverteilung von Hydrolysaten aus unbehandeltem und aus enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat (Tab. 4.14 [B]) unterscheidet weniger stark als die Molmassenverteilung von unbehandeltem und von enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat (Tab. 4.14 [A]). Die Molmassenverteilung von Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat und aus lactoperoxidasebehandeltem Natriumcaseinat unterscheidet sich im Wesentlichen nicht (Tab. 4.14 [B]). In Hydrolysaten aus laccasebehandeltem Natriumcaseinat können im Vergleich zu Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat 6,4% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen werden (Tab. 4.14 [B]). In Hydrolysaten aus glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat können mit 83,3% insgesamt mehr Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol nachgewiesen werden als in Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat (Tab. 4.14 [B]).



**Abb. 4.15.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten<sup>1)</sup> aus unbehandeltem und aus enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat

Natriumcaseinat (—), lactoperoxidasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>2)</sup> (---), laccasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>3)</sup> (•••), glucoseoxidasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>4)</sup> (-·-·-)

I = Reaktionskinetik I, II = Reaktionskinetik II

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>3)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>4)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 6,8

Abbildung 4.15 stellt dar, wie sich der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat durch Inkubation mit Pancreatin verändert. Die Steigung der Graphen in Abbildung 4.15 steht im Zusammenhang mit einem Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat als Folge einer hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen.

Abbildung 4.15 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat und in enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat durch Inkubation mit Pancreatin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt. Der stärkste Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde innerhalb der ersten ~10 min der Inkubation von Natriumcaseinat mit Pancreatin ermittelt (Abb. 4.15, Reaktionskinetik I), ein weniger starker Anstieg innerhalb einer Inkubationszeit von 10 min - 60 min mit Pancreatin (Abb. 4.15, Reaktionskinetik II). Während der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unbehandeltem Natriumcaseinat durch Reaktionskinetik II in etwa gleich stark ansteigt wie in enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat, unterscheidet sich der Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Reaktionskinetik I zwischen unbehandeltem und enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat (Abb. 4.15). Betrachtet man die absoluten Veränderungen durch pancreatische Hydrolyse, zeigt Abbildung 4.15, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff - im Vergleich zu unbehandeltem Natriumcaseinat - in glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat stärker ansteigt, in lactoperoxidasebehandeltem Natriumcaseinat in etwa gleich stark ansteigt und in laccasebehandeltem Natriumcaseinat weniger stark ansteigt (Abb. 4.15).

Für die Menge an Natriumhydroxid, die verbraucht wurde, um den pH-Wert während der Hydrolyse von Natriumcaseinat konstant zu halten, konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen unbehandeltem, lactoperoxidasebehandeltem und laccasebehandeltem Natriumcaseinat festgestellt werden (Abb. A.10). Durchschnittlich  $0,23 \mu\text{mol}$  Natriumhydroxid/mg Milcheiweiß wurden zur Hydrolyse von unbehandeltem, von lactoperoxidasebehandeltem beziehungsweise von laccasebehandeltem Natriumcaseinat über eine Reaktionszeit von 60 min mit Pancreatin verbraucht. Ein vergleichsweise höherer Verbrauch an Natriumhydroxid von  $0,36 \mu\text{mol/mg}$  Milcheiweiß wurde für die Hydrolyse von glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat ermittelt (Abb. A.10).

Die Ergebnisse zur pancreatischen in-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat zeigen, dass die Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat als Folge einer Modifizierung durch Lactoperoxidase nicht beeinflusst wird, als Folge einer Modifizierung durch Laccase tendenziell abnimmt und als Folge einer Modifizierung durch Glucoseoxidase tendenziell ansteigt.

Es ist wahrscheinlich, dass eine geringere in-vitro Proteolysierbarkeit von laccasebehandeltem Natriumcaseinat im Vergleich zu unbehandeltem Natriumcaseinat auf einen vergleichsweise höheren Gehalt an Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5 \text{ g/mol}$  in laccasebehandeltem Natriumcaseinat zurückzuführen ist (Tab. 4.14 [A]). Eine enzymatische Spaltung der Peptidbindungen von Proteinpolymeren, die durch Laccase gebildet werden, wird vermutlich sterisch behindert.

Es ist wahrscheinlich, dass eine tendenziell stärkere Hydrolyse von glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat im Vergleich zu unbehandeltem Natriumcaseinat auf eine Entfaltung und eine Fragmentierung von Proteinmolekülen durch Glucoseoxidase zurückzuführen ist (s. Kap. 4.1.3.). Tabelle 4.14 belegt, dass in glucoseoxidasebehandeltem Natriumcaseinat prozentual mehr Proteinmoleküle  $<2 \times 10^4 \text{ g/mol}$  nachgewiesen werden als in unbehandeltem Natriumcaseinat (Tab. 4.14 [A]). Eine enzymatische Spaltung von



Peptidbindungen in Natriumcaseinat durch Pancreatin wird als Folge einer enzymatischen Modifizierung von Natriumcaseinat durch Glucoseoxidase vermutlich sterisch erleichtert.

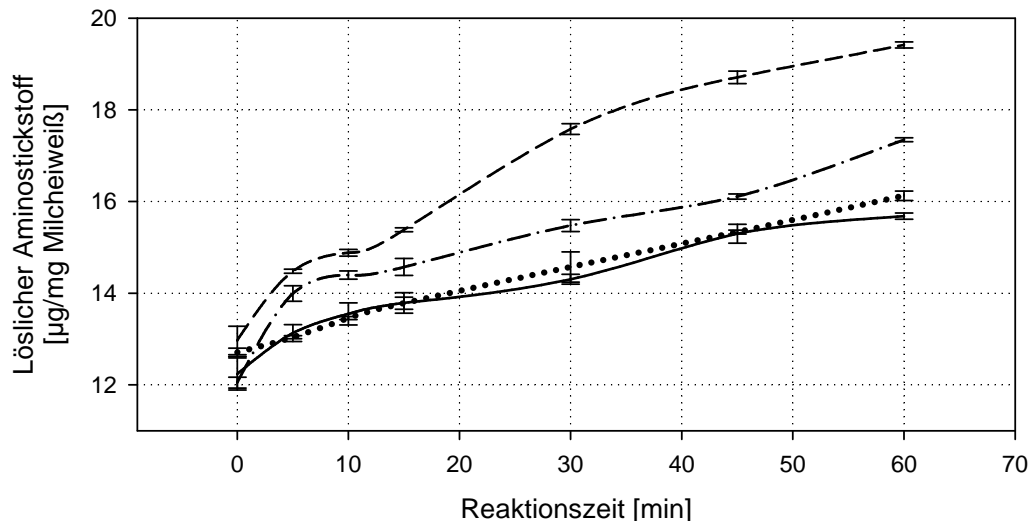
Ergebnisse zur Untersuchung der in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat und von enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat sind in Tabelle 4.14, Abbildung 4.16 und Abbildung A.11 angegeben.

Tabelle 4.14 gibt einen Überblick über die Molmassenverteilung von unbehandeltem Molkenproteinisolat, von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat, von enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat und von Hydrolysaten aus enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat. Tabelle 4.14 zeigt, dass sich unbehandeltes und enzymatisch modifiziertes Molkenproteinisolat im Wesentlichen im prozentualen Gehalt an Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol unterscheiden. In unbehandeltem Molkenproteinisolat werden 13,2% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen, in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat bis zu 48,1% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.14 [C]). Auch Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol werden in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat mit bis zu 5,6% nachgewiesen (Tab. 4.14 [C]). Die Molmassenverteilung von unbehandeltem und von glucoseoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat unterscheidet sich im Wesentlichen nicht (Tab. 4.14 [C]).

Für die Molmassenverteilung der Hydrolysate wurde festgestellt (Tab. 4.14 [D]), dass Hydrolysate aus lactoperoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat mit 56,5% einen insgesamt höheren Gehalt an Protein  $<1 \times 10^4$  g/mol aufweisen als Hydrolysate aus unbehandeltem Molkenproteinisolat. Für Hydrolysate aus laccasebehandeltem Molkenproteinisolat wurde ein höherer Gehalt an Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol ermittelt als für Hydrolysate aus unbehandeltem Molkenproteinisolat (Tab. 4.14 [D]). Die Molmassenverteilung von Hydrolysaten aus unbehandeltem und aus glucoseoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat unterscheidet sich im Wesentlichen nicht (Tab. 4.14 [D]).

Abbildung 4.16 stellt Veränderungen im Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit Pancreatin dar. Abbildung 4.16 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Pancreatin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt.

Vergleicht man die absoluten Veränderungen im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Hydrolyse von Molkenproteinisolat, zeigt Abbildung 4.16 einen insgesamt stärkeren Anstieg für lactoperoxidase- und glucoseoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat als für unbehandeltes Molkenproteinisolat. Der Gehalt an löslichem Aminostickstoff steigt durch pancreatische Hydrolyse von laccasebehandeltem Molkenproteinisolat etwa gleich stark an wie durch Hydrolyse von unbehandeltem Molkenproteinisolat (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten<sup>1)</sup> aus unbehandeltem und aus enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat

Molkenproteinisolat (—), lactoperoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (---), laccasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>3)</sup> (•••), glucoseoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>4)</sup> (-·-·-)

<sup>1)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 18,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,2

<sup>3)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,08 µmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,2

<sup>4)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 7,2

Für die Menge an Natriumhydroxid, die verbraucht wurde, um den pH-Wert während der Hydrolyse von Molkenproteinisolat konstant zu halten, konnten keine Wesentlichen Unterschiede zwischen der Hydrolyse von unbehandeltem Molkenproteinisolat und der Hydrolyse von laccasebehandeltem Molkenproteinisolat festgestellt werden (Abb. A.11); etwa 0,14 µmol Natriumhydroxid/mg Milcheiweiß wurden jeweils während der Hydrolyse verbraucht. Ein höherer Verbrauch an Natriumhydroxid von 0,26 µmol/mg Milcheiweiß wurde für die Hydrolyse von lactoperoxidase- und von glucoseoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat festgestellt (Abb. A.11).

Die Ergebnisse zur in-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat geben Hinweise darauf, dass die in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat als Folge einer enzymatischen Modifizierung durch Lactoperoxidase oder durch Glucoseoxidase ansteigt. Es ist wahrscheinlich, dass eine tendenziell stärkere Hydrolyse von lactoperoxidase- und glucoseoxidasebehandeltem Molkenproteinisolat im Vergleich zu unbehandeltem Molkenproteinisolat auf eine Entfaltung und eine Fragmentierung von

Proteinmolekülen durch Lactoperoxidase beziehungsweise durch Glucoseoxidase zurückzuführen ist. In Kapitel 4.1.3. wurde für glucoseoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat bereits diskutiert, dass sich die Molmassenverteilung von Molkenprotein durch Inkubation mit Glucoseoxidase nicht verändert, dass aber eine Modifizierung von Aminosäurenresten nachgewiesen werden kann, die vermutlich mit intramolekularen Veränderungen der Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen in Verbindung steht.

Eine tendenziell geringere in-vitro Proteolysierbarkeit von laccasebehandeltem Molkenproteinisolat im Vergleich zu unbehandeltem Molkenproteinisolat (Tab. 4.14 [D]) ist auf einen vergleichsweise höheren Gehalt an Proteinoligomeren und -polymeren in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat zurückzuführen (Tab. 4.14 [C]). Eine enzymatische Spaltung der Peptidbindungen von Proteinpolymeren, die durch Laccase gebildet werden, wird vermutlich sterisch behindert.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß als Folge einer enzymatischen Modifizierung durch Laccase tendenziell abnimmt, als Folge einer Modifizierung durch Glucoseoxidase tendenziell ansteigt und als Folge einer Modifizierung durch Lactoperoxidase nicht verändert wird (Natriumcaseinat) oder ansteigt (Molkenproteinisolat).

Die Ergebnisse geben jedoch nur Hinweise zur hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen und können keine Aussagen treffen zur Hydrolysierbarkeit von Vernetzungsprodukten, deren Aminosäureseitenketten durch andere Bindungen als Isopeptidbindungen miteinander verknüpft sind. Für enzymatisch modifiziertes Milcheiweiß, das durch Säurehydrolyse aufgeschlossen wurde, wurden in den Kapiteln 4.1.1., 4.1.2. und 4.1.3. Abnahmen der Gehalte an Tyrosin, an Tryptophan, an schwefelhaltigen Aminosäuren, an Leucin, an Isoleucin, an Lysin und an Glutaminsäure nachgewiesen. Hurrel et al. (1982) und Petzke et al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass durch die Ausbildung von Vernetzungsprodukten aus Casein und Kaffeesäure oder aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Chlorogensäure keine Aminosäuren zu limitierenden Aminosäuren im Protein werden. Die biologische Wertigkeit des Proteins in-vitro wird nicht beeinträchtigt (Hurrel et al. 1982). Nach Matheis und Whitaker (1984) und Marin et al. (2005) gelten Oxidationsprodukte von Aminosäuren wie Methioninsulfoxid als teilweise verfügbar in-vivo.

Weitere Ergebnisse in der Literatur zur Proteolysierbarkeit von Proteinen, die durch Oxidationsreaktionen modifiziert wurden, sind uneinheitlich. Nach Dean et al. (1997), Davies et al. (1987a) und Kamin-Belsky et al. (1996) führt eine enzymatisch-induzierte Oxidation von Proteinmolekülen zu einer Entfaltung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur. Barbeau und Kinsella (1985) berichteten von einer Entfaltung der Proteinstruktur durch die Bindung von Chlorogensäure an Proteinmoleküle. Peptidbindungen werden Peptidasen zugänglich und die Proteolysierbarkeit des Proteins steigt an (Dean et al. 1997b, Matheis und Whitaker 1984, Barbeau und Kinsella 1985). Eine starke Oxidation von Protein führt nach Dean et al. (1997) jedoch zu einer Verminderung der Proteolysierbarkeit.

Rawel et al. (2002) und Kroll et al. (2000) berichteten für Protein/Phenol-Produkte aus Blutserumalbumin und Chlorogensäure oder aus Myoglobin und Kaffeesäure von einer Abnahme der Proteolysierbarkeit durch besonders peptische Hydrolyse, weniger stark durch tryptische Hydrolyse oder durch chymotryptische Hydrolyse. Eine geringere Proteolysierbarkeit wurde besonders zu Beginn der Inkubationszeit ermittelt (Kroll et al. 2000). Kamin-Belsky et al.

(1996) stellten fest, dass auch chemisch-physikalisch oxidiertes Myoglobin resistent gegenüber einer enzymatischen Proteolyse ist.

#### **Weitere tropho-funktionelle Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem Protein**

Über die in-vitro Proteolysierbarkeit (Kap. 4.1.6.) und die antioxidativen Eigenschaften (Kap. 4.1.5.) von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß hinaus wurde in der Literatur ein geringeres allergenes Potential von Protein nachgewiesen für peroxidasebehandeltes Erdnusseweiß (Chung et al. 2004) und für laccasebehandeltes Kirscheiweiß (Gruber et al. 2004).

Durch die enzymatische Modifizierung von Protein durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase kann teilweise auf den Einsatz von Zusatzstoffen in der Lebensmittelindustrie verzichtet werden, für die ein Verdacht auf negative gesundheitliche Wirkungen besteht. Durch eine industrielle Anwendung der Laccasebehandlung von Protein kann nach Lantto et al. (2007b) auf den Einsatz von Phosphaten in der Herstellung von Fleischerzeugnissen verzichtet werden, durch eine Anwendung der Glucoseoxidasebehandlung auf den Einsatz von Kaliumbromat in der Herstellung von Backwaren (Rosell et al. 2003).

#### **4.1.7. Eigenschaften von Magermilchjoghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch**

Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch wurde durch Lactoperoxidase, durch Laccase oder durch Glucoseoxidase modifiziert. Die Auswirkungen einer enzymatischen Modifizierung auf die chemisch-analytischen, die chemisch-physikalischen und die sensorischen Eigenschaften von Magermilchjoghurt wurden untersucht.

##### **4.1.7.1. Chemisch-analytische Eigenschaften**

Es wurde untersucht, wie sich eine enzymatische Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch quantitativ und qualitativ auf die Molmassenverteilung von Protein in Joghurtmilch und in Joghurt auswirkt. Tabelle 4.15 gibt die prozentualen Gehalte an unmodifizierten Proteinmonomeren und die Molmasse der Reaktionsprodukte an, die in Joghurtmilch und in Joghurt nachgewiesen werden konnten.

Nach Tabelle 4.15 werden in unbehandelter Joghurtmilch 94,2% unmodifizierte Proteinmonomere nachgewiesen. Als Folge einer enzymatischen Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch nimmt der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Joghurtmilch ab. In lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch werden 69,8% - 76,2% unmodifizierte Proteinmonomere nachgewiesen, in laccasebehandelter Joghurtmilch 64,9% - 75,5% und in glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch 67,1% (Tab. 4.15). Durch Inkubation von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch mit Lactoperoxidase werden Reaktionsprodukte mit Molmassen bis  $2,2 \times 10^5$  g/mol gebildet, durch Inkubation mit Laccase oder mit Glucoseoxidase Reaktionsprodukte mit Molmassen bis  $>3,0 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.15).

Tabelle 4.15 gibt an, dass in enzymatisch modifizierter Joghurtmilch prozentual weniger unmodifizierte Proteinmonomere nachgewiesen werden als in Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch. Für die Molmassen der Reaktionsprodukte in Joghurtmilch und Joghurt, die als Folge einer enzymatischen Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch gebildet wurden, zeigt Tabelle 4.15, dass Reaktionsprodukte in Joghurt meist eine geringere Molmasse aufweisen als in Joghurtmilch.

Als Ursache eines geringeren Vernetzungsgrades von Protein in Joghurt im Vergleich zu Protein in Joghurtmilch müssen antagonistische Effekte zwischen den Mechanismen einer enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß - auf der einen Seite - und einer chemisch-physikalischen Ausbildung von Säuregelen aus Milcheiweiß - auf der anderen Seite - diskutiert werden. Für eine enzymatische Modifizierung wurde gezeigt (Kap. 4.1.1. - 4.1.3.), dass Reaktionsprodukte aus Milcheiweiß gebildet werden, die besonders durch Isodityrosin, durch Disulfidbrückenbindungen und durch hydrophobe Wechselwirkungen miteinander wechselwirken. Während der chemisch-physikalischen Ausbildung von Säuregelen aus Milcheiweiß vermindert sich die Nettoladung von Caseinmolekülen, die Proteinhydrophobizität steigt an und es finden Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen zwischen Milcheiweißmolekülen statt (Özer et al. 2003, Vasbinder et al. 2003, Hirano et al. 1999). Neue Disulfidbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen werden ausgebildet, die die rheologischen Eigenschaften von Joghurt bestimmen.

**Tab. 4.15.** Reaktionsprodukte der enzymatischen Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch

		Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren [%] <sup>1)</sup>	Molmasse von Reaktionsprodukten <sup>2)</sup>
-	JM	94,2	-
	MMJ	90,7	-
LPO <sup>3)</sup>	JM	73,5	bis 2,2 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	82,0	bis 1,5 x 10 <sup>5</sup> g/mol
LPO <sup>4)</sup>	JM	69,8	bis 2,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	81,3	bis 9,0 x 10 <sup>4</sup> g/mol
LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>5)</sup>	JM	76,2	bis 2,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	84,1	bis 9,0 x 10 <sup>4</sup> g/mol
PPO/CA <sup>6)</sup>	JM	64,9	bis >3,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	73,2	bis >3,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
PPO/PSGTE <sup>7)</sup>	JM	75,5	bis 1,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	84,9	bis 1,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
GOX <sup>8)</sup>	JM	67,1	bis >3,0 x 10 <sup>5</sup> g/mol
	MMJ	75,6	bis 1,2 x 10 <sup>5</sup> g/mol

JM = Joghurtmilch, MMJ = Magermilchjoghurt, LPO = Lactoperoxidase, PPO = Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, CA = Chlorogensäure, PSGTE = phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt, GOX = Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; berechnet nach der Formel:

$$\text{Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren [\%]} = \frac{\text{Intensität der Banden der Proteinmonomere} \times 100}{\text{Intensität der Banden aller Proteinfractionen}}$$

<sup>2)</sup> ermittelt durch SDS-PAGE, qualitative Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>3)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>4)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert

<sup>5)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß und 0,24 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>6)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015 µmol Chlorogensäure, 2 h, 40°C, pH 7,0

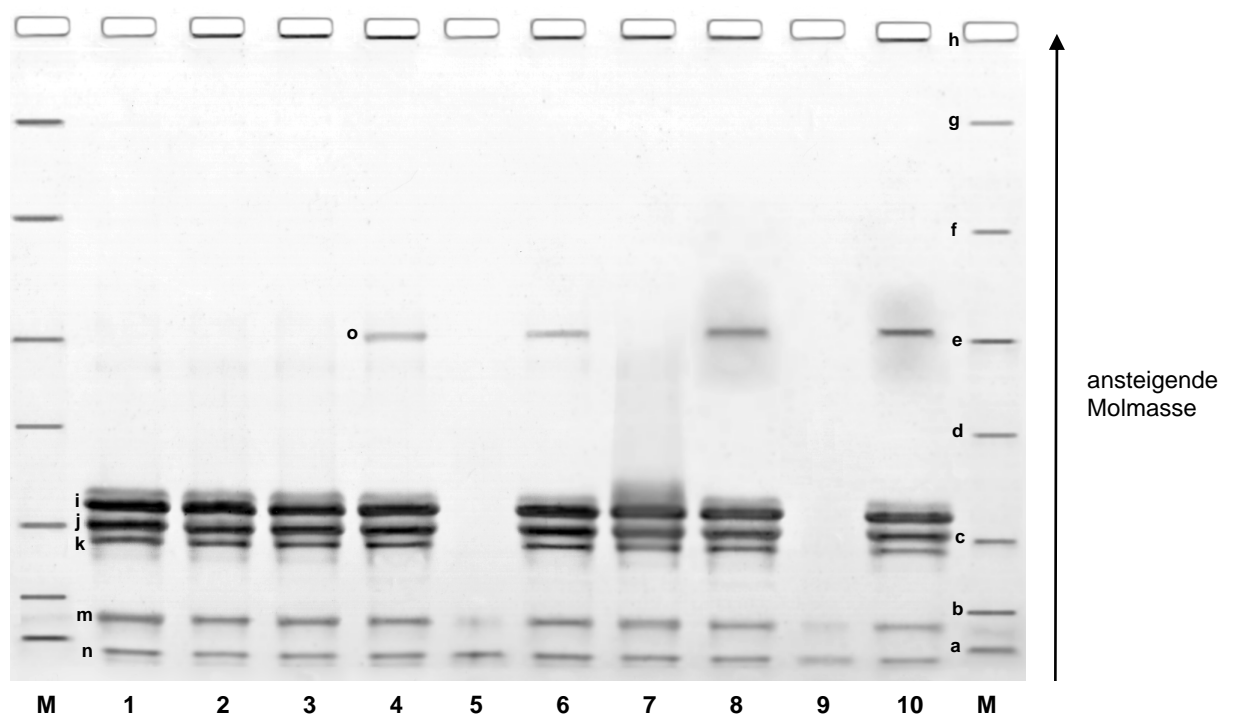
<sup>7)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015 µmol phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>8)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Glucoseoxidase, 0,05 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert

McCue und Shetty (2005) wiesen nach, dass Kefirkulturen Chlorogensäure und auch Chlorogensäure/Protein-Produkte abbauen. Es ist zu vermuten, dass die Reaktionsprodukte, die durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase aus Molekülen von Milcheiweiß und/oder phenolischen Substanzen gebildet wurden, durch Milchsäurekulturen teilweise abgebaut werden.

Abbildung 4.17 zeigt am Beispiel einer Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase/Grünteeextrakt, dass in Joghurt besonders Reaktionsprodukte auftreten, die als Bande „o“ in den Elektropherogrammen von Joghurt aus unbehandelter (Abb. 4.17, Elektropherogramm 4) und aus laccasebehandelter (Abb. 4.17, Elektropherogramm 8) Joghurtmilch dargestellt sind. Durch elektrophoretische Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass Proteinfraction „o“ aus der Starterkultur stammt (ohne Abb./Tab.).

In der durch Zentrifugation gewonnenen Molke von Joghurt aus laccasebehandelter Joghurtmilch können nach Abbildung 4.17 quantitativ weniger Molkenproteinmonomere (Abb. 4.17, Elektropherogramm 9, Banden „m“ und „n“) - insbesondere  $\beta$ -Lactoglobulinmonomere - nachgewiesen werden als in Molke von Joghurt aus unbehauelter Joghurtmilch (Abb. 4.17, Elektropherogramm 5, Banden „m“ und „n“). Es ist anzunehmen, dass durch die enzymatisch-induzierte Bildung von Reaktionsprodukten aus Molekülen von Milcheiweiß und/oder phenolischen Substanzen durch Laccase ein offensichtlich höherer Anteil von Molkenprotein in die Gelstruktur von Joghurt überführt wurde.



**Abb. 4.17.** Elektropherogramme von Joghurtmilch und von Joghurt aus unbehauelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch<sup>1)</sup>

1 = unerhitzte Ausgangsmilch; 2 = JM; 3 = JM [2 h, 40°C]; 4 = MMJ aus (3); 5 = MMJM aus (4); 6 = MMJS aus (4); 7 = JM mit Laccase/Grünteextrakt [2 h, 40°C]; 8 = MMJ aus (7); 9 = MMJM aus (8); 10 = MMJS aus (8); M = Standard

JM = Joghurtmilch, MMJ = Magermilchjoghurt, MMJM = Magermilchjoghurtmolke [20 min, 1.400 x g, 15°C], MMJS = Magermilchjoghurtsediment [20 min, 1.400 x g, 15°C]; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha$ <sub>s</sub>-Casein, j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin, o = Proteinfraction o

<sup>1)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015  $\mu$ mol phenolische Substanzen aus Grünteextrakt, 2 h, 40°C, pH 7,0

#### 4.1.7.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften

Es wurde untersucht, wie sich eine enzymatische Modifizierung von Gesamtmilchprotein in Joghurtmilch auf die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Joghurt auswirkt. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Joghurt wurden über eine Lagerzeit von 4 Wochen erfasst und sind in Tabelle 4.16 am Beispiel von Joghurt aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch dargestellt. Die Ergebnisse, die für Joghurt aus laccase- und aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch ermittelt wurden, sind in den Anlagen (Tab. A.6, Tab. A.7) angegeben.

#### Fermentationszeit

Die Dauer der Milchsäurefermentation von Joghurtmilch, die mit Lactoperoxidase, mit Laccase oder mit Glucoseoxidase inkubiert wurde, ist um bis zu 40 min kürzer als die Dauer der Milchsäurefermentation von unbehandelter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6, Tab. A.7). Nur lactoperoxidase-/wasserstoffperoxidbehandelte Joghurtmilch fermentiert sehr langsam (Tab. 4.16).

Für Joghurtmilch, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurde, berichten Kumar und Mathur (1989), Khalid und Masud (2004) und Girginov und Choroleeva (1972) eine Verlangsamung der Milchsäurefermentation im Vergleich zu unbehandelter Joghurtmilch. Nach Sarkar und Misra (1994) werden besonders die Streptokokken in der Starterkultur durch Wasserstoffperoxid gehemmt.

In den vorliegenden Untersuchungen (Tab. 4.16) wurden 9,6 mmol Wasserstoffperoxid pro Liter Joghurtmilch eingesetzt. Nach Girginov und Choroleeva (1972) fördert Wasserstoffperoxid in einer Konzentration  $\leq 15$  mmol/l Milch die Aktivität von Milchsäurebakterien und verkürzt so die Fermentationszeit. Prasad und Sukumaran (1992) und Özer und Atamer (1999) konnten keinen Einfluss von bis zu 4 mmol  $H_2O_2$ /l Milch auf die Aktivität von Milchsäurebakterien feststellen. Nach Nakada et al. (1996) beeinflussen auch bis zu 5 mg Lactoperoxidase/l Milch die Fermentationszeit von Joghurtmilch nicht.

#### Azidität

Für Joghurt aus Joghurtmilch, die mit Lactoperoxidase oder mit Laccase inkubiert wurde, wurde während der gesamten Lagerperiode eine geringere Azidität ermittelt als für Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6). Eine geringere Azidität korreliert mit einem geringeren Grad des Abbaus von Lactose in Joghurt aus lactoperoxidase- und aus laccasebehandelter Joghurtmilch während der Lagerzeit (Tab. 4.16, Tab. A.6). Für Joghurt aus Joghurtmilch, die mit Glucoseoxidase inkubiert wurde, wurde eine vergleichsweise höhere Azidität und ein geringerer Gehalt an Lactose ermittelt als für Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (Tab. A.7). Es muss berücksichtigt werden, dass Glucoseoxidase nach der Inkubationszeit in Joghurtmilch nicht inaktiviert wurde und dass Glucoseoxidase vermutlich über die Inkubationszeit hinaus Zuckerstoffe während der Lagerzeit umsetzte.

Kumar und Mathur (1989), Basaga und Dik (1994), Gursel und Atamer (1998), Kim et al. (1996), Sarkar und Misra (1994), Seifu et al. (2003) und Özer und Atamer (1999) wiesen eine geringere Azidität und Nachsäuerung für Joghurt aus wasserstoffperoxidbehandelter Joghurtmilch nach, Hirano und Kudo (1998) und Nakada et al. (1996) für Joghurt aus



lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch. Als Ursache einer geringeren Nachsäuerung diskutierten Özer und Atamer (1999) und Seifu et al. (2003) eine bakteriostatische Wirkung von Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid in Milch. Nach Sarkar und Misra (1994) und Seifu et al. (2003) werden durch Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid in Joghurtmilch besonders die säurebildenden Streptokokken in der Starterkultur gehemmt. Durch eine Behandlung von Joghurtmilch mit 0,5 mmol Wasserstoffperoxid/l Milch wiesen Basaga und Dik (1994) und Kim et al. (1996) eine um Faktor  $10^1 - 10^2$  geringere Zellzahl in Joghurt nach. Für Joghurt, der aus Joghurtmilch mit 50 mg Lactoperoxidase/l Milch hergestellt wurde, beschrieben Hirano und Kudo (1998) und Nakada et al. (1996) jedoch insgesamt eine hohe Lebendzellzahl während der Lagerzeit.

Mehanna und Hewnawy (1988) konnten keine Unterschiede der Azidität zwischen Joghurt aus unbehandelter und aus wasserstoffperoxidbehandelter Joghurtmilch feststellen.

### **Acetaldehyd**

Der Gehalt an Acetaldehyd in Joghurt aus enzymatisch modifizierter und aus unbehandelter Joghurtmilch unterscheidet sich zu Beginn der Lagerzeit im Wesentlichen nicht (Tab. 4.16, Tab. A.6). Ein geringerer Gehalt an Acetaldehyd wurde in Joghurt aus glucoseoxidase-behandelter Joghurtmilch gegenüber Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch nachgewiesen (Tab. A.7), ein tendenziell höherer Gehalt an Acetaldehyd in Joghurt aus lactoperoxidase-behandelter Joghurtmilch (Tab. 4.16). Die Tabellen 4.16, A.6 und A.7 zeigen, dass der Gehalt an Acetaldehyd während der Lagerzeit in Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch nicht absinkt oder weniger stark absinkt als in Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch.

Özer und Atamer (1999) und Mehanna und Hefnawy (1988) konnten keine Unterschiede im Gehalt an Acetaldehyd in Joghurt feststellen, der aus wasserstoffperoxidbehandelter oder aus unbehandelter Joghurtmilch hergestellt wurde. Kim et al. (1996) wiesen einen geringen Gehalt an Acetaldehyd in Joghurt aus Joghurtmilch nach, die mit 1 mg Lactoperoxidase und  $\leq 0,5$  mmol Wasserstoffperoxid/l Milch behandelt wurde. Özer und Atamer (1999) diskutierten, dass eine enzymatische oder spontane Oxidation von beispielsweise Methionin - als dem Substrat zur Bildung von Acetaldehyd - zu geringeren Gehalten an Acetaldehyd in Joghurt führen könnte.

### **Viskosität und Gelstärke**

Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch weist im Wesentlichen eine geringere Gelstärke und eine geringere Viskosität auf als Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6, Tab. A.7).

Hirano et al. (1999), Hirano et al. (1997), Gursel und Atamer (1998), Khalid und Masud (2004), Özer et al. (2003) und Özer und Atamer (1999) wiesen eine geringere Viskosität, Gelstärke und Scherstabilität von Joghurt aus Joghurtmilch nach, die mit  $\leq 11$  mmol Wasserstoffperoxid/l Milch behandelt wurde. Hirano et al. (1998a) und Hirano und Kudo (1998) berichteten, dass sich aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch weiche und wenig elastische, aber dennoch stabile Joghurtgele ausbilden. Dickinson (1997) bestätigte, dass sich weniger elastische Joghurtgele aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch ausbilden, wenn Proteinmoleküle im Wesentlichen durch nicht kovalente Bindungen miteinander vernetzt vorliegen.

**Tab. 4.16.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch

		Chemisch-physikalische Eigenschaften			
		MMJ <sup>1)</sup>	LPO-MMJ <sup>2)</sup>	LPO-MMJ <sup>3)</sup>	LPO-MMJ <sup>4)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		150,0	140,0	132,0	185,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	36,9 ± 0,2	35,5 ± 0,1	35,8 ± 0,2	36,9 ± 0,2
	8. Tag	43,7 ± 0,1	39,4 ± 0,4	39,7 ± 0,3	42,1 ± 0,4
	15. Tag	45,6 ± 0,2	42,1 ± 0,5	42,6 ± 0,5	43,0 ± 0,5
	29. Tag	46,0 ± 0,4	43,9 ± 0,4	44,0 ± 0,5	44,1 ± 0,2
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,39	4,44	4,42	4,35
	8. Tag	4,15	4,23	4,30	4,14
	15. Tag	4,13	4,22	4,21	4,14
	29. Tag	4,13	4,21	4,21	4,13
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,0
	29. Tag	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,0	3,4 ± 0,1
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	8,6 ± 0,2	8,8 ± 0,2	8,9 ± 0,3	8,7 ± 0,1
	29. Tag	6,1 ± 0,3	9,0 ± 0,1	8,9 ± 0,2	8,9 ± 0,2
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	166,7 ± 2,7	170,3 ± 5,5	88,3 ± 2,2	173,2 ± 1,4
	8. Tag	184,8 ± 6,8	180,9 ± 6,8	98,2 ± 3,1	175,1 ± 1,4
	15. Tag	204,1 ± 1,4	192,5 ± 1,5	107,9 ± 4,2	178,0 ± 5,5
	29. Tag	208,4 ± 3,2	201,3 ± 3,4	110,8 ± 1,9	180,1 ± 2,2
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	2. Tag	28,4 ± 0,5	28,4 ± 0,1	18,5 ± 0,7	27,2 ± 1,9
	29. Tag	29,5 ± 0,9	28,6 ± 0,6	17,9 ± 0,6	28,3 ± 0,8
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	43,7 ± 1,2	42,6 ± 1,7	43,1 ± 1,9	44,4 ± 2,0
	8. Tag	37,8 ± 0,1	37,2 ± 0,4	36,9 ± 0,8	40,1 ± 1,4
	15. Tag	37,5 ± 1,2	33,6 ± 0,7	33,0 ± 1,5	37,2 ± 1,0
	29. Tag	36,8 ± 1,0	31,2 ± 0,2	30,0 ± 0,6	36,0 ± 0,8

MMJ = Magermilchjoghurt, LPO-MMJ = Magermilchjoghurt aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch

<sup>1)</sup> Inkubation von Joghurtmilch ohne Enzym, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert

<sup>4)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß und 0,24 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 h, 40°C, pH 7,0

Als Ursache der schwachen Gelstruktur von Joghurt aus wasserstoffperoxidbehandelter oder aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch diskutierten Hirano et al. (1999), Hirano et al. (1997), Özer et al. (2003) und Özer und Atamer (1999), dass durch chemisch-physikalische oder enzymatische Oxidationsreaktionen Sulfhydrylgruppen von Proteinen oxidiert werden. Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen (Vasbinder 2003) und Wechselwirkungen zwischen β-Lactoglobulin und κ-Casein (Özer et al. 2003, Özer und Atamer 1999), die zur Ausbildung der für Joghurt charakteristischen Gelstruktur führen, werden gestört. Hirano et al. (1998a) diskutierten einen Zusammenhang zwischen der schwachen Gelstruktur von Joghurt aus

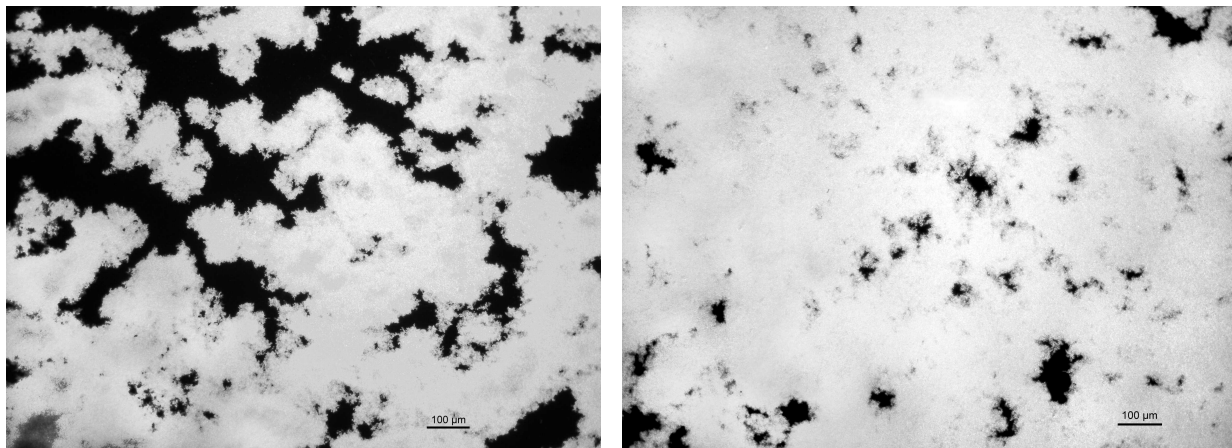
lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch und einer spontan ablaufenden radikalischen Oxidation von Proteinmolekülen. Hirano et al. (1998b) und Khalid und Masud (2004) führten die schwache Gelstruktur von Joghurt auf Veränderungen der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen zurück, da die Hydrophobizität von Protein durch Oxidationsreaktionen ansteigt. Auch Dannenberg und Kessler (1988b) bestätigten einen negativen Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität von Milcheiweiß und der Gelstärke von Joghurt.

Nach Dannenberg und Kessler (1988b) bestimmt der Grad der Denaturierung von  $\beta$ -Lactoglobulin durch Erhitzung die Glattheit von Joghurtgelen. Es ist möglich, dass sich glatte, weiche Joghurtgele aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6, Tab. A.7) als Folge einer enzymatisch-induzierten Entfaltung der Tertiärstruktur von Proteinmolekülen (Dean et al. 1997, Davies und Delsignore 1987) ausbilden.

### Gelstruktur

Abbildung 4.18 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Joghurtgelen aus unbehandelter und aus laccasebehandelter Joghurtmilch.

Es ist dargestellt, dass Joghurt aus laccasebehandelter Joghurtmilch eine gleichmäßigere, glattere Struktur aufweist als Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch. Nach subjektiver Empfindung haben stichfeste Joghurtgele aus laccasebehandelter und aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch die Konsistenz von Rührjoghurt.



**Abb. 4.18.** Struktur<sup>1)</sup> von Joghurtgelen aus unbehandelter (links) und aus laccasebehandelter (rechts) Joghurtmilch<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> erfasst durch lichtmikroskopische Untersuchung bei 1.400-facher Vergrößerung

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015 µmol Chlorogensäure, 2 h, 40°C, pH 7,0

### **Molkenlässigkeit**

Stichfeste Joghurtgele aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch zeigen eine um bis zu 7% geringere Molkenlässigkeit als Joghurtgele aus unbehandelter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6, Tab. A.7).

Für Milchprodukte aus wasserstoffperoxidbehandelter Milch wiesen Gursel und Atamer (1998), Özer und Atamer (1999) und Kumar und Mathur (1989) eine insgesamt höhere Molkenlässigkeit nach als in Produkten aus unbehandelter Milch.

Dannenberg und Kessler (1988a) beschrieben einen negativen Zusammenhang zwischen dem Grad der Denaturierung von  $\beta$ -Lactoglobulin und der Molkenlässigkeit von Joghurt. Eine geringe Molkenlässigkeit von Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch (Tab. 4.16, Tab. A.6, Tab. A.7) kann daher möglicherweise mit einer Entfaltung der Tertiärstruktur von Proteinmolekülen durch enzymatisch-induzierte Oxidationsreaktionen (Dean et al. 1997, Davies und Delsignore 1987) in Verbindung gebracht werden.

#### **4.1.7.3. Sensorische Eigenschaften**

Joghurt aus unbehandelter und aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch wurde durch ein Taste-Panel auf seine sensorischen Eigenschaften untersucht (s. Kap. 3.2.7.8.). Das Ergebnis der sensorischen Bewertung von Aussehen, Konsistenz, Geschmack und Geruch ist in Abbildung 4.19 am Beispiel von Joghurt aus laccasebehandelter Joghurtmilch dargestellt. Die sensorischen Bewertungen von Joghurt aus lactoperoxidase- und aus glucoseoxidase-behandelter Joghurtmilch sind in den Anlagen aufgeführt (Abb. A.12, Abb. A.13).

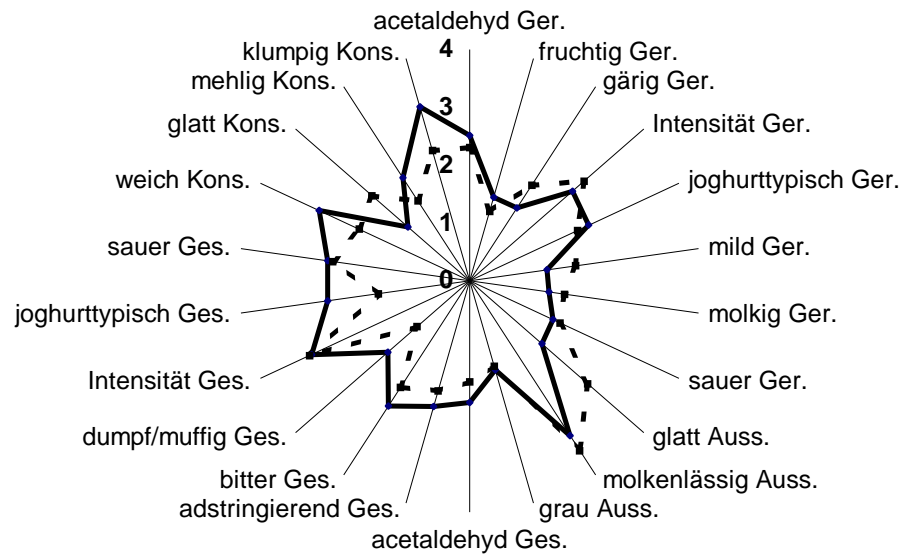
### **Konsistenz**

Die Ergebnisse der sensorischen Bewertung zeigen, dass die Merkmalseigenschaften glatt, weich und cremig in Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch tendenziell stärker ausgeprägt sind als in Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (Abb. 4.19, Abb. A.12, Abb. A.13).

### **Geruch und Geschmack**

Geruch und Geschmack von Joghurt aus enzymatisch modifizierter Joghurtmilch wurden im Vergleich zu Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch als weniger sauer und weniger joghurtypisch empfunden. Joghurt aus laccase- oder lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch wurde als „mild“ bewertet (Abb. 4.19, Abb. A.12).

Joghurt aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch wurde mit einer hohen „Gesamtintensität“ bewertet (Abb. A.13), die durch das Taste-Panel über das Vokabular zur Beurteilung von Joghurt hinaus (Tab. 3.4) als „Stallgeruch“ beschrieben wurde. Ein Zusammenhang der Bildung dieses Aromas mit einem höheren mikrobiellen Proteolysegrad in Joghurt aus glucoseoxidasebehandelter Milch ist nicht auszuschließen. Sarkar und Misra (1994) bestätigten höhere Proteolysegrade in Dahi-Joghurt durch Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase.



**Abb. 4.19.** Sensorische Bewertung<sup>1)</sup> von Joghurt aus unbehandelter (—) und aus laccasebehandelter<sup>2)</sup> (---) Joghurtmilch

Auss. = Aussehen, Ger. = Geruch, Ges. = Geschmack, Kons. = Konsistenz

<sup>1)</sup> sensorische Bewertung nach DIN 10967-1

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015 µmol phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt, 2 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. 4.20.** Joghurt aus unbehandelter (links) und aus laccasebehandelter (rechts) Joghurtmilch<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,015 µmol Chlorogensäure, 2 h, 40°C, pH 7,0

### **Aussehen**

Unterschiede des Aussehens von Joghurt konnten im Wesentlichen für die Farbe von Joghurt aus lactoperoxidase- oder aus laccasebehandelter Joghurtmilch festgestellt werden. In Übereinstimmung mit Abbildung 4.20 wurde Joghurt aus lactoperoxidase- oder aus laccasebehandelter Joghurtmilch als grau-braun wahrgenommen (Abb. 4.19, Abb. A.12).

Mehanna und Hewnawy (1988), Özer und Atamer (1999), Kumar und Mathur (1989) und Prasad und Sukumaran (1992) konnten keine wesentlichen Unterschiede der sensorischen Eigenschaften zwischen Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus wasserstoffperoxidbehandelter Joghurtmilch nachweisen. In der Literatur werden als Folge einer Behandlung von Joghurtmilch mit Wasserstoffperoxid eine geringere Aromaintensität von Joghurt (Kumar und Mathur 1989, Zall et al. 1983), eine hellere Farbe der Produkte (Khalid und Massud 2004), ein Oxidation von Milchfetten (Özer und Atamer 1999) und höhere Gehalte an den geschmackswirksamen Verbindungen Diacetyl und Acetoin in Joghurt (Sarkar und Misra 1994) berichtet.

## 4.2. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion

### 4.2.1. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen

Es wurde untersucht, unter welchen Reaktionsbedingungen Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden modifiziert wird. Angestrebt wurde ein hoher prozentualer Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion und die Bildung löslicher *Maillard*-Produkte mit hoher Molmasse aus Protein und Saccharid.

Durch SDS-PAGE wurde ermittelt, wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion bei einer Reaktionstemperatur von 40°C bis 70°C und bei einer relativen Feuchte von 10% bis 100% verändert. Als Reaktionszeit wurde die Zeit festgelegt, die maximal möglich war, um für die Analyse ausreichend lösliche *Maillard*-Produkte herzustellen. Zur *Maillard*-Reaktion wurden pulverförmige Mischungen aus Milcheiweiß und Saccharid ( $w/w = 1/11$  bis  $w/w = 10/11$ ) eingesetzt, die als Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder als Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden. Als Saccharide wurden Glucose, Lactose, Pektin, Dextran [40.000 g/mol] und Dextran [500.000 g/mol] verwendet.

Durch densitometrische Auswertung elektrophoretischer Untersuchungen konnte die Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion in Abhängigkeit von den einzelnen Reaktionsbedingungen quantifiziert werden.

#### Inkubationstemperatur

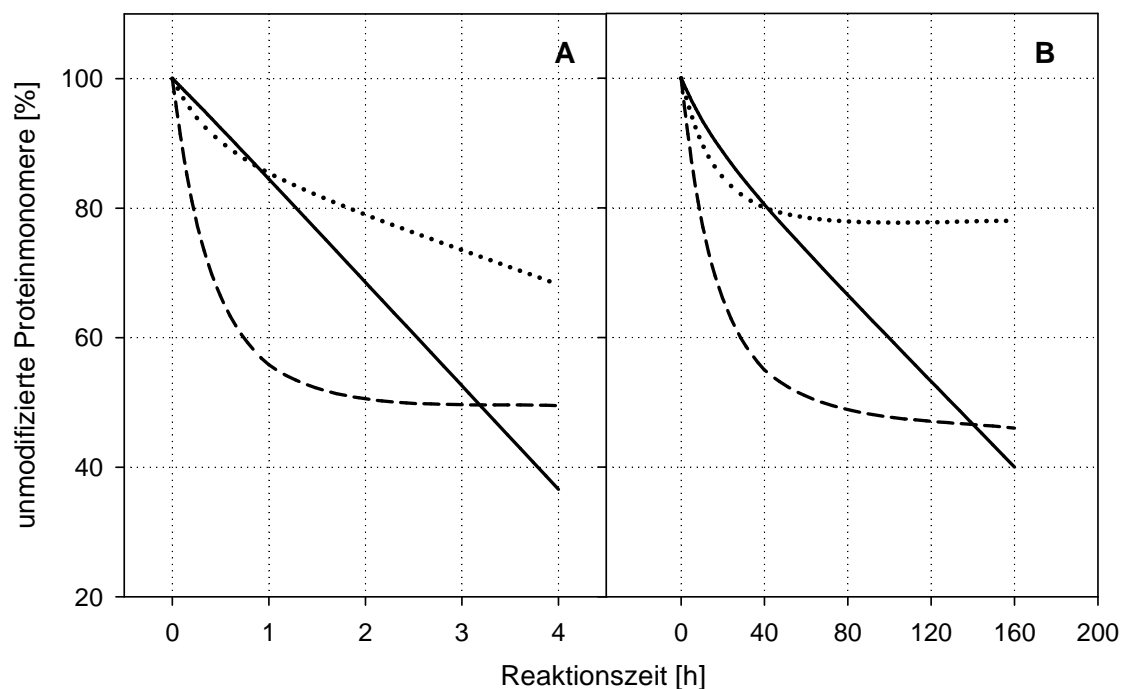
Abbildung 4.21 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß und der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose bei einer Reaktionstemperatur von 40°C und von 70°C dar.

Abbildung 4.21 zeigt, dass Proteinmonomere von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit modifiziert werden. Der Verlauf der Graphen bei 40°C (Abb. 4.21B) ähnelt im Wesentlichen dem Verlauf der Graphen bei 70°C Reaktionstemperatur (Abb. 4.21A). Der prozentuale Umfang einer Modifizierung von Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion über 4 Stunden bei 70°C entspricht in etwa dem prozentualen Umfang der Modifizierung von Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion über 160 Stunden bei 40°C. Auch Casal et al. (2005), Jiménez-Castaño et al. (2005b) und De Block et al. (2003) beobachteten für die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden einen positiven Zusammenhang zwischen der Reaktionstemperatur und der Reaktionsgeschwindigkeit.

Für die Modifizierung von Molkenproteinisolat ist dargestellt, dass der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion bei 70°C bis zum Ende der Reaktionszeit kontinuierlich abnimmt (Abb. 4.21A). Bei einer Reaktionstemperatur von 40°C verändert sich der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion nach etwa der Hälfte der Reaktionszeit nicht mehr (Abb. 4.21B). Quantitativ werden bei 70°C innerhalb der Reaktionszeit ~32% der Molkenproteinmonomere modifiziert (Abb. 4.21A), bei einer Reaktionstemperatur von 40°C insgesamt nur ~22% der Molkenproteinmonomere (Abb. 4.21B). Van Teeffelen et al. (2005) diskutierten, dass die globuläre Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen bei geringerer Reaktionstemperatur weniger stark entfaltet wird als bei höherer Reaktionstemperatur. Durch eine stärkere Entfaltung der Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen bei 70°C als bei 40°C können potenziell mehr funktionelle Gruppen durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose wechselwirken.

In der Literatur wurde eine *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden beschrieben bei Reaktionstemperaturen um 40°C (Fujiwara et al. 2007, Sithole et al. 2005, Casal et al. 2005), um 50°C (Handa und Kuroda 1999, Morgan et al. 1999a, Sun et al. 2006, Kato et al. 1988b), um 60°C (Oliver et al. 2006b, Chevalier et al. 2002, Scaman et al. 2006, Wooster und Augustin 2006, Fechner et al. 2007, Jiménez-Castaño et al. 2007, Pan et al. 2006, Diftis und Kiosseoglou 2006, Aminlari et al. 2005, Einhorn-Stoll et al. 2005), um 80°C (Akhtar und Dickinson 2003) und von  $\geq 100^\circ\text{C}$  (Yilmaz und Toledo 2005, Ajandouz et al. 2007, Moreaux und Birlouez-Aragon 1997, Morales und Jimenez-Perez 1998, Brands et al. 2002).

Nach Malec et al. (2002) und De Block et al. (2003) beeinflusst die Reaktionstemperatur die *Maillard*-Reaktion stärker als die relative Feuchte. Einhorn-Stoll et al. (2005) wiesen nach, dass die Eigenschaften von *Maillard*-Produkten weniger durch die Reaktionsbedingungen bestimmt werden als durch die chemischen Eigenschaften von Protein und Saccharid. Nach Angaben der Autoren veränderte sich die Tertiärstruktur von Milcheiweißmolekülen besonders durch eine *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden bei hoher Reaktionstemperatur und gleichzeitig hoher relativer Feuchte.



**Abb. 4.21.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (····) und in Gesamtmilchprotein (---) durch *Maillard*-Reaktion<sup>2)</sup> bei 70°C (A) oder bei 40°C (B) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C (A) oder 40°C (B), 65% r. F., 0 h - 160 h



### Relative Feuchte (r. F.)

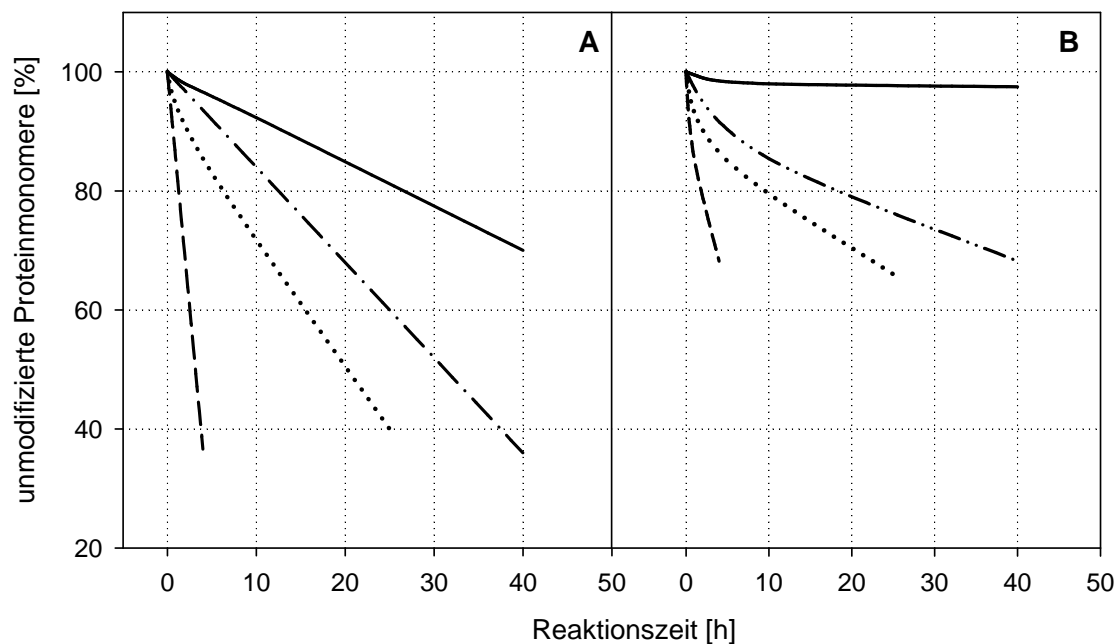
Abbildung 4.22 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß und der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose bei einer relativen Feuchte von 10%, von 40%, von 65% und von 100% dar.

Abbildung 4.22 verdeutlicht, dass Proteinmonomere in Milcheiweiß in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei verschiedenen Werten der relativen Feuchte durch *Maillard*-Reaktion umgesetzt werden. Die Graphen in Abbildung 4.22 zeigen für die *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucose und für die *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Glucose, dass bei einer relativen Feuchte von 65% pro Zeiteinheit prozentual erheblich mehr Proteinmonomere modifiziert werden als bei einer relativen Feuchte von 40%. Bei 40% r. F. werden pro Zeiteinheit prozentual mehr Proteinmonomere modifiziert als bei einer relativen Feuchte von 100%. Der quantitativ geringste Anteil an Proteinmonomeren in Milcheiweiß wird bei einer relativen Feuchte von 10% durch *Maillard*-Reaktion modifiziert (Abb. 4.22). Nach eigenen Beobachtungen bräunen Protein/Saccharid-Mischungen bei einer relativen Feuchte von 100% stärker als bei einer relativen Feuchte von 65%.

In der Literatur wurde eine *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden beschrieben bei einer relativen Feuchte um 10% (Thomas et al. 2004b), um 40% (Handa und Kuroda 1999, Sithole et al. 2005, Jiménez-Castaño et al. 2007), um 65% (van Teeffelen et al. 2005, Matsudomi et al. 2002, Oliver et al. 2006a, Wooster und Augustin 2007, Fujiwara et al. 2007, Einhorn-Stoll et al. 2005), um 80% (Oliver et al. 2006a, Aminlari et al. 2005) und bei 100% (Chevalier et al. 2001a, Ajandouz et al. 2007, Brands et al. 2002, Yilmaz und Toledo 2005, Ho et al. 2000).

In den eigenen Untersuchungen wurde die stärkste Abnahme an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion bei einer relativen Feuchte von 65% erreicht (Abb. 4.22). Auch nach Thomas et al. (2004b), Morgan et al. (1999a), Malec et al. (2002), Troyano et al. (1994) und Jiménez-Castaño et al. (2005b) läuft die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden besonders bei einer relativen Feuchte von 55% - 65% ab. Eine relative Feuchte <50% schränkt die Diffusion und die Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen von Protein und Saccharid ein. Eine hohe relative Feuchte vermindert die Dichte an Substratmolekülen und die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion von Protein und Saccharid (Morgan et al. 1999a, Oliver et al. 2006b). Nach Oliver et al. (2006a) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der *Maillard*-Reaktion mit der relativen Feuchte bis 80% r. F. an. Morgan et al. (1999a) beschrieben, dass die *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lactose um den Faktor 20 schneller bei einer relativen Feuchte von 65% abläuft als bei einer relativen Feuchte von 100%.

Guyomarc'h et al. (2000) wiesen nach, dass die *Maillard*-Reaktion von Casein durch die relative Feuchte weniger stark beeinflusst wird als die *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein. Nach De Block et al. (2003) wird  $\alpha$ -Lactalbumin durch *Maillard*-Reaktion in Milch stärker lactosyliert als durch *Maillard*-Reaktion in Milchpulver.



**Abb. 4.22.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> durch *Maillard*-Reaktion<sup>2)</sup> bei 10% (—), bei 40% (····), bei 65% (---) und bei 100% (-·-·-) relativer Feuchte in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

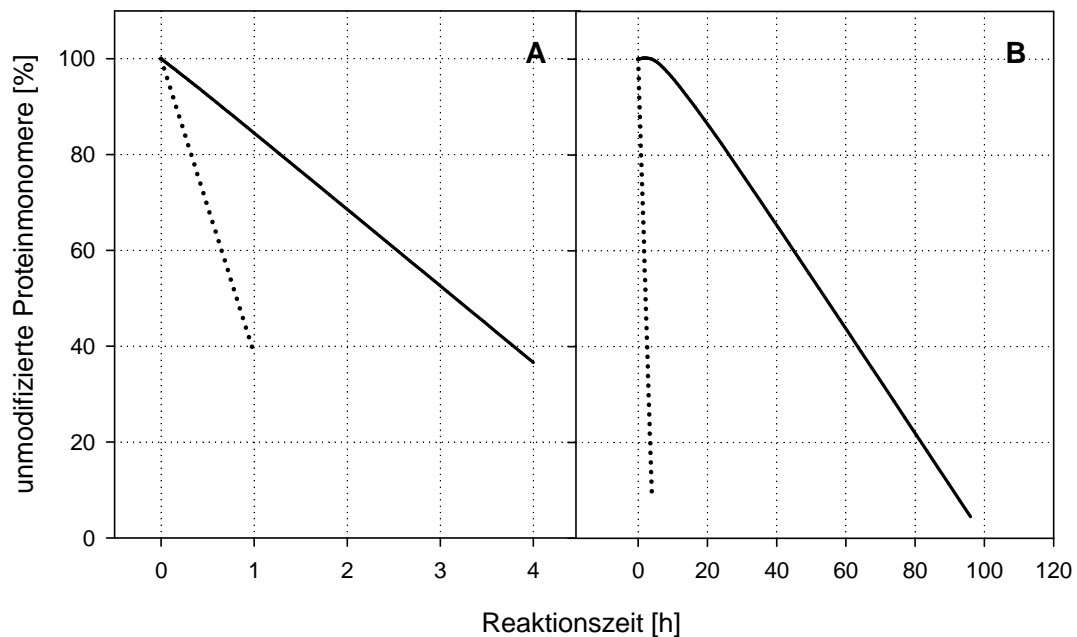
<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucose (w/w = 1/2) (A) oder *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Glucose (w/w = 1/2) (B), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 10% r. F. - 100% r. F., 0 h - 40 h

#### Art der Mischung von Protein und Saccharid

Abbildung 4.23 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß und der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion in Protein/Saccharid-Pulvermischungen und in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen dar. Abbildung 4.23 zeigt für die *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat/Glucose-Mischungen und von Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen, dass der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen pro Zeiteinheit quantitativ stärker vermindert wird als in Protein/Saccharid-Pulvermischungen. Unmodifizierte Proteinmonomere in Lyophilisaten aus Natriumcaseinat/Glucose-Lösungen werden durch *Maillard*-Reaktion etwa um den Faktor 4 schneller modifiziert als Proteinmonomere in Natriumcaseinat/Glucose-Pulvermischungen (Abb. 4.23A). Unmodifizierte Proteinmonomere in Lyophilisaten aus Natriumcaseinat/Lactose-Lösungen werden durch *Maillard*-Reaktion etwa um den Faktor 24 schneller modifiziert als Proteinmonomere in Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischungen (Abb. 4.23B).

Es ist wahrscheinlich, dass die funktionellen Gruppen von Protein und Saccharid in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen stärker miteinander wechselwirken können als in Protein/Saccharid-Pulvermischungen, da sie räumlich weniger weit voneinander entfernt vorliegen.

Vergleichende Untersuchungen zur Modifizierung von Proteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion von Protein/Saccharid-Pulvermischungen und von Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen liegen in der Literatur bisher nicht vor.



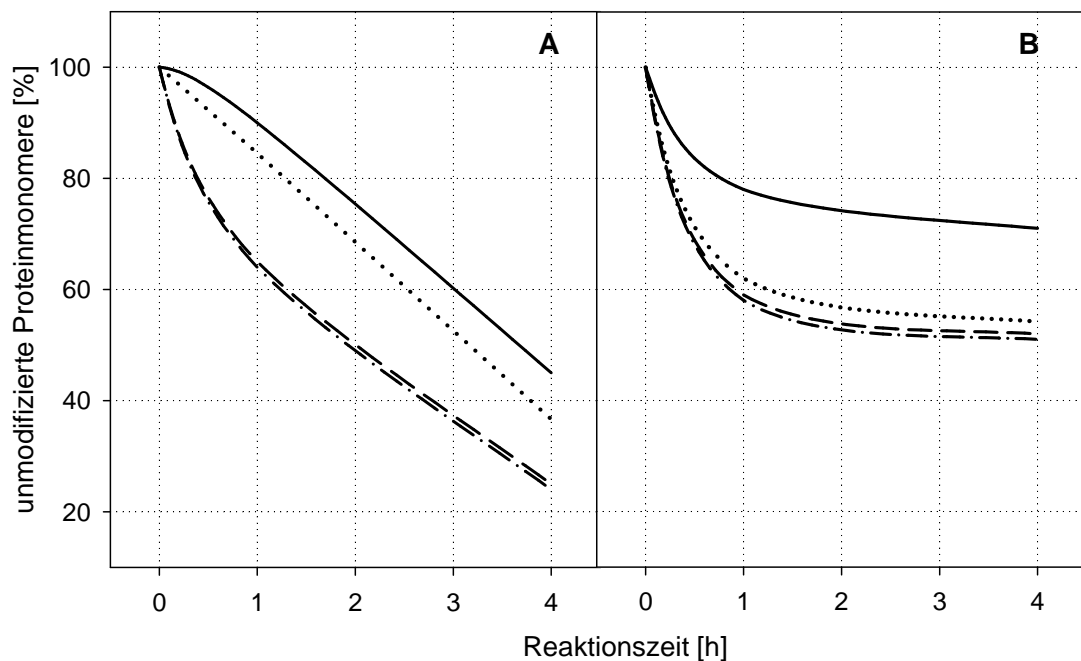
**Abb. 4.23.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Protein/Saccharid-Pulvermischungen (—) oder in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen (····) durch *Maillard*-Reaktion<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucose (A) (w/w = 1/2) oder von Natriumcaseinat mit Lactose (B) (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 96 h

### Verhältnis der Mischung von Protein und Saccharid

Abbildung 4.24 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß und der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion in Protein/Saccharid-Mischungen dar. Abgebildet werden unmodifizierte Proteinmonomere in Natriumcaseinat, das im Gewichtsverhältnis von w/w = Protein/Saccharid = 1/11 bis w/w = 10/11 mit Glucose oder mit Pektin inkubiert wurde (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Protein/Saccharid-Mischungen<sup>2)</sup> durch *Maillard*-Reaktion<sup>3)</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> Protein/Saccharid-Mischung von w/w = 10/11 (—), von w/w = 1/2 (·····), von w/w = 1/6 (---) oder von w/w = 1/11 (-·-·-)

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucose (A) oder von Natriumcaseinat mit Pektin (B), 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h

Nach Abbildung 4.24 werden pro Zeiteinheit mehr Proteinmonomere in Milcheiweiß modifiziert, wenn eine höhere Menge an Saccharid pro g Milcheiweiß zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt wird. Die größten Unterschiede im Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß sind zwischen Protein/Saccharid-Mischungen dargestellt, die im Gewichtsverhältnis von w/w = Protein/Saccharid = 1/6 bis w/w = 10/11 zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt wurden (Abb. 4.24).

Oliver et al. (2006a) berichteten, dass prozentual mehr Lysylreste in Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion mit Fructose modifiziert werden, wenn eine höhere Menge an Fructose pro g Protein eingesetzt wird. Die Modifizierung von Lysylresten stieg bis zu einem Gewichtsverhältnis von w/w = Protein/Saccharid = 5/6 an. Die Autoren diskutierten, dass die funktionellen Gruppen von Proteinmolekülen sehr schnell mit Saccharidmolekülen abgesättigt werden, wenn Natriumcaseinat und Fructose in einem Gewichtsverhältnis von w/w < 5/6 miteinander inkubiert werden. Als Folge werden weniger Protein/Protein-Wechselwirkungen ausgebildet.

Nach eigenen Beobachtungen wurde für *Maillard*-Produkte aus Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w \leq 1/6$ ) eine stärkere Bräunung, eine stärkere Hygroskopizität und eine geringere Löslichkeit festgestellt als für *Maillard*-Produkte aus Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w > 1/6$ ). Daher wurden für weitergehende Untersuchungen (Kap. 4.2.2. - 4.2.9.) Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w = 1/2$ ) eingesetzt.

### Reaktionszeit

Die Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion ist nach eigenen Beobachtungen und nach Angaben in der Literatur sehr stark abhängig von den Reaktionsbedingungen (De Block et al. 2003), den chemischen Eigenschaften von Protein und Saccharid (van Boekel 2001, Einhorn-Stoll et al. 2005) und den *Maillard*-Produkten, die synthetisiert werden sollen. Die Reaktionszeit, die zur *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose, Lactose, Pektin und Dextran gewählt wurde, wird in den Kapiteln 4.2.2. - 4.2.5. diskutiert.

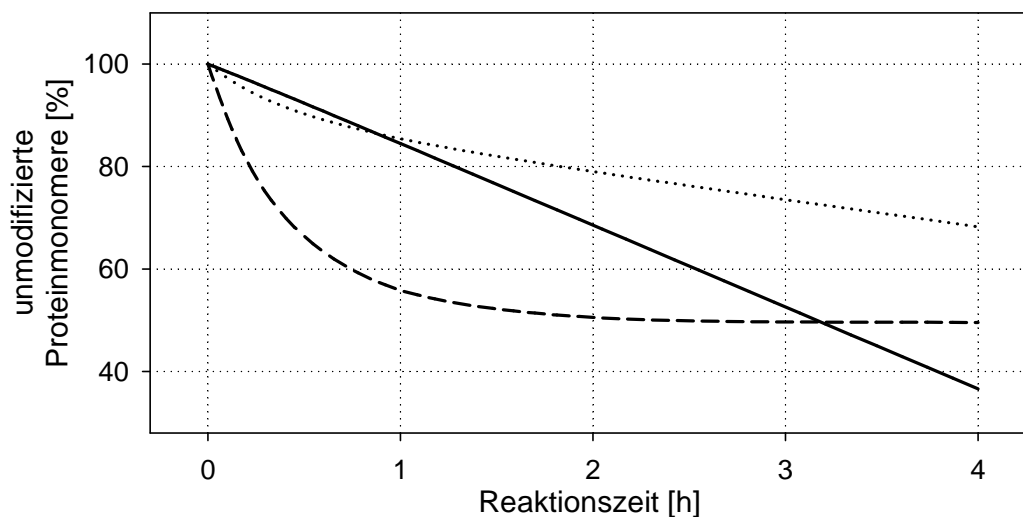
In der Literatur werden Reaktionszeiten von wenigen Minuten (Yilmaz und Toledo 2005, Moreaux und Birlouez-Aragon 1997), von Stunden (Morales und Jimenez-Perez 1998, Brands et al. 2002, van Teeffelen et al. 2005, Ho et al. 2000, Fechner et al. 2007, Oliver et al. 2006a, Scaman et al. 2006, Al-Hakkak und Kavale 2002, Aminlari et al. 2005, Nacka et al. 1998), von Tagen (Oliver et al. 2006b, Chevalier et al. 2001a, Jiménez-Castaño et al. 2007), von Wochen (Wooster und Augustin 2007, Choi et al. 2005, Mishra et al. 2001, Kika et al. 2007, Dickinson und Izgi 1996, Diftis et al. 2005, Einhorn-Stoll et al. 2005) und darüber hinaus berichtet (Sithole et al. 2005, Thomas et al. 2004b).

#### 4.2.2. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose

Milcheiweiß in Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w = 1/2$ ) wurde durch *Maillard*-Reaktion bei  $70^\circ\text{C}$  und 65% r. F. mit Glucose modifiziert (Kap. 3. 2.2.2.).

Durch SDS-PAGE wurde ermittelt wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose verändert. Durch densitometrische Auswertung elektrophoretischer Untersuchungen konnte der Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß/Glucose-Mischungen und in Milcheiweiß/Glucose-*Maillard*-Produkten quantifiziert werden.

Abbildung 4.25 stellt dar, wie sich der prozentuale Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose in Abhängigkeit von der Reaktionszeit verändert. Nach Abbildung 4.25 werden durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose über eine Reaktionszeit von 1 h etwa 45% der Proteinmonomere in Gesamtmilchprotein modifiziert, etwa 15% der Monomere in Natriumcaseinat und etwa 15% der Monomere in Molkenproteinisolat. Maximal 62% der Monomere in Natriumcaseinat, maximal 30% der Monomere in Molkenproteinisolat und maximal 50% der Monomere in Gesamtmilchprotein können unter den gegebenen Bedingungen in einer Reaktionszeit von 4 h durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose modifiziert werden (Abb. 4.25) bis nach eigenen Beobachtungen stark braun gefärbte, unlösliche Reaktionsprodukte entstehen.



**Abb. 4.25.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat<sup>2)</sup> (—), in Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (····) und in Gesamtmilcheiweiß<sup>3)</sup> (---) durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose

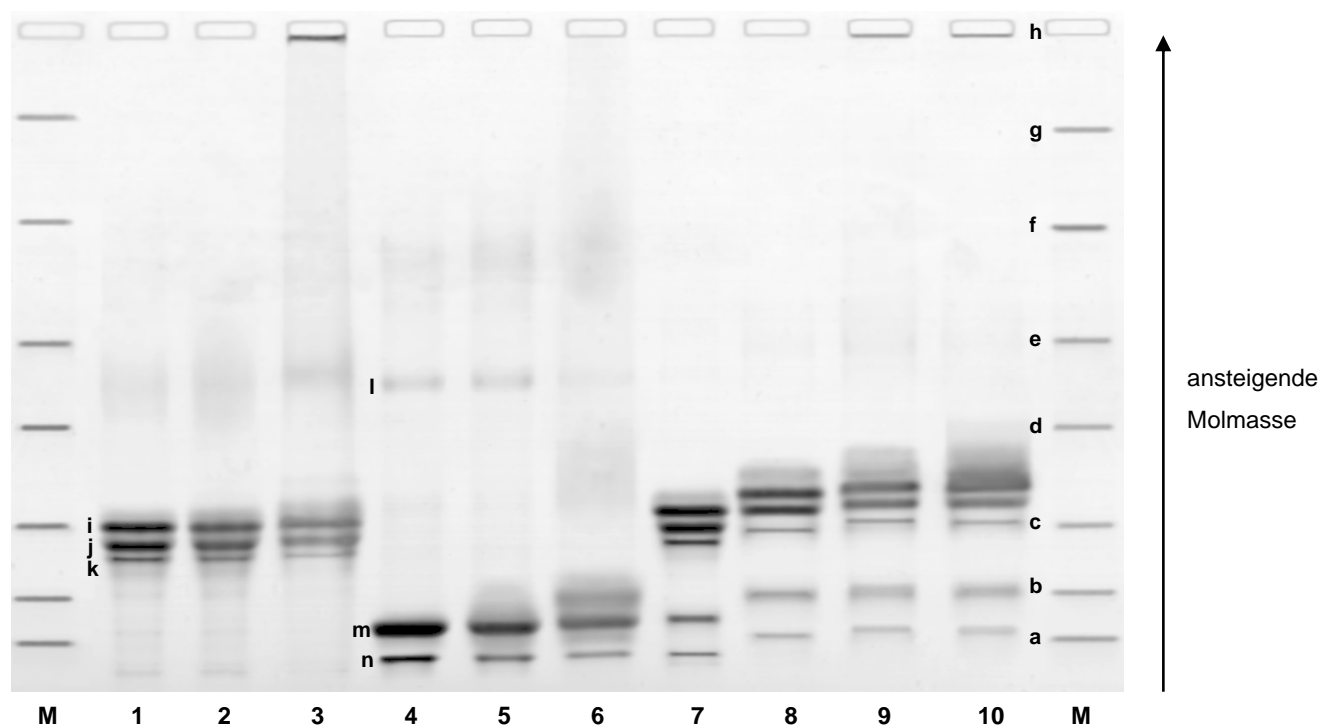
<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose ( $w/w = 1/2$ ), Protein/Saccharid-Pulvermischung,  $70^\circ\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 4 h

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver,  $70^\circ\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 4 h

Natriumcaseinat/Glucose-Mischungen und lactosehydrolysiertes Magermilchpulver bräunten nach eigenen Beobachtungen durch *Maillard*-Reaktion besonders stark und waren sehr hygroskopisch. Eine stärkere Bräunung von Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose im Vergleich zur *Maillard*-Reaktion von Protein mit Lactose berichteten Oliver et al. (2006b) für Natriumcaseinat und Kato et al. (1986) für Ovalbumin. Nach Fernández et al. (2003) führt die *Maillard*-Reaktion, die zwischen Gesamtmilchprotein und Glucose während der Lagerzeit von lactosehydrolysiertem Milchpulver abläuft, zu einer starken Bräunung, Hygroskopizität und Verklumpung von lactosehydrolysiertem Milchpulver. Kato et al. (1988b) wiesen nach, dass durch *Maillard*-Reaktion von Hühnereieiweiß mit Glucose im Vergleich zur *Maillard*-Reaktion von Hühnereieiweiß mit Lactose eine stärkere Bräunung und ein höherer Grad der Polymerisierung von Protein erreicht wird.

Abbildung 4.26 stellt die Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose dar. Anhand der Banden der Elektropherogramme von Molmassenstandards ist eine Identifizierung von Molmassen in Proteinproben möglich.



**Abb. 4.26.** Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten<sup>1)</sup> aus Milcheiweiß und Glucose

1 = NC + G [0 h]; 2 = NC + G [1 h]; 3 = NC + G [4 h]; 4 = MPI + G [0 h]; 5 = MPI + G [1 h]; 6 = MPI + G [4 h]; 7 = MP<sub>OLH</sub> [0 h]; 8 = MP<sub>mLH</sub> [0 h]; 9 = MP<sub>mLH</sub> [1 h]; 10 = MP<sub>mLH</sub> [4 h]; M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>OLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver; G = Glucose; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein, j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, l = Serumalbumin, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h **oder** *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h

Abbildung 4.26 zeigt, dass Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose in Abhängigkeit von der Reaktionszeit abgeschwächt werden und dass Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse gebildet werden. Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.26, Banden „i“, „j“, „k“), von Molkenproteinisolat (Abb. 4.26, Banden „l“, „m“, „n“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.26, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden vermindert. Verschiedene Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse bis an die mit „h“ bezeichnete Trenngrenze ( $\geq 3 \times 10^5$  g/mol) des PAGE-Gels werden gebildet (Abb. 4.26).

**Tab. 4.17.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen		
	Molmassenfractionen [g/mol]		
	$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC + G [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC + G [4 h] <sup>2)</sup>	54,8	28,3	16,9
MPI + G [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI + G [4 h] <sup>2)</sup>	10,6	49,1	40,3
MP <sub>mLH</sub> [0 h]	19,9	65,8	14,3
MP <sub>mLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>	24,6	66,3	9,1

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, G = Glucose

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

Eine Quantifizierung einzelner Molmassenfractionen nach Tabelle 4.17 ergibt, dass *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat und Glucose zu ~55% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol bestehen.  $\alpha_S$ -Casein,  $\beta$ -Casein und  $\kappa$ -Casein werden in etwa gleichem quantitativen Umfang durch *Maillard*-Reaktion umgesetzt (Tab. A.8).

In der Literatur wurde berichtet, dass bei einer Glycosylierung von Casein mit Glucose durch chemische Alkylierung (Lee et al. 1979, Courthaudon et al. 1989, Jing und Kitts 2002) oder durch *Maillard*-Reaktion (Oliver et al. 2006a, Oliver et al. 2006b, Brands et al. 2002, Scaloni et al. 2002) heterogene Reaktionsprodukte gebildet werden. Verschieden viele Glucosemoleküle und verschieden viele Proteinmoleküle wechselwirken miteinander (Courthaudon et al. 1989). Oligomere bis polymere Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte entstehen (Oliver et al. 2006b, Ajandouz et al. 2007). Courthaudon et al. (1989) stellten fest, dass  $\alpha_S$ -Casein in Natriumcaseinat durch chemische Alkylierung mit Glucose stärker umgesetzt wird als  $\beta$ -Casein oder als  $\kappa$ -Casein.



Durch *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Glucose werden Reaktionsprodukte gebildet, die zu 49,1% des Gesamtproteins aus Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol bestehen und zu 10,6% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.17).  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin werden in quantitativ gleichem Umfang durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose umgesetzt (Tab. A.9).

Chevalier et al. (2001a), Chevalier et al. (2001b), van Teeffelen et al. (2005), Nacka et al. (1998) und Broersen et al. (2004) untersuchten die *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Glucose, Nacka et al. (1998) und Sun et al. (2006) die *Maillard*-Reaktion von  $\alpha$ -Lactalbumin mit Glucose und Yeboah et al. (1999) und Ajandouz et al. (2007) die *Maillard*-Reaktion von Blutserumalbumin mit Glucose. Heterogene, oligomere Reaktionsprodukte (Chevalier et al. 2002, Nacka et al. 1998, Sun et al. 2006) wurden über kovalente Bindungen, über hydrophobe Wechselwirkungen und über Disulfidbrückenbindungen (Chevalier et al. 2001b) ausgebildet. Chevalier et al. (2001b) zeigten, dass im Wesentlichen Aminosäurenreste an der Oberfläche von  $\beta$ -Lactoglobulinmolekülen glycosyliert werden. Nach Broersen et al. (2004) und Chevalier et al. (2001b) wurde die Molekülkonformation von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose nicht wesentlich verändert. Nacka et al. (1998) beobachteten bei einer Erhitzung von Molkenprotein mit Glucose in wässriger Lösung, dass  $\alpha$ -Lactalbumin schneller durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose glycosyliert wurde als  $\beta$ -Lactoglobulin.

Die Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver verändert sich quantitativ durch *Maillard*-Reaktion nur wenig (Tab. 4.17). Tabelle 4.17 gibt für die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Glucose im Wesentlichen nur eine Zunahme von Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol von 19,9% in unbehandeltem Gesamtmilchprotein auf 24,6% in Gesamtmilchprotein/Glucose-*Maillard*-Produkten an. Betrachtet man die Veränderungen der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion qualitativ, zeigt Abbildung 4.26, dass die Molmasse der einzelnen Milcheiweißfraktionen (Abb. 4.26, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt.

Nach Tabelle A.10 werden Caseinmonomere in Gesamtmilcheiweiß prozentual stärker durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose umgesetzt als Molkenproteinmonomere. Auch nach van Boekel (1998) werden besonders Caseinmoleküle in Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose modifiziert. Fernández et al. (2003) wiesen eine *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Glucose in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver nach.

Ein Vergleich der Elektropherogramme von Protein in Magermilchpulver (Abb. 4.26, Elektropherogramm 7) und von Protein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver (Abb. 4.26, Elektropherogramm 8) zeigt, dass die Monomerenbanden von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver eine höhere Molmasse aufweisen als die Monomerenbanden von Gesamtmilchprotein in unbehandeltem Magermilchpulver. Es ist wahrscheinlich, dass Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen von Milcheiweiß und Glucose bereits während der Herstellung (Guyomarc'h et al. 2000) und der Lagerung von lactosehydrolysiertem Magermilchpulver (Fernández et al. 2003) aufgetreten sind.

In der Literatur wird die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden neben einer Modifizierung der Molmasse von Protein (Tab. 4.17) mit einer Modifizierung funktioneller Gruppen von Aminosäureseitenketten und der Bildung von Markersubstanzen wie Hydroxymethylfurfural (Morales und Jiménez-Pérez 1998, Morales et al. 1996) und Furosin (van

Boekel 1998) in Verbindung gebracht. Obwohl Furosin als Indikator der *Maillard*-Reaktion in Milch und in Milchproteinprodukten verwendet wird (Villamiel und Corzo 2000), wurde Furosin in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt, da es als Indikator der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin und Dextran (Jiménez-Castaño et al. 2007) ungeeignet ist.

**Tab. 4.18.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose

	Gehalt der Lösung an		
	löslichem Aminostickstoff [µg/mg Protein]	SH-Gruppen [µmol/g Protein]	HMF [nmol/g Pulver]
NC + G [0 h]	4,07 ± 0,01	0,33 ± 0,01	2,64 ± 0,05
NC + G [1 h] <sup>1)</sup>	7,41 ± 0,37	0,30 ± 0,03	20,65 ± 0,93
NC + G [4 h] <sup>1)</sup>	4,31 ± 0,24	0,28 ± 0,01	23,11 ± 0,98
NC + G [1 h] <sup>2)</sup>	1,82 ± 0,09	0,25 ± 0,02	20,93 ± 1,21
MPI + G [0 h]	12,24 ± 0,08	2,10 ± 0,03	0,00 ± 0,00
MPI + G [1 h] <sup>1)</sup>	11,13 ± 0,25	2,11 ± 0,02	12,96 ± 0,32
MPI + G [4 h] <sup>1)</sup>	6,30 ± 0,39	2,05 ± 0,04	15,12 ± 0,78
MPI + G [1 h] <sup>2)</sup>	2,83 ± 0,27	1,87 ± 0,04	21,61 ± 1,10
MP <sub>mLH</sub> [0 h]	1,18 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,26 ± 0,04
MP <sub>mLH</sub> [1 h] <sup>3)</sup>	2,78 ± 0,12	0,33 ± 0,02	8,71 ± 0,45
MP <sub>mLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>	1,84 ± 0,17	0,33 ± 0,01	10,45 ± 0,31

HMF = Hydroxymethylfurfural, NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, G = Glucose

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

Ergebnisse zur Untersuchung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose auf den Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural sind in Tabelle 4.18 angegeben. Nach Tabelle 4.18 nimmt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß mit der Dauer einer *Maillard*-Reaktion um bis zu 77% ab. Durch eine *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat oder von Gesamtmilchprotein mit Glucose steigen die Werte an löslichem Aminostickstoff über eine Reaktionszeit von 1 h zunächst an und sinken dann ab (Tab. 4.18). In Milcheiweiß/Glucose-Mischungen, die als Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden, sinkt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch *Maillard*-Reaktion stärker ab als in Protein/Saccharid-Pulvermischungen (Tab. 4.18).

Eine Abnahme des Gehalts an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose ist nach Angaben in der Literatur im Wesentlichen auf eine Glycosylierung der ε-Aminogruppe von Lysin in Milcheiweiß zurückzuführen. Chevalier et al. (2001a) und Nacka et

al. (1998) zeigten, dass 20% - 41% der Aminogruppen von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose glycosyliert werden können. Sun et al. (2006) konnten 47% der Aminogruppen von  $\alpha$ -Lactalbumin mit Glucose modifizieren. Kato et al. (1986) und Kato et al. (1988b) wiesen eine Glycosylierung von Aminogruppen in Ovalbumin durch Glucose nach. Kato et al. (1988b), Yeboah et al. (1999) und Sun et al. (2006) gaben an, dass Glucose stärker mit den Aminogruppen von Eiweißen wechselwirkt als Fructose oder Lactose. Ajandouz et al. (2007) beobachteten eine negative Korrelation zwischen dem Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Casein oder in Blutserumalbumin und dem Grad der Proteinpolymerisierung, der durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose erreicht wurde.

In den eigenen Untersuchungen wurde abweichend von der Literatur beobachtet, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat und in Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose mit der Reaktionszeit zunächst ansteigt und dann absinkt (Tab. 4.18). Wechselwirkungen, die zwischen Proteinmolekülen in unbehandeltem Natriumcaseinat oder in Gesamtmilchprotein auftreten (Oommen et al. 2001), werden vermutlich durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose zunächst abgeschwächt. Als Folge werden in *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat oder Gesamtmilchprotein und Glucose solange höhere Werte an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen, wie die Zahl der Aminogruppen, die durch die geringeren Proteinwechselwirkungen freigesetzt werden, die Zahl der Aminogruppen übersteigt, die durch *Maillard*-Reaktion glycosyliert werden.

Der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß vermindert sich tendenziell mit der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion. Besonders geringe Gehalte an Sulfhydrylgruppen wurden für *Maillard*-Produkte bestimmt, die aus Lyophilisaten von Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden (Tab. 4.18). In Übereinstimmung mit einem geringeren Gehalt von Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß/Glucose-*Maillard*-Produkten als in unbehandeltem Milcheiweiß (Tab. 4.18) konnten Bouhallab et al. (1999) und Havea (2006) Disulfidbrückenbindungen zwischen Proteinmolekülen in *Maillard*-Produkten nachweisen (Bouhallab et al. 1999, Havea 2006).

Hydroxymethylfurfural wird in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in Milcheiweiß/Glucose-Mischungen gebildet (Tab. 4.18), besonders stark innerhalb der ersten Stunde der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (Tab. 4.18). Nach Morales et al. (1996) korreliert der Grad der Modifizierung von Lysylresten in Gesamtmilcheiweiß mit der Bildung von Hydroxymethylfurfural durch *Maillard*-Reaktion.

Ergänzend zu Tabelle 4.18 gibt Tabelle 4.19 einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in Milcheiweiß/Glucose-Mischungen und in Milcheiweiß/Glucose-*Maillard*-Produkten. Obwohl *Maillard*-Produkte von Aminosäureseitenketten während der Probenvorbereitung zur Aminosäureanalyse teilweise zerstört werden (De Block et al. 2003), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten durch *Maillard*-Reaktion abgeleitet werden (Nacka et al. 1998, Kato et al. 1988b, De Block et al. 2003, Moreno et al. 2002).

Tabelle 4.19 zeigt, dass Serin, Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Lysin in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose modifiziert werden. Glutaminsäure wird um bis zu 5% modifiziert, Leucin um bis zu 11%, Alanin um bis zu 21% und Lysin um bis zu 47% (Tab. 4.19). Eine prozentuale Abnahme des Gehalts an Methionin durch *Maillard*-Reaktion um bis zu 22% ist für Natriumcaseinat und für Molkenproteinisolat dargestellt (Tab. 4.19). In Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkten ist zusätzlich ein geringerer Gehalt

an Serin, an Phenylalanin und an Methionin angegeben als in unbehandelten Natriumcaseinat/Glucose-Mischungen (Tab. 4.19).

Brands et al. (2002) und Oliver et al. (2006a) berichteten für Casein und Glucose eine Modifizierung von Lysin und von Arginin. Oliver et al. (2006b) wiesen nach, dass Lysin in Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion bei 60°C und 67% r. F. über 48 h vollständig modifiziert werden kann. Nach Angaben der Autoren werden auch die Aminosäureseitenketten von Histidin und von Tryptophan durch *Maillard*-Reaktion von Casein mit Glucose modifiziert. Chevalier et al. (2001b) ermittelten, dass Lysin und Leucin durch *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Glucose glycosyliert werden.

**Tab. 4.19.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC + G [0 h]	NC + G [4 h] <sup>2)</sup>	MPI + G [0 h]	MPI + G [4 h] <sup>2)</sup>	MP <sub>mLH</sub> [0 h]	MP <sub>mLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>
Serin	<b>6,60</b>	<b>6,04</b>	4,56	4,37	6,23	6,40
Glutaminsäure	<b>20,30</b>	<b>19,32</b>	<b>17,24</b>	<b>17,06</b>	<b>19,89</b>	<b>19,15</b>
Alanin	<b>4,01</b>	<b>3,99</b>	<b>8,94</b>	<b>7,19</b>	<b>5,05</b>	<b>4,01</b>
Methionin	<b>3,28</b>	<b>2,57</b>	<b>3,26</b>	<b>2,87</b>	2,70	3,02
Leucin	<b>9,83</b>	<b>9,55</b>	<b>14,28</b>	<b>13,30</b>	<b>10,86</b>	<b>9,85</b>
Phenylalanin	<b>4,55</b>	<b>4,24</b>	2,91	3,20	4,03	4,16
Histidin	<b>3,10</b>	<b>2,78</b>	2,06	2,22	3,02	2,92
Lysin	<b>6,84</b>	<b>5,87</b>	<b>9,53</b>	<b>7,56</b>	<b>5,87</b>	<b>3,13</b>
Arginin	2,31	2,36	2,00	1,99	1,95	1,83

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, G = Glucose

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

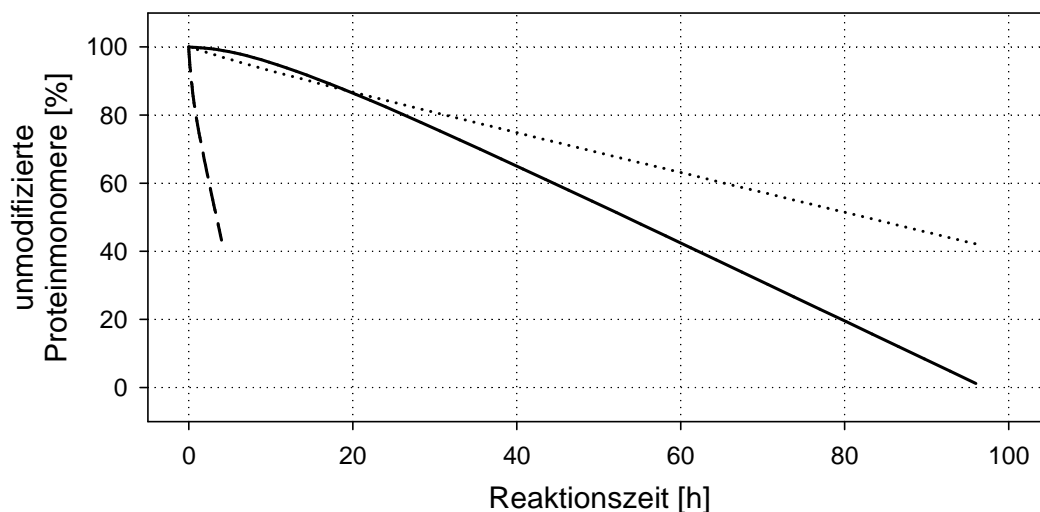
<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

#### 4.2.3. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose

Milcheiweiß in Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w = 1/2$ ) wurde durch *Maillard*-Reaktion bei  $70^{\circ}\text{C}$  und 65% r. F. mit Lactose modifiziert (Kap. 3. 2.2.2.).

Durch SDS-PAGE wurde ermittelt wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose verändert. Durch densitometrische Auswertung elektrophoretischer Untersuchungen konnte der Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß/Lactose-Mischungen und in Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten quantifiziert werden.

Abbildung 4.27 stellt dar, wie sich der prozentuale Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose in Abhängigkeit von der Reaktionszeit verändert. Nach Abbildung 4.27 wird durch *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Lactose über eine Reaktionszeit von 4 h etwa die Hälfte der Proteinmonomere modifiziert. Proteinmonomere in Natriumcaseinat und Proteinmonomere in Molkenproteinisolat werden in einer Reaktionszeit von 24 h zu 15% - 20% modifiziert (Abb. 4.27). Maximal 98% der Monomere in Natriumcaseinat, maximal 59% der Monomere in Molkenproteinisolat und maximal 56% der Monomere in Gesamtmilchprotein können unter den gegebenen Bedingungen in einer Reaktionszeit von bis zu 96 h durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert werden (Abb. 4.27) bis nach eigenen Beobachtungen stark braun gefärbte, unlösliche Reaktionsprodukte entstehen.



**Abb. 4.27.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat<sup>2)</sup> (—), in Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (····) und in Gesamtmilcheiweiß<sup>3)</sup> (---) durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose ( $w/w = 1/2$ ), Protein/Saccharid-Pulvermischung,  $70^{\circ}\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 96 h

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver,  $70^{\circ}\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 4 h

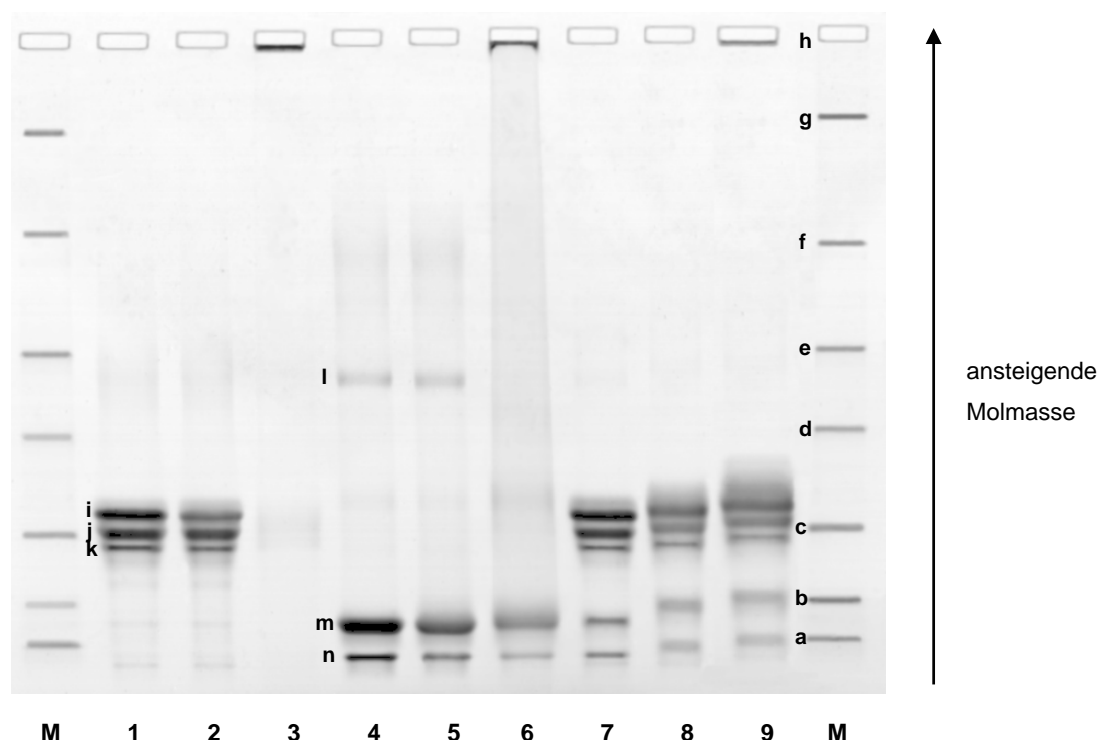
Innerhalb einer Reaktionszeit von 4 Stunden, in der Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert werden konnte, wurden Proteinmonomere von Gesamtmilchprotein pro Zeiteinheit schneller durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert als Proteinmonomere in Natriumcaseinat/Lactose- oder in Molkenproteinisolat/Lactose-Mischungen (Abb. 4.27). Da Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt wurde, wurden Protein und Saccharid nicht als Mischungen von Proteinpulver und Saccharidpulver hergestellt wie Natriumcaseinat/Lactose- oder Molkenproteinisolat/Lactose-Mischungen. Ein Vergleich kann hergestellt werden zwischen Magermilchpulver und Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen, für die in Kapitel 4.2.1. gezeigt wurde, dass Proteinmonomere in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen schneller durch *Maillard*-Reaktion modifiziert werden als Proteinmonomere in Protein/Saccharid-Pulvermischungen. Es wurde diskutiert, dass die funktionellen Gruppen von Protein und Saccharid in Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen stärker miteinander wechselwirken können als in Protein/Saccharid-Pulvermischungen, da sie räumlich weniger weit voneinander entfernt vorliegen.

Abbildung 4.28 stellt die Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose dar. Anhand der Banden der Elektropherogramme von Molmassenstandards ist eine Identifizierung von Molmassen in Proteinproben möglich. Nach Abbildung 4.28 werden Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose in Abhängigkeit von der Reaktionszeit abgeschwächt. Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse werden gebildet. Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.28, Banden „i“, „j“, „k“), von Molkenproteinisolat (Abb. 4.28, Banden „l“, „m“, „n“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.28, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden vermindert. Verschiedene Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse bis an die mit „h“ bezeichnete Trenngrenze ( $\geq 3 \times 10^5$  g/mol) des PAGE-Gels entstehen (Abb. 4.28).

Eine Quantifizierung einzelner Molmassenfraktionen nach Tabelle 4.20 zeigt, dass *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat und Lactose zu ~94% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol bestehen. Caseinmonomere werden durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose fast vollständig modifiziert (Tab. A.8). Tabelle A.8 zeigt, dass  $\alpha_S$ -Casein in Abhängigkeit von der Reaktionszeit schneller durch *Maillard*-Reaktion modifiziert wird als  $\beta$ -Casein oder als  $\kappa$ -Casein.

Eine Lactosylierung von Casein wurde berichtet für eine chemische Alkylierung mit Lactose (Lee et al. 1979) und für eine *Maillard*-Reaktion mit Lactose (Scaloni et al. 2002, Morales und Jiménez-Peréz 1998, Malec et al. 2002). Nach Scaloni et al. (2002) werden besonders die Aminosäureseitenketten von Lysin<sup>34</sup> in  $\alpha_S$ -Casein und von Lysin<sup>107</sup> in  $\beta$ -Casein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert. Courthaudon et al. (1989) stellten fest, dass  $\alpha_S$ -Casein in Natriumcaseinat durch chemische Alkylierung stärker mit Lactose modifiziert wird als  $\beta$ -Casein oder als  $\kappa$ -Casein. Nach Havea (2006) wird besonders  $\kappa$ -Casein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert.

Moreno et al. (2002) und Casal et al. (2005) beschrieben die *Maillard*-Reaktion von Caseinmacropeptid mit Lactose. Ein Molekül Caseinmacropeptid konnte mit bis zu vier Lactosemolekülen modifiziert werden. Die Konformation von Caseinmacropeptid veränderte sich durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose im Wesentlichen nicht (Moreno et al. 2002).



**Abb. 4.28.** Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten<sup>1)</sup> aus Milcheiweiß und Lactose

1 = NC + L [0 h]; 2 = NC + L [24 h]; 3 = NC + L [96 h]; 4 = MPI + L [0 h]; 5 = MPI + L [24 h];  
6 = MPI + L [96 h]; 7 = MP<sub>oLH</sub> [0 h]; 8 = MP<sub>oLH</sub> [1 h]; 9 = MP<sub>oLH</sub> [4 h]; M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver; L = Lactose; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha_S$ -Casein, j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, l = Serumalbumin, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 0 h - 96 h **oder** *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h

**Tab. 4.20.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfraktionen [g/mol]		
	>2 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>	<2 x 10 <sup>4</sup>
NC + L [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC + L [96 h] <sup>2)</sup>	94,4	3,2	2,4
MPI + L [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI + L [96 h] <sup>2)</sup>	18,7	51,5	29,8
MP <sub>oLH</sub> [0 h]	3,4	70,1	26,5
MP <sub>oLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>	10,1	78,1	11,8

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, L = Lactose

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

Proteinmonomere in Molkenproteinisolat - ausgedrückt als die Proteinfraction  $< 2 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.20) - werden durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose zu Reaktionsprodukten umgesetzt, die aus 51,5% Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und aus 18,7% Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol bestehen.  $\alpha$ -Lactalbumin wird nach Tabelle A.9 quantitativ stärker durch *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Lactose modifiziert als  $\beta$ -Lactoglobulin.

Eine *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein mit Lactose wurde untersucht für  $\beta$ -Lactoglobulin (Chevalier et al. 2001b, Chevalier et al. 2002, Nacka et al. 1998, Fenaille et al. 2004, French und Harper 2003, Morgan et al. 1999a, Morgan et al. 1999b, Moreaux und Bilouez-Aragon 1997, Thomas et al. 2004a, Leonil et al. 1997, Bouhallab et al. 1999, Burr et al. 1996) und für  $\alpha$ -Lactalbumin (Nacka et al. 1998). Es wurde festgestellt, dass durch *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lactose oligomere (Bouhallab et al. 1999, Chevalier et al. 2002) bis polymere (Chevalier et al. 2001b) *Maillard*-Produkte entstehen. Wechselwirkungen von  $\beta$ -Lactoglobulin-Monomeren über kovalente Bindungen, über hydrophobe Wechselwirkungen und über Disulfidbrückenbindungen wurden in  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkten nachgewiesen (Chevalier et al. 2002). Die Proteinstruktur von  $\beta$ -Lactoglobulin veränderte sich durch *Maillard*-Reaktion nur dann, wenn Protein und Saccharid in wässriger Lösung erhitzt wurden (Morgan et al. 1999a, Chevalier et al. 2002). Nach Morgan et al. (1999a), Burr et al. (1996) und Nacka et al. (1998) werden durch *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lactose heterogene Reaktionsprodukte gebildet, da verschieden viele Lactosemoleküle an die Moleküloberfläche von  $\beta$ -Lactoglobulin binden. Es wurde berichtet, dass Lactose durch *Maillard*-Reaktion unspezifisch an Aminosäurenreste von  $\beta$ -Lactoglobulin bindet (Nacka et al. 1998), dass aber besonders Lysin<sup>47</sup> mit Lactose modifiziert wird (Leonil et al. 1997). In Übereinstimmung mit Tabelle A.9 beobachteten Nacka et al. (1998), dass  $\alpha$ -Lactalbumin durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose schneller modifiziert wird als  $\beta$ -Lactoglobulin.

Für die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilcheiweiß in Magermilchpulver zeigt Tabelle 4.20, dass *Maillard*-Produkte gebildet werden, die zu 78,1% des Gesamtproteins aus Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol bestehen und zu 10,1% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol. Betrachtet man die Veränderungen der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion qualitativ, zeigt Abbildung 4.28, dass die Molmasse der einzelnen Milcheiweißfraktionen (Abb. 4.28, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt.

In der Literatur wurde berichtet, dass die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilcheiweiß mit Lactose während der Verarbeitung (Gyomarc'h et al. 2000) und während der Lagerung (Sithole et al. 2005, Gyomarc'h et al. 2000, Jones et al. 1998, Thomas et al. 2004b, Villamiel und Corzo 2000) von Milch und von Milchprodukten auftritt. Nach Thomas et al. (2004b) wechselwirken verschieden viele Lactosemoleküle mit Aminosäurenseitenketten an der Oberfläche von Caseinmicellen. Die Autoren sprechen daher von einer „multiplen Lactosylierung“ von Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose. Venkatachalam et al. (1993) beobachteten, dass Proteinmonomere von Milcheiweiß in konzentrierter Magermilch durch *Maillard*-Reaktion quervernetzt werden.



**Tab. 4.21.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose

	Gehalt der Lösung an		
	löslichem Aminostickstoff [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]	SH-Gruppen [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ Protein]	HMF [ $\text{nmol}/\text{g}$ Pulver]
NC + L [0 h]	4,07 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01	2,64 $\pm$ 0,05
NC + L [24 h] <sup>1)</sup>	6,66 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,01	12,30 $\pm$ 0,56
NC + L [96 h] <sup>1)</sup>	5,30 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,03	15,40 $\pm$ 0,85
NC + L [24 h] <sup>2)</sup>	4,47 $\pm$ 0,20	0,22 $\pm$ 0,04	5,50 $\pm$ 0,31
MPI + L [0 h]	12,24 $\pm$ 0,08	2,10 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00
MPI + L [24 h] <sup>1)</sup>	12,02 $\pm$ 0,15	2,08 $\pm$ 0,02	8,64 $\pm$ 0,34
MPI + L [96 h] <sup>1)</sup>	8,66 $\pm$ 0,14	2,05 $\pm$ 0,03	27,00 $\pm$ 1,02
MPI + L [24 h] <sup>2)</sup>	6,16 $\pm$ 0,02	1,72 $\pm$ 0,03	3,24 $\pm$ 0,21
MP <sub>oLH</sub> [0 h]	8,36 $\pm$ 0,26	0,40 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02
MP <sub>oLH</sub> [1 h] <sup>3)</sup>	7,56 $\pm$ 0,56	0,28 $\pm$ 0,02	13,06 $\pm$ 0,24
MP <sub>oLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>	3,85 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,02	26,12 $\pm$ 1,10

HMF = Hydroxymethylfurfural, NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, L = Lactose

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

In der Literatur wird die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden mit einer Modifizierung der Molmasse von Protein (Tab. 4.20), mit einer Modifizierung funktioneller Gruppen von Aminosäureseitenketten und mit der Bildung von Markersubstanzen wie Hydroxymethylfurfural (Morales und Jiménez-Pérez 1998, Morales et al. 1996) in Verbindung gebracht.

Ergebnisse zur Untersuchung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose auf den Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural sind in Tabelle 4.21 angegeben. Nach Tabelle 4.21 nimmt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß mit der Dauer einer *Maillard*-Reaktion um bis zu 56% ab. In Milcheiweiß/Lactose-Mischungen, die als Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden, sinkt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch *Maillard*-Reaktion stärker ab als in Protein/Saccharid-Pulvermischungen (Tab. 4.21).

Durch eine *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Lactose steigen die Werte an löslichem Aminostickstoff durch *Maillard*-Reaktion über 1 h zunächst an und sinken dann ab (Tab. 4.21). Wechselwirkungen, die zwischen Proteinmolekülen in unbehandeltem Natriumcaseinat auftreten (Oommen et al. 2001), werden vermutlich durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose zunächst abgeschwächt. Als Folge werden in *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat und Lactose solange höhere Werte an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen, wie die Zahl der Aminogruppen, die durch die geringeren Proteinwechselwirkungen freigesetzt werden, die Zahl der Aminogruppen übersteigt, die durch *Maillard*-Reaktion glycosyliert werden.

Dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose absinkt (Tab. 4.21), ist nach Angaben in der Literatur im Wesentlichen auf eine Glycosylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin durch *Maillard*-Reaktion zurückzuführen. Nach Chevalier et al. (2001a) und Nacka et al. (1998) sinkt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose um 20% - 36% ab. Lee et al. (1979) beobachteten geringere Gehalte an löslichem Aminostickstoff nach einer chemischen Alkylierung von Casein mit Lactose. Kato et al. (1988b) wiesen weniger löslichen Aminostickstoff in Ovalbumin/Lactose-*Maillard*-Produkten nach als in unbehandelten Ovalbumin/Lactose-Mischungen.

Der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß vermindert sich tendenziell mit der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion und fällt besonders niedrig in Protein/Saccharid-Mischungen aus, die aus Lyophilisaten von Protein/Saccharid-Lösungen hergestellt wurden (Tab. 4.21). In Übereinstimmung mit einem geringeren Gehalt von Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten als in unbehandeltem Milcheiweiß (Tab. 4.18) konnten Bouhallab et al. (1999), Morgan et al. (1999a), Morgan et al. (1999b) und Havea (2006) Disulfidbrückenbindungen zwischen Proteinmolekülen in *Maillard*-Produkten nachweisen.

Tabelle 4.21 zeigt, dass Hydroxymethylfurfural in Protein/Saccharid-Mischungen durch *Maillard*-Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit gebildet wird. Nach Morales et al. (1996) korreliert der Grad der Modifizierung von Lysylresten in Gesamtmilcheiweiß mit der Bildung von Hydroxymethylfurfural durch *Maillard*-Reaktion. Tabelle 4.21 zeigt, dass für *Maillard*-Produkte aus Protein/Saccharid-Pulvermischungen ein vergleichsweise höherer Gehalt an Hydroxymethylfurfural ermittelt wurde als für *Maillard*-Produkte aus Lyophilisaten von Protein/Saccharid-Lösungen. In Kapitel 4.2.1. wurde gezeigt, dass - unter den jeweils gleichen Reaktionsbedingungen - durch *Maillard*-Reaktion von Lyophilisaten aus Protein/Saccharid-Lösungen ein höherer Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren erreicht wird als durch *Maillard*-Reaktion von Protein/Saccharid-Pulvermischungen. Der Gehalt an Hydroxymethylfurfural in Protein/Lactose-Mischungen korreliert also nicht zwangsläufig mit der Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion, da Hydroxymethylfurfural auch durch eine Karamelisierung von Sacchariden während der Reaktionszeit entstehen kann (White 1979).

Ergänzend zu Tabelle 4.21 gibt Tabelle 4.22 einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in Milcheiweiß/Lactose-Mischungen und in Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten. Obwohl *Maillard*-Produkte von Aminosäureseitenketten während der Probenvorbereitung zur Aminosäureanalyse teilweise zerstört werden (De Block et al. 2003), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäureresten durch *Maillard*-Reaktion abgeleitet werden (Nacka et al. 1998, Kato et al. 1988b, De Block et al. 2003, Moreno et al. 2002).

Nach Tabelle 4.22 werden die Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Lysin in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose modifiziert. In Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten werden nach Tabelle 4.22 bis zu 23% weniger Glutaminsäure, bis zu 25% weniger Alanin, bis zu 14% weniger Leucin, bis zu 8% weniger Histidin und bis zu 29% weniger Lysin nachgewiesen als in unbehandelten Milcheiweiß/Lactose-Mischungen. In Molkenproteinisolat kann zusätzlich eine Abnahme des Gehalts an Methionin durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose festgestellt werden (Tab. 4.22).

**Tab. 4.22.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC + L	NC + L	MPI + L	MPI + L	MP <sub>oLH</sub>	MP <sub>oLH</sub>
	[0 h]	[96 h] <sup>2)</sup>	[0 h]	[96 h] <sup>2)</sup>	[0 h]	[4 h] <sup>3)</sup>
Glutaminsäure	<b>20,30</b>	<b>20,07</b>	<b>17,24</b>	<b>13,32</b>	<b>19,96</b>	<b>19,19</b>
Alanin	<b>4,01</b>	<b>3,31</b>	<b>8,94</b>	<b>8,57</b>	<b>5,09</b>	<b>3,82</b>
Methionin	3,28	3,30	<b>3,26</b>	<b>2,81</b>	2,61	2,82
Leucin	<b>9,83</b>	<b>9,09</b>	<b>14,28</b>	<b>12,80</b>	<b>11,04</b>	<b>9,53</b>
Phenylalanin	<b>4,55</b>	<b>4,25</b>	2,91	2,96	<b>4,28</b>	<b>4,11</b>
Histidin	<b>3,10</b>	<b>2,87</b>	2,06	2,05	<b>3,05</b>	<b>2,98</b>
Lysin	<b>6,84</b>	<b>4,85</b>	<b>9,53</b>	<b>8,59</b>	<b>7,94</b>	<b>6,31</b>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, L = Lactose

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

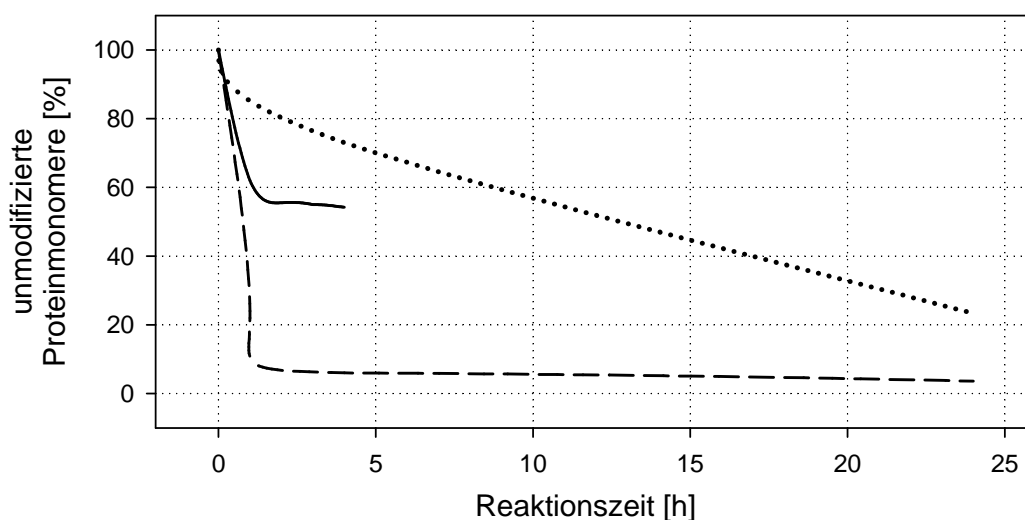
In der Literatur wird berichtet, dass durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose die Aminosäureseitenketten von Lysin (Oliver et al. 2006b, Moreaux und Bilouez-Aragon 1997, De Block et al. 2003, Chevalier et al. 2001b, Scaloni et al. 2002, Fenaille et al. 2004, Morgan et al. 1999a, Moreno et al. 2002), von Leucin (Fenaille et al. 2004, Chevalier et al. 2001b), von schwefelhaltigen Aminosäuren (Moreno et al. 2002, De Block et al. 2003), von Arginin (Oliver et al. 2006b, Fenaille et al. 2004), von Histidin (Oliver et al. 2006b) und von Tryptophan (Oliver et al. 2006b, De Block et al. 2003) modifiziert werden. Nach Moreaux und Bilouez-Aragon (1997) werden durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose bis zu 70% der Lysylreste und bis zu 55% der Tryptophanylreste in  $\beta$ -Lactoglobulin modifiziert. Oliver et al. (2006a) wiesen nach, dass 80% der Lysylreste in Natriumcaseinat über 24 h bei 60°C und 67% r. F. mit Lactose reagieren.

#### 4.2.4. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin

Milcheiweiß in Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w = 1/2$ ) wurde durch *Maillard*-Reaktion bei  $70^\circ\text{C}$  und 65% r. F. mit Pektin modifiziert (Kap. 3.2 .2.2.).

Durch SDS-PAGE wurde ermittelt wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin verändert. Durch densitometrische Auswertung elektrophoretischer Untersuchungen konnte der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß/Pektin-Mischungen und in Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkten quantifiziert werden.

Abbildung 4.29 stellt dar, wie sich der prozentuale Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit verändert. Nach Abbildung 4.29 werden durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin über 4 Stunden etwa 47% der Proteinmonomere in Natriumcaseinat modifiziert, etwa 26% der Proteinmonomere in Molkenproteinisolat und etwa 94% der Proteinmonomere in Gesamtmilchprotein (Abb. 4.29). Maximal 47% der Monomere in Natriumcaseinat, maximal 76% der Monomere in Molkenproteinisolat und maximal 96% der Monomere in Gesamtmilchprotein können unter den gegebenen Bedingungen durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin modifiziert werden (Abb. 4.29) bis stark braun gefärbte, unlösliche Reaktionsprodukte entstehen.

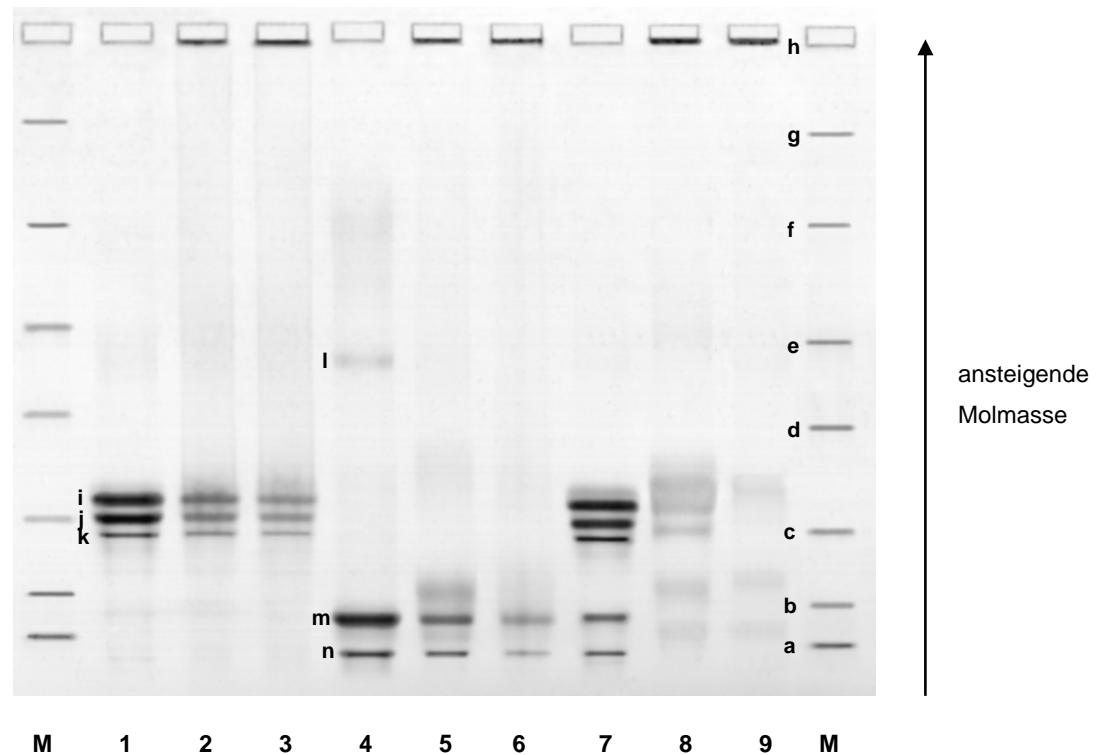


**Abb. 4.29.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (····) und in Gesamtmilcheiweiß (---) durch *Maillard*-Reaktion<sup>2)</sup> mit Pektin

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin ( $w/w = 1/2$ ), Protein/Saccharid-Pulvermischung,  $70^\circ\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 24 h

Nacka et al. (1998), Oliver et al. (2006a) und Lee et al. (1979) berichteten, dass sich die Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion von Protein und Saccharid verlängert, wenn Saccharide mit höherer Molmasse zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt werden. Ein Vergleich der Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose (Abb. 4.25), mit Lactose (Abb. 4.27) und mit Pektin (Abb. 4.29) zeigt, dass zur Modifizierung von Proteinmonomeren mit dem Polysaccharid Pektin nicht wesentlich längere Reaktionszeiten benötigt werden als zur Modifizierung von Proteinmonomeren mit dem Monosaccharid Glucose oder mit dem Disaccharid Lactose. Nach den Abbildungen 4.27 und 4.29 reagiert Pektin mit einer Molmasse von 150.000 g/mol schneller mit Monomeren von Milcheiweiß als Lactose mit einer Molmasse von 342 g/mol. Es ist wahrscheinlich, dass Pektin durch die zahlreichen, reduzierend wirkenden Gruppen in den Seitenketten von Pektinmolekülen schneller mit den funktionellen Gruppen von Milcheiweiß wechselwirken kann als Lactose mit nur einer reduzierend wirkenden funktionellen Gruppe pro Lactosemolekül.



**Abb. 4.30.** Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten<sup>1)</sup> aus Milcheiweiß und Pektin

1 = NC + P [0 h]; 2 = NC + P [1 h]; 3 = NC + P [4 h]; 4 = MPI + P [0 h]; 5 = MPI + P [5 h];  
6 = MPI + P [24 h]; 7 = MP + P [0 h]; 8 = MP + P [5 h]; 9 = MP + P [24 h]; M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver;  
P = Pektin; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha_S$ -Casein,  
j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, l = Serumalbumin, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung,  
70°C, 65% r. F., 0 h - 24 h

Abbildung 4.30 stellt die Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Pektin dar. Abbildung 4.30 zeigt, dass Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit abgeschwächt werden und dass Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse gebildet werden. Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.30, Banden „i“, „j“, „k“), von Molkenproteinisolat (Abb. 4.30, Banden „l“, „m“, „n“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.30, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden vermindert. Es werden Reaktionsprodukte mit Molmassen bis  $\geq 3 \times 10^5$  g/mol gebildet, die an der mit „h“ bezeichneten Trenngrenze des PAGE-Gels abgebildet sind (Abb. 4.30).

Eine Quantifizierung einzelner Molmassenfractionen nach Tabelle 4.23 ergibt, dass *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat und Pektin zu ~46% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol bestehen.  $\alpha$ -Casein,  $\beta$ -Casein und  $\kappa$ -Casein werden in etwa gleichem quantitativen Umfang durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin umgesetzt (Tab. A.8).

Auch Al-Hakkak und Kavale (2002) und Einhorn-Stoll et al. (2005) führten Untersuchungen zur *Maillard*-Reaktion von Casein mit Pektin durch. Casein/Pektin-*Maillard*-Produkte mit Molmassen bis  $2 \times 10^5$  g/mol konnten nachgewiesen werden.

Proteinmonomere in Molkenproteinisolat - ausdrückt als die Proteinfraction  $< 2 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.23) - werden durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin zu 49,7% Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt und zu 27,0% Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol.  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin werden in quantitativ gleichem Umfang durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin umgesetzt (Tab. A.9).

Mishra et al. (2001), Neiryneck et al. (2004) und Einhorn-Stoll et al. (2005) untersuchten die Bildung von Molkenprotein/Pektin-Produkten durch *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein. Nach Neiryneck et al. (2004) wurden verschiedene, oligomere bis polymere Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte gebildet. Die Autoren wiesen darauf hin, dass eine lange Reaktionszeit von bis zu 15 Tagen bei 60°C und 75% r. F. notwendig ist, um die globuläre Molekülstruktur von Molkenprotein mit der kettenförmigen Struktur von Pektinmolekülen zu verbinden (Neiryneck et al. 2004). Einhorn-Stoll et al. (2005) verglichen die *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein und Pektin mit der *Maillard*-Reaktion von Casein und Pektin. Sie ermittelten, dass pro Zeiteinheit mehr Molkenproteinmonomere mit Pektin modifiziert werden als Caseinmonomere (Einhorn-Stoll et al. 2005). Die Autoren zeigten zusätzlich, dass ein höherer Grad der Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit niedrigmethyliertem Pektin im Vergleich zu hochmethyliertem Pektin erreicht wird (Einhorn-Stoll et al. 2005).

Neben Molkenprotein konnte auch für andere Proteine mit globulärer Tertiärstruktur wie Sojaprotein, Ovalbumin und Lysozym eine *Maillard*-Reaktion mit Pektin nachgewiesen werden (Kato 1988a).

*Maillard*-Produkte aus Gesamtmilchprotein und Pektin bestehen nach Tabelle 4.23 zu ~85% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $> 2 \times 10^5$  g/mol. Caseinmonomere und Molkenproteinmonomere werden in etwa gleichem Umfang durch *Maillard*-Reaktion modifiziert (Tab. A.10).

**Tab. 4.23.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Milcheiweiß und Pektin

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfractionen [g/mol]		
	>2 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>	<2 x 10 <sup>4</sup>
NC + P [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC + P [4 h]	45,6	37,3	17,1
MPI + P [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI + P [24 h]	27,0	49,7	23,3
MP + P [0 h]	3,4	70,1	26,5
MP + P [24 h]	84,9	11,6	3,5

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. 4.24.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Pektin

	Gehalt der Lösung an		
	löslichem Aminostickstoff [µg/mg Protein]	SH-Gruppen [µmol/g Protein]	HMF [nmol/g Pulver]
NC + P [0 h]	4,07 ± 0,01	0,33 ± 0,01	2,64 ± 0,05
NC + P [1 h] <sup>1)</sup>	7,83 ± 0,16	0,31 ± 0,01	14,04 ± 0,47
NC + P [4 h] <sup>1)</sup>	6,09 ± 0,14	0,30 ± 0,03	18,71 ± 0,44
NC + P [1 h] <sup>2)</sup>	7,08 ± 0,20	0,30 ± 0,02	8,61 ± 0,12
MPI + P [0 h]	12,24 ± 0,08	2,10 ± 0,03	0,00 ± 0,00
MPI + P [5 h] <sup>1)</sup>	5,80 ± 0,38	2,14 ± 0,02	6,55 ± 0,23
MPI + P [24 h] <sup>1)</sup>	1,48 ± 0,22	2,17 ± 0,03	8,80 ± 0,39
MPI + P [5 h] <sup>2)</sup>	7,44 ± 0,20	2,29 ± 0,04	2,10 ± 0,07
MP + P [0 h]	8,36 ± 0,26	0,40 ± 0,01	0,52 ± 0,02
MP + P [5 h] <sup>1)</sup>	4,41 ± 0,24	0,38 ± 0,03	23,11 ± 1,02
MP + P [24 h] <sup>1)</sup>	1,27 ± 0,26	0,37 ± 0,03	67,17 ± 1,21
MP + P [5 h] <sup>2)</sup>	3,12 ± 0,12	0,39 ± 0,03	15,41 ± 0,56

HMF = Hydroxymethylfurfural, NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung, 70°C, 65% r. F.

Da in den vorliegenden Untersuchungen Mischungen aus Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver und Pektin zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt wurden, ist es anzunehmen, dass Veränderungen der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein (Tab. 4.23) als Folge einer *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Pektin und/oder Lactose auftreten.

Die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Pektin wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Sejersen et al. (2007) berichteten jedoch, dass auch ohne *Maillard*-Reaktion starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Gesamtmilchprotein und Pektin ausgebildet werden können.

In der Literatur wird die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden neben einer Modifizierung der Molmasse von Protein (Tab. 4.23) mit einer Modifizierung funktioneller Gruppen von Aminosäureseitenketten und der Bildung von Markersubstanzen wie Hydroxymethylfurfural (Morales und Jiménez-Pérez 1998, Morales et al. 1996) in Verbindung gebracht.

Ergebnisse zur Untersuchung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Pektin auf den Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural sind in Tabelle 4.24 angegeben. Nach Tabelle 4.24 nimmt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilcheiweiß mit der Dauer der *Maillard*-Reaktion mit Pektin ab. Die stärkste Abnahme an löslichem Aminostickstoff um etwa 88% wurde für die *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat/Pektin-Pulvermischungen über eine Reaktionszeit von 24 Stunden ermittelt (Tab. 4.24).

Für Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte wurde ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff ermittelt als für unbehandelte Natriumcaseinat/Pektin-Mischungen (Tab. 4.24). Wechselwirkungen, die zwischen Proteinmolekülen in unbehandeltem Natriumcaseinat auftreten (Oommen et al. 2001), werden vermutlich durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin zunächst abgeschwächt. Als Folge werden in *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat und Pektin solange höhere Werte an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen, wie die Zahl der Aminogruppen, die durch die geringeren Proteinwechselwirkungen freigesetzt werden, die Zahl der Aminogruppen übersteigt, die durch *Maillard*-Reaktion glycosyliert werden.

Nach Al-Hakkak und Kavale (2002) sinkt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion als Folge der kovalenten Bindung von Pektinmolekülen an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Die Autoren ermittelten, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff von Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin bei 60°C und 79% r. F. über 48 Stunden um bis zu 66% abnimmt.

Der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß verändert sich durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin im Wesentlichen nicht. Ein tendenzieller Anstieg im Gehalt an Sulfhydrylgruppen durch *Maillard*-Reaktion ist für Molkenprotein/Pektin-Mischungen angegeben (Tab. 4.24). Es ist wahrscheinlich, dass die globuläre Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen mit einer Molmasse von  $<2 \times 10^4$  g/mol durch die Bindung von Pektinmolekülen mit einer Molmasse von 150.000 g/mol teilweise entfaltet wurde. Wooster und Augustin (2007) beschrieben eine Entfaltung der Tertiärstruktur am Beispiel der *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein mit Dextran mit einer Molmasse von 8.000 - 80.000 g/mol.

Hydroxymethylfurfural wird in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion in Milcheiweiß/Pektin-Mischungen gebildet. Besonders hohe Gehalte an Hydroxymethylfurfural wurden in Gesamtmilchprotein/Pektin-Mischungen festgestellt. Da Gesamtmilchprotein/Pektin-



Mischungen aus Magermilchpulver und Pektin hergestellt wurden, enthielten sie neben Gesamtmilchprotein und Pektin auch Lactose. Die Gegenwart von Lactose beschleunigte wahrscheinlich die Bildung von Hydroxymethylfurfural in Gesamtmilchprotein/Pektin-Mischungen im Vergleich zu Natriumcaseinat/Pektin- oder Molkenproteinisolat/Pektin-Mischungen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.3. für die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose erläutert wurde, zeigt auch Tabelle 4.24, dass für *Maillard*-Produkte aus Protein/Saccharid-Pulvermischungen ein vergleichsweise höherer Gehalt an Hydroxymethylfurfural ermittelt wurde als für *Maillard*-Produkte aus Lyophilisaten von Protein/Saccharid-Lösungen. Der Gehalt an Hydroxymethylfurfural in Milcheiweiß/Pektin-Mischungen korreliert nicht zwangsläufig mit der Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion, da Hydroxymethylfurfural auch durch eine Karamelisierung von Sacchariden während der Reaktionszeit entstehen kann (White 1979).

Ergänzend zu Tabelle 4.24 gibt Tabelle 4.25 einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in Milcheiweiß/Pektin-Mischungen und in Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkten. Auch wenn *Maillard*-Produkte von Aminosäureseitenketten während der Probenvorbereitung zur Aminosäureanalyse teilweise zerstört werden (De Block et al. 2003), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten durch *Maillard*-Reaktion abgeleitet werden (Nacka et al. 1998, Kato et al. 1988b, De Block et al. 2003, Moreno et al. 2002).

Nach Tabelle 4.25 werden durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin die Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Lysin modifiziert. In Protein/Pektin-*Maillard*-Produkten werden nach Tabelle 4.25 bis zu 15% weniger Glutaminsäure, bis zu 29% weniger Alanin, bis zu 37% weniger Methionin, bis zu 24% weniger Leucin und bis zu 55% weniger Lysin nachgewiesen als in unbehandelten Protein/Pektin-Mischungen. Der Gehalt an Aminosäuren nimmt besonders stark in Gesamtmilchprotein/Pektin-Mischungen ab (Tab. 4.25). Tabelle 4.25 zeigt, dass in Gesamtmilchprotein auch Phenylalanin und Histidin zu jeweils ~7% durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin modifiziert werden.

Angaben in der Literatur zur Modifizierung von Aminosäurenresten in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin finden sich bisher nur in Bezug auf die Modifizierung von Lysin in Natriumcaseinat durch die kovalente Bindung von Pektin (Al-Hakkak und Kavale 2002).

**Tab. 4.25.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Milcheiweiß und Pektin

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC + P	NC + P	MPI + P	MPI + P	MP + P	MP + P
	[0 h]	[4 h]	[0 h]	[24 h]	[0 h]	[24 h]
Glutaminsäure	<b>20,31</b>	<b>19,68</b>	<b>17,20</b>	<b>14,57</b>	<b>19,69</b>	<b>16,58</b>
Alanin	<b>4,03</b>	<b>3,64</b>	<b>8,94</b>	<b>8,02</b>	<b>5,15</b>	<b>3,68</b>
Methionin	<b>3,28</b>	<b>3,20</b>	<b>3,23</b>	<b>2,03</b>	<b>2,61</b>	<b>2,39</b>
Leucin	<b>9,83</b>	<b>8,50</b>	<b>14,29</b>	<b>12,51</b>	<b>11,04</b>	<b>8,39</b>
Phenylalanin	4,55	4,54	2,91	2,90	<b>4,28</b>	<b>3,96</b>
Histidin	3,10	3,08	2,06	2,08	<b>3,05</b>	<b>2,86</b>
Lysin	<b>6,78</b>	<b>4,52</b>	<b>9,48</b>	<b>7,98</b>	<b>7,90</b>	<b>3,54</b>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäurenanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

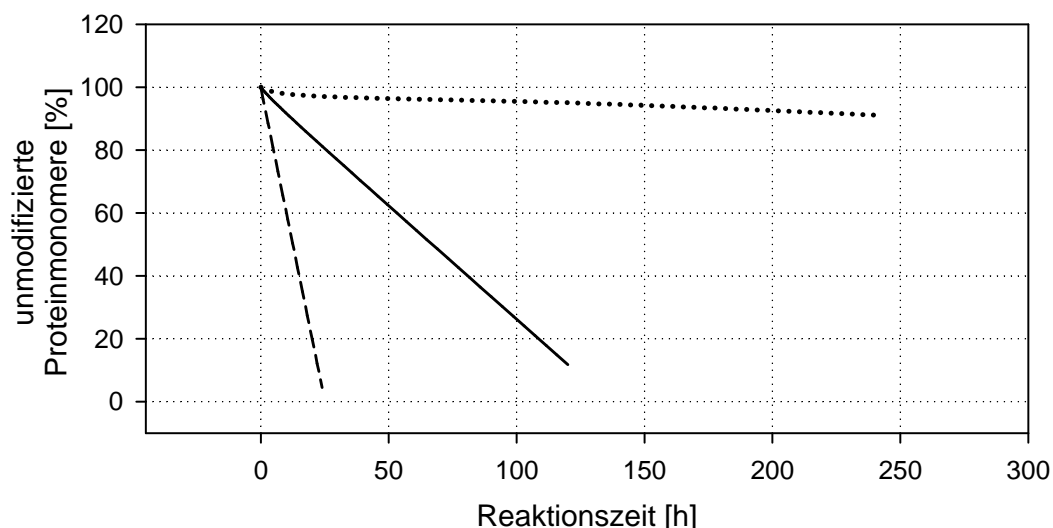
<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

#### 4.2.5. Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran

Milcheiweiß in Protein/Saccharid-Mischungen ( $w/w = 1/2$ ) wurde durch *Maillard*-Reaktion bei  $70^\circ\text{C}$  und 65% r. F. mit Dextran modifiziert (Kap. 3. 2.2.2.).

Durch SDS-PAGE wurde ermittelt wie sich die Molmassenverteilung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran verändert. Durch densitometrische Auswertung elektrophoretischer Untersuchungen konnte der Gehalt an unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß/Dextran-Mischungen und in Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkten quantifiziert werden.

Abbildung 4.31 stellt dar, wie sich der prozentuale Gehalt von unmodifizierten Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran in Abhängigkeit von der Reaktionszeit verändert. Nach Abbildung 4.31 werden durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran über eine Reaktionszeit von 24 Stunden etwa 20% der Proteinmonomere in Natriumcaseinat modifiziert und etwa 96% der Proteinmonomere in Gesamtmilchprotein. Maximal 87% der Proteinmonomere in Natriumcaseinat, maximal 8% der Proteinmonomere in Molkenproteinisolat und maximal 96% der Proteinmonomere in Gesamtmilchprotein können unter den gegebenen Bedingungen über eine Reaktionszeit von bis zu 240 Stunden durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran modifiziert werden (Abb. 4.31) bis stark braun gefärbte, unlösliche Reaktionsprodukte entstehen. Nach eigenen Beobachtungen bräunen Mischungen aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol] durch *Maillard*-Reaktion schneller als Mischungen aus Milcheiweiß und Dextran [500.000 g/mol].

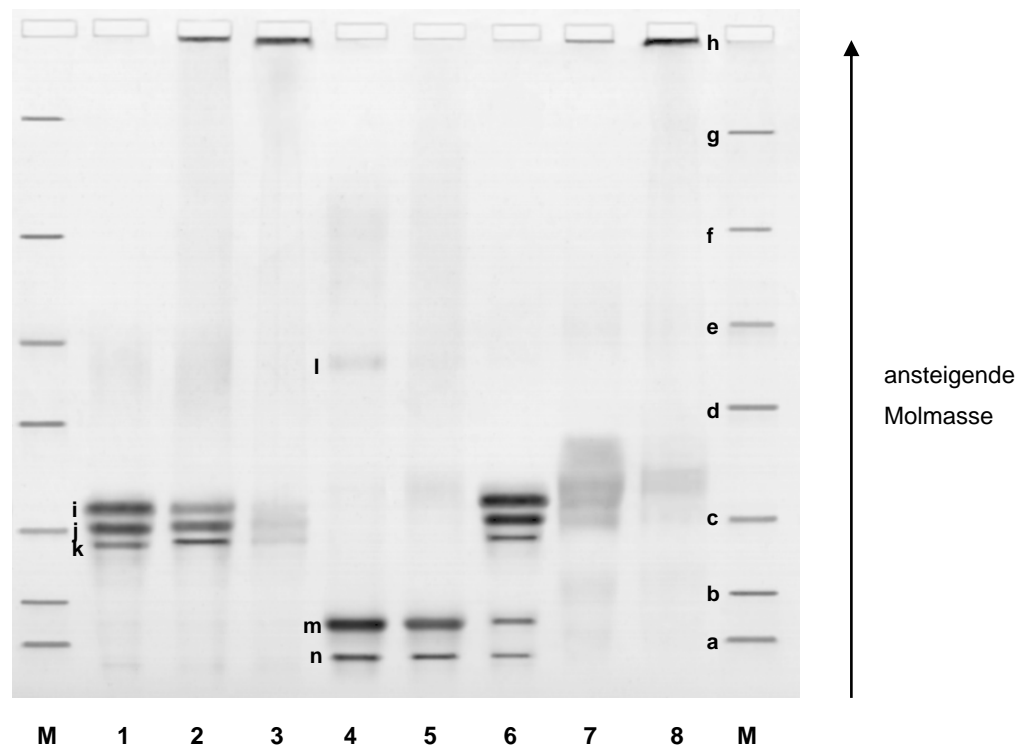


**Abb. 4.31.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (····) und in Gesamtmilcheiweiß (---) durch *Maillard*-Reaktion<sup>2)</sup> mit Dextran

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; unmodifizierte Proteinmonomere von Milcheiweiß [0 h] = 100%

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] ( $w/w = 1/2$ ), Protein/Saccharid-Pulvermischung,  $70^\circ\text{C}$ , 65% r. F., 0 h - 240 h

Dunlap und Côté (2005) und Jiménez-Castaño et al. (2007) beobachteten, dass  $\beta$ -Lactoglobulinmonomere langsamer durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran modifiziert werden, wenn Dextranmoleküle mit höherer Molmasse zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt werden. Ein negativer Zusammenhang wurde berichtet zwischen der Molmasse von Dextran und dem Grad der Glycosylierung von Molkenprotein, der durch *Maillard*-Reaktion erreicht werden konnte (Jiménez-Castaño et al. 2007). Ein positiver Zusammenhang wurde festgestellt zwischen der Molmasse von Dextranmolekülen und der Entfaltung der Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran (Jiménez-Castaño et al. 2007). Abbildung 4.32 stellt die Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Dextran dar. Abbildung 4.32 zeigt, dass Banden der Elektropherogramme von unmodifiziertem Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran in Abhängigkeit von der Reaktionszeit abgeschwächt werden und dass Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse entstehen.



**Abb. 4.32.** Elektropherogramme von *Maillard*-Produkten<sup>1)</sup> aus Milcheiweiß und Dextran

1 = NC + D40 [0 h]; 2 = NC + D40 [24 h]; 3 = NC + D40 [120 h]; 4 = MPI + D40 [0 h];  
5 = MPI + D40 [240 h]; 6 = MP + D40 [0 h]; 7 = MP + D40 [5 h]; 8 = MP + D40 [24 h]; M = Standard

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver;  
D40 = Dextran [40.000 g/mol]; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha_S$ -Casein, j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, l = Serumalbumin, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 0 h - 240 h

Monomerenbanden der Elektropherogramme von Natriumcaseinat (Abb. 4.32, Banden „i“, „j“, „k“) und von Gesamtmilchprotein (Abb. 4.32, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) werden vermindert. Es werden Reaktionsprodukte mit Molmassen  $\geq 3 \times 10^5$  g/mol gebildet, die an der mit „h“ bezeichneten Trenngrenze des PAGE-Gels abgebildet sind.

Monomerenbanden der Elektropherogramme von Molkenproteinisolat (Abb. 4.32, Banden „l“, „m“, „n“) werden durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran über eine Reaktionszeit von bis zu 240 Stunden nicht wesentlich modifiziert.

Eine Quantifizierung einzelner Molmassenfraktionen nach Tabelle 4.26 zeigt, dass *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat und Dextran zu 67,2% des Gesamtproteins aus Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol bestehen. Durch *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Dextran [40.000 g/mol] (Tab. 4.26) werden prozentual mehr Proteinpolymere gebildet als durch *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Dextran [500.000 g/mol] (Tab. A.11).  $\alpha$ -Casein wird in quantitativ größerem Umfang durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] umgesetzt als  $\beta$ -Casein und  $\beta$ -Casein in quantitativ größerem Umfang als  $\kappa$ -Casein (Tab. A.8).

Fechner et al. (2007), Pan et al. (2006), Dickinson und Izgi (1996), Dickinson und Semenova (1992) und Aminlari et al. (2005) berichteten, dass Caseinmoleküle durch *Maillard*-Reaktion kovalente Bindungen mit Dextran eingehen können. Durch die verzweigte Struktur von Dextranmolekülen und die ungeordnete Tertiärstruktur von Caseinmolekülen konnte ein Molekül Casein nur etwa 0,13 mol Dextran binden (Aminlari et al. 2005). Heterogene Reaktionsprodukte wurden nachgewiesen (Aminlari et al. 2005). In Übereinstimmung mit Tabelle A.8 berichteten Fechner et al. (2007), dass besonders  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran modifiziert wird. Die Autoren gaben an, dass potenziell mehr  $\epsilon$ -Aminogruppen in  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran wechselwirken können, da  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein quantitativ mehr Lysin enthält als  $\beta$ -Casein oder als  $\kappa$ -Casein.

**Tab. 4.26.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol]

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfraktionen [g/mol]		
	$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC + D40 [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC + D40 [120 h]	67,2	16,5	16,3
MPI + D40 [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI + D40 [240 h]	2,3	20,9	76,8
MP + D40 [0 h]	3,4	70,1	26,5
MP + D40 [24 h]	84,2	12,3	3,5

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

Die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat wird durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran nur wenig verändert (Tab. 4.26). Nach Tabelle A.9 werden nur ~8% der Proteinmonomere in Molkenproteinisolat über eine Reaktionszeit von bis zu 240 Stunden durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] modifiziert. Ein ähnlicher Grad der Modifizierung von Molkenproteinmonomeren von ~6% wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen auch durch eine Erhitzung von Molkenproteinisolat ohne Dextran erreicht (Tab. A.12).

Nach Tabelle 4.26 steigt durch *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Dextran nur der prozentuale Gehalt an Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol von 13,2% in unbehandelten Molkenprotein/Dextran-Mischungen auf 20,9% in Molkenprotein/Dextran-*Maillard*-Produkten an. Der Grad der Oligomerisierung von Molkenprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] (Tab. 4.26) ist höher als der Grad der Oligomerisierung von Molkenprotein, der durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran [500.000 g/mol] erreicht wird (Tab. A.11).

Insgesamt geringe Veränderungen der Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran nach Tabellen 4.26 und A.11 stehen vergleichsweise stärkeren Veränderungen der Molmassenverteilung von Molkenprotein gegenüber, die in der Literatur berichtet wurden. Unterschiede im Grad der Modifizierung von Molkenprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass in der Literatur die *Maillard*-Reaktion von  $\alpha$ -Lactalbumin, von  $\beta$ -Lactoglobulin oder von Blutserumalbumin mit Dextran beschrieben wurde. Molkenproteinisolat ist jedoch nach densitometrischer PAGE-Auswertung (ohne Abb./Tab.) zusammengesetzt aus 34,6%  $\alpha$ -Lactalbumin, aus 51,0%  $\beta$ -Lactoglobulin und aus 6,5% Blutserumalbumin.

Nach Jiménez-Castaño et al. (2005b) steigt der Grad der Modifizierung von Molkenproteinmonomeren durch *Maillard*-Reaktion mit der Menge an Dextran, die pro g Molkenprotein eingesetzt wird. In den eigenen Untersuchungen wurden Protein und Dextran in einem Gewichtsverhältnis von  $w/w = \text{Protein/Dextran} = 1/2$  eingesetzt, in den Untersuchungen, die in der Literatur beschrieben wurden, im Gewichtsverhältnis von bis zu  $w/w = \text{Protein/Dextran} = 1/8$  (Jiménez-Castaño et al. 2005b). Eine höhere Menge an Dextran erhöht vermutlich die Wahrscheinlichkeit einer *Maillard*-Reaktion zwischen den funktionellen Gruppen in der globulären Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen und den Carbonylgruppen in der verzweigten Struktur von Dextranmolekülen.

In der Literatur wurde im Wesentlichen von der *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Dextran berichtet (Wooster und Augustin 2006, Wooster und Augustin 2007, Mu et al. 2006, Dunlap und Côté 2005, Jiménez-Castaño et al. 2007, Jiménez-Castaño et al. 2005a, Jiménez-Castaño et al. 2005b); etwa 2,5 mol Dextran konnten an ein Molekül  $\beta$ -Lactoglobulin gebunden werden (Wooster und Augustin 2007). Durch die Bindung von Dextran wurde die Tertiärstruktur von  $\beta$ -Lactoglobulin teilweise entfaltet (Wooster und Augustin 2007, Jiménez-Castaño et al. 2007). Heterogene, oligomere bis polymere Reaktionsprodukte aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Dextran wurden nachgewiesen (Jiménez-Castaño et al. 2005a, Jiménez-Castaño et al. 2007). Nach Jiménez-Castaño et al. (2007) reagiert Blutserumalbumin quantitativ stärker mit Dextran als  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\beta$ -Lactoglobulin quantitativ stärker als  $\alpha$ -Lactalbumin.

Eine Oligomerisierung von Proteinen mit globulärer Tertiärstruktur durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran wurde auch berichtet für Ovalbumin (Kato et al. 1988a, Choi et al. 2005), für Lysozym (Scaman et al. 2006, Kato et al. 1988a, Dickinson und Izgi 1996, Aminlari et al. 2005), für Bohnenprotein (Dickinson und Semenova 1992) und für Sojaprotein (Diftis und Kiosseoglou 2006, Diftis et al. 2005).

Gesamtmilchprotein in Milchpulver/Dextran-Mischungen wird zu ~84% Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt (Tab. 4.26, Tab. A.11). Sowohl Caseinmonomere als auch Molkenproteinmonomere in Gesamtmilchprotein werden durch *Maillard*-Reaktion modifiziert (Tab. A.10). Da in den vorliegenden Untersuchungen Mischungen aus Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver und Dextran zur *Maillard*-Reaktion eingesetzt wurden, ist es anzunehmen, dass Veränderungen der Molmassenverteilung von Gesamtmilchprotein (Tab. 4.26, Tab. A.11) als Folge einer *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Dextran und/oder Lactose auftreten.

Nach Aminlari et al. (2005) behindert die micellare Struktur von Casein die *Maillard*-Reaktion zwischen den funktionellen Gruppen von Caseinmolekülen und den Carboxylgruppen in der verzweigten Struktur von Dextranmolekülen.

In der Literatur wird die *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden neben einer Modifizierung der Molmasse von Protein (Tab. 4.26) mit einer Modifizierung funktioneller Gruppen von Aminosäureseitenketten und der Bildung von Markersubstanzen wie Hydroxymethylfurfural (Morales und Jiménez-Pérez 1998, Morales et al. 1996) in Verbindung gebracht.

Ergebnisse zur Untersuchung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Dextran auf den Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural sind in den Tabellen 4.27 und A.13 angegeben. Nach den Tabellen 4.27 und A.13 nimmt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion ab. Die stärkste Abnahme im Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß um etwa 75% wurde für die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein/Dextran-Pulvermischungen über 120 Stunden ermittelt (Tab. A.13). Eine Abnahme an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß wurde auf die *Maillard*-Reaktion von Dextran mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin in Molkenprotein (Akhtar und Dickinson 2003) und in Casein (Pan et al. 2006) zurückgeführt.

Tabellen 4.27 und A.13 geben einen höheren Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat/Dextran-*Maillard*-Produkten an als in unbehandelten Natriumcaseinat/Dextran-Mischungen. Wechselwirkungen, die zwischen Proteinmolekülen in unbehandeltem Natriumcaseinat auftreten (Oommen et al. 2001), werden vermutlich durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran zunächst abgeschwächt. Als Folge werden in *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat und Dextran solange höhere Werte an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen, wie die Zahl der Aminogruppen, die durch die geringeren Proteinwechselwirkungen freigesetzt werden, die Zahl der Aminogruppen übersteigt, die durch *Maillard*-Reaktion glycosyliert werden. Auch Oliver et al. (2006b) berichteten für die *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Inulin, dass Saccharide mit hoher Molmasse, die durch *Maillard*-Reaktion an Caseinmoleküle gebunden werden, intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Caseinmolekülen vermindern können.

Der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Milcheiweiß verändert sich durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran nur wenig (Tab. 4.27, Tab. A.13). Es wurde festgestellt, dass der Gehalt an Sulfhydrylgruppen in Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran [40.000 g/mol] und mit Dextran [500.000 g/mol] ansteigt (Tab. 4.27, Tab. A.13).

Jiménez-Castaño et al. (2007) wiesen einen positiven Zusammenhang zwischen der Molmasse von Dextranmolekülen und der Entfaltung der Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran nach. Sulfhydrylgruppen, die in der globulären Tertiärstruktur von

unmodifizierten Molkenproteinmolekülen verborgen waren, werden wahrscheinlich infolge einer teilweisen Entfaltung von Molkenproteinmolekülen durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran freigelegt.

Hydroxymethylfurfural wird in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion in Milcheiweiß/Dextran-Mischungen gebildet (Tab. 4.27, Tab. A.13). Höhere Gehalte an Hydroxymethylfurfural wurden in Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkten ermittelt, die mit Dextran [40.000 g/mol] (Tab. 4.27) im Vergleich zu Dextran [500.000 g/mol] (Tab. A.13) hergestellt wurden.

Wie bereits in den Kapiteln 4.2.3. und 4.2.4. erläutert wurde, zeigen auch die Tabellen 4.27 und A.13, dass der Gehalt an Hydroxymethylfurfural in Milcheiweiß/Dextran-Mischungen nicht zwangsläufig mit der Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion korreliert. Durch *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat/Dextran-Pulvermischungen über 120 h wurde beispielsweise der gleiche Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren erreicht wie durch *Maillard*-Reaktion von Lyophilisaten aus Natriumcaseinat/Dextran-Lösungen über 24 h (ohne Abb./Tab.). Für *Maillard*-Produkte aus Lyophilisaten von Natriumcaseinat/Dextran-Lösungen [24 h] wurden nach Tabellen 4.27 und A.13 jedoch wesentlich höhere Gehalte an Hydroxymethylfurfural ermittelt als für *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat/Dextran-Pulvermischungen [120 h].

**Tab. 4.27.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol]

	Gehalt der Lösung an		
	löslichem Aminostickstoff [µg/mg Protein]	SH-Gruppen [µmol/g Protein]	HMF [nmol/g Pulver]
NC + D40 [0 h]	4,07 ± 0,01	0,33 ± 0,01	2,64 ± 0,05
NC + D40 [24 h] <sup>1)</sup>	8,11 ± 0,04	0,30 ± 0,02	4,94 ± 0,20
NC + D40 [120 h] <sup>1)</sup>	6,38 ± 0,06	0,28 ± 0,01	6,60 ± 0,21
NC + D40 [24 h] <sup>2)</sup>	8,37 ± 0,12	0,29 ± 0,03	14,32 ± 0,51
MPI + D40 [0 h]	12,24 ± 0,08	2,10 ± 0,03	0,00 ± 0,00
MPI + D40 [240 h] <sup>1)</sup>	10,53 ± 0,17	2,24 ± 0,04	9,83 ± 0,17
MPI + D40 [48 h] <sup>2)</sup>	12,16 ± 0,10	2,18 ± 0,03	18,37 ± 0,21
MP + D40 [0 h]	8,36 ± 0,26	0,40 ± 0,01	0,52 ± 0,02
MP + D40 [5 h] <sup>1)</sup>	3,70 ± 0,18	0,38 ± 0,02	5,22 ± 0,34
MP + D40 [24 h] <sup>1)</sup>	2,58 ± 0,48	0,38 ± 0,02	21,75 ± 0,53
MP + D40 [5 h] <sup>2)</sup>	4,02 ± 0,11	0,41 ± 0,01	19,81 ± 0,40

HMF = Hydroxymethylfurfural, NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung, 70°C, 65% r. F.



Ergänzend zu Tabelle 4.27 gibt Tabelle 4.28 einen Überblick über den Gehalt an Aminosäuren in Milcheiweiß/Dextran-Mischungen und in Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkten. Obwohl *Maillard*-Produkte von Aminosäureseitenketten während der Probenvorbereitung zur Aminosäureanalyse teilweise zerstört werden (De Block et al. 2003), können aus aminosäureanalytischen Untersuchungen Hinweise über die Modifizierung von Aminosäurenresten durch *Maillard*-Reaktion abgeleitet werden (Nacka et al. 1998, Kato et al. 1988b, De Block et al. 2003, Moreno et al. 2002).

Nach Tabelle 4.28 werden durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran die Aminosäuren Glutaminsäure, Methionin, Leucin, Lysin und Arginin modifiziert. In Protein/Dextran-*Maillard*-Produkten werden nach Tabelle 4.28 bis zu 23% weniger Glutaminsäure, bis zu 20% weniger Methionin, bis zu 26% weniger Leucin, bis zu 51% weniger Lysin und bis zu 34% weniger Arginin nachgewiesen als in unbehandelten Protein/Dextran-Mischungen.

Angaben in der Literatur zur Modifizierung von Aminosäurenresten in Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran finden sich bisher nur in Bezug auf die Modifizierung von Lysin in Casein (Pan et al. 2006) und von Lysin in Molkenprotein (Akhtar und Dickinson 2003).

**Tab. 4.28.** Gehalt an Aminosäuren<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Milcheiweiß und Dextran [40.000 g/mol]

	Aminosäuren [g/100 g Aminosäuren]					
	NC + D40	NC + D40	MPI + D40	MPI + D40	MP + D40	MP + D40
	[0 h]	[120 h]	[0 h]	[240 h]	[0 h]	[120 h]
Glutaminsäure	<b>20,37</b>	<b>17,23</b>	<b>17,16</b>	<b>16,21</b>	<b>19,69</b>	<b>15,21</b>
Methionin	3,30	3,29	<b>3,20</b>	<b>2,56</b>	<b>2,61</b>	<b>2,08</b>
Leucin	<b>9,79</b>	<b>8,24</b>	<b>14,29</b>	<b>12,68</b>	<b>11,04</b>	<b>8,20</b>
Lysin	<b>6,70</b>	<b>4,64</b>	<b>9,55</b>	<b>9,23</b>	<b>7,88</b>	<b>3,84</b>
Arginin	<b>2,31</b>	<b>1,98</b>	2,00	1,95	<b>1,90</b>	<b>1,25</b>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch Aminosäureanalyse; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

#### 4.2.6. Herstellung von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden

*Maillard*-Produkte aus Milcheiweiß und Glucose, Lactose, Pektin oder Dextran wurden bei einer Reaktionstemperatur von 70°C und einer relativen Feuchte von 65% hergestellt. Protein und Saccharid (w/w = 1/2) wurden als Protein/Saccharid-Pulvermischungen oder als Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen eingesetzt. Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurden über folgende Reaktionszeiten hergestellt:

- Protein/Saccharid-Pulvermischungen und Lyophilisate aus Protein/Saccharid-Lösungen wurden über eine Reaktionszeit modifiziert, die maximal möglich war, um für die Analyse ausreichend lösliche *Maillard*-Produkte mit einem hohen Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren herzustellen.
- Protein/Saccharid-Pulvermischungen wurden zusätzlich über ~1/4 der maximal möglichen Reaktionszeit modifiziert, um lösliche *Maillard*-Produkte mit einem geringeren Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren herzustellen.

Tabelle 4.29 gibt einen Überblick über die prozentuale Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß, die unter den gewählten Reaktionsbedingungen durch *Maillard*-Reaktion erreicht wurde. Die Reaktionsprodukte wurden zur weiteren Untersuchung der techno-funktionellen Eigenschaften (Kap. 4.2.7.) und der in-vitro Proteolysierbarkeit (Kap. 4.2.8.) eingesetzt.

**Tab. 4.29.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion

		Modifizierte Proteinmonomere [%]					
		NC		MPI		MP	
Glucose	PSPM	15,1	[1 h] <sup>2)</sup>	15,0	[1 h] <sup>2)</sup>	45,4	[1 h] <sup>3)</sup>
	PSPM	62,3	[4 h] <sup>2)</sup>	30,6	[4 h] <sup>2)</sup>	50,7	[4 h] <sup>3)</sup>
	LPSL	59,6	[1 h] <sup>2)</sup>	33,1	[1 h] <sup>2)</sup>	51,0	[1 h] <sup>3)</sup>
Lactose	PSPM	15,3	[24 h] <sup>2)</sup>	20,4	[24 h] <sup>2)</sup>	20,8	[1 h] <sup>4)</sup>
	PSPM	98,1	[96 h] <sup>2)</sup>	59,0	[96 h] <sup>2)</sup>	56,3	[4 h] <sup>4)</sup>
	LPSL	95,2	[24 h] <sup>2)</sup>	64,6	[24 h] <sup>2)</sup>	55,6	[1 h] <sup>4)</sup>
Pektin	PSPM	24,0	[1 h] <sup>2)</sup>	26,9	[5 h] <sup>2)</sup>	94,0	[5 h] <sup>2)</sup>
	PSPM	47,2	[4 h] <sup>2)</sup>	76,5	[24 h] <sup>2)</sup>	96,6	[24 h] <sup>2)</sup>
	LPSL	51,3	[1 h] <sup>2)</sup>	80,2	[5 h] <sup>2)</sup>	98,1	[5 h] <sup>2)</sup>
Dextran [40.000 g/mol]	PSPM	20,9	[24 h] <sup>2)</sup>	-	-	26,6	[5 h] <sup>2)</sup>
	PSPM	87,3	[120 h] <sup>2)</sup>	8,1	[240 h] <sup>2)</sup>	96,1	[24 h] <sup>2)</sup>
	LPSL	82,1	[24 h] <sup>2)</sup>	6,3	[48 h] <sup>2)</sup>	90,7	[5 h] <sup>2)</sup>
Dextran [500.000 g/mol]	PSPM	18,4	[24 h] <sup>2)</sup>	-	-	24,9	[5 h] <sup>2)</sup>
	PSPM	84,2	[120 h] <sup>2)</sup>	5,1	[240 h] <sup>2)</sup>	92,2	[24 h] <sup>2)</sup>
	LPSL	78,2	[24 h] <sup>2)</sup>	5,3	[48 h] <sup>2)</sup>	85,5	[5 h] <sup>2)</sup>

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein,

PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung; berechnet nach der Formel:

$$\text{Modifizierte Proteinmonomere [\%]} = 100 - \frac{\text{Proteinmonomere im Protein/Saccharid-Maillard-Produkt} \times 100}{\text{Proteinmonomere in der unbehandelten Protein/Saccharid-Mischung}}$$

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Saccharid (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

<sup>4)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

#### 4.2.7. Techno-funktionelle Eigenschaften von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Sacchariden

Es wurde untersucht, wie sich eine chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, mit Lactose, mit Pektin und mit Dextran auf die techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß auswirkt.

Abbildungen 4.33, 4.34, 4.35, 4.36 und A.14 stellen die techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen und von Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkten als prozentuale Veränderung gegenüber unmodifiziertem Milcheiweiß dar. Die Messwerte, die für unmodifiziertes Milcheiweiß ermittelt wurden, sind in der Anlage (Tab. A.5) angegeben.

Es wird versucht, die Ergebnisse in den eigenen Untersuchungen mit Ergebnissen zu vergleichen, die in der Literatur berichtet wurden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Studien ist nicht möglich, da unterschiedliche Substratmoleküle unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der *Maillard*-Reaktion miteinander inkubiert wurden. *Maillard*-Produkte mit unterschiedlicher Molmasse, mit unterschiedlicher Struktur und mit unterschiedlichen techno-funktionellen Eigenschaften wurden jeweils in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen gebildet.

#### Hitzebeständigkeit

Abbildungen 4.33a, 4.34a und 4.35a stellen dar, dass *Maillard*-Produkte aus Milcheiweiß und Glucose, Lactose oder Pektin um bis zu 92% weniger hitzebeständig sind als unbehandeltes Milcheiweiß. Auch für Protein/Saccharid-Mischungen aus Milcheiweiß und Glucose (Abb. 4.33a), Lactose (Abb. 4.34a) oder Pektin (Abb. 4.35a) ohne *Maillard*-Reaktion wurde im Wesentlichen eine geringere Hitzebeständigkeit ermittelt als für unbehandeltes Milcheiweiß. Nur für Gesamtmilchprotein/Pektin-Mischungen und für Gesamtmilchprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte wurde eine um bis zu 173% höhere Hitzebeständigkeit festgestellt als für unbehandeltes Gesamtmilchprotein (Abb. 4.35a). Nach den Abbildungen 4.36a und A.14a sind Gesamtmilchprotein/Dextran-*Maillard*-Produkte um bis zu 529% hitzebeständiger als unbehandeltes Gesamtmilchprotein. Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkte sind um bis zu 196% hitzebeständiger als unbehandeltes Molkenproteinisolat (Abb. 4.36a, Abb. A.14a). Da sowohl unbehandeltes Natriumcaseinat als auch Natriumcaseinat/Dextran-*Maillard*-Produkte so hitzebeständig sind, dass sie unter den gegebenen Bedingungen innerhalb einer Messdauer von 300 min nicht koagulieren, konnten keine prozentualen Veränderungen der Hitzebeständigkeit von Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran beobachtet werden (Abb. 4.36a, Abb. A.14a).

Aus den Angaben in der Literatur kann kein klarer Einfluss der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden auf die Hitzebeständigkeit von Milcheiweiß abgeleitet werden.

Für *Maillard*-Produkte aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Glucose (Broersen et al. 2004), aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactose (van Teeffelen et al. 2007), aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Alginate (Hattori et al. 1997), aus Blutserumalbumin und Dextran (Dickinson und Izgi 1996), aus Casein und Dextran (Aminlari et al. 2005, Dickinson und Izgi 1996), aus Lysozym und Dextran (Scaman et al. 2006, Aminlari et al. 2005, Dickinson und Izgi 1996), aus Hühnereieweiß und Dextran (Scaman et al. 2006), aus Hühnereieweiß und Galactomannan (Matsudomi et al. 2002), aus Fischprotein und Dextran (Fujiwara et al. 1998), aus Fischprotein und Alginate (Sato

et al. 2003) und aus Sojaprotein und Carrageenan (Molina Ortiz et al. 2004) wurde eine höhere Hitzestabilität nachgewiesen als für das jeweils unbehandelte Protein. Es wurde diskutiert, dass die kovalente Bindung von Saccharidmolekülen an Proteinmoleküle durch *Maillard*-Reaktion die Proteinmoleküle elektrostatisch und sterisch vor einer hitzeinduzierten Aggregation schützt (Bouhallab et al. 1999, Chevalier et al. 2001b, Capitani et al. 2007). Nach van Teeffelen et al. (2007) stieg die Denaturierungstemperatur von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose um 5°C an. Nach Li et al. (2005) konnte die Hitzestabilität von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion mit Maltopentose und eine anschließende Phosphorylierung nur bei pH 7 gesteigert werden.

Andere Autoren berichteten, dass die Hitzestabilität von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose (Chevalier et al. 2001c), mit Lactose (Chevalier et al. 2001c), mit Fructooligosacchariden (Trofimova und de Jongh 2004) und mit Dextran (Jiménez-Castaño et al. 2005a, Jiménez-Castaño et al. 2007) bei pH 7 absinkt. Nach Angaben der Autoren konnte eine höhere Hitzestabilität von  $\beta$ -Lactoglobulin nach *Maillard*-Reaktion ausschließlich bei einer Erhitzung von  $\beta$ -Lactoglobulin/Saccharid-*Maillard*-Produkten bei pH 5 festgestellt werden (Jiménez-Castaño et al. 2005a, Chevalier et al. 2001c).

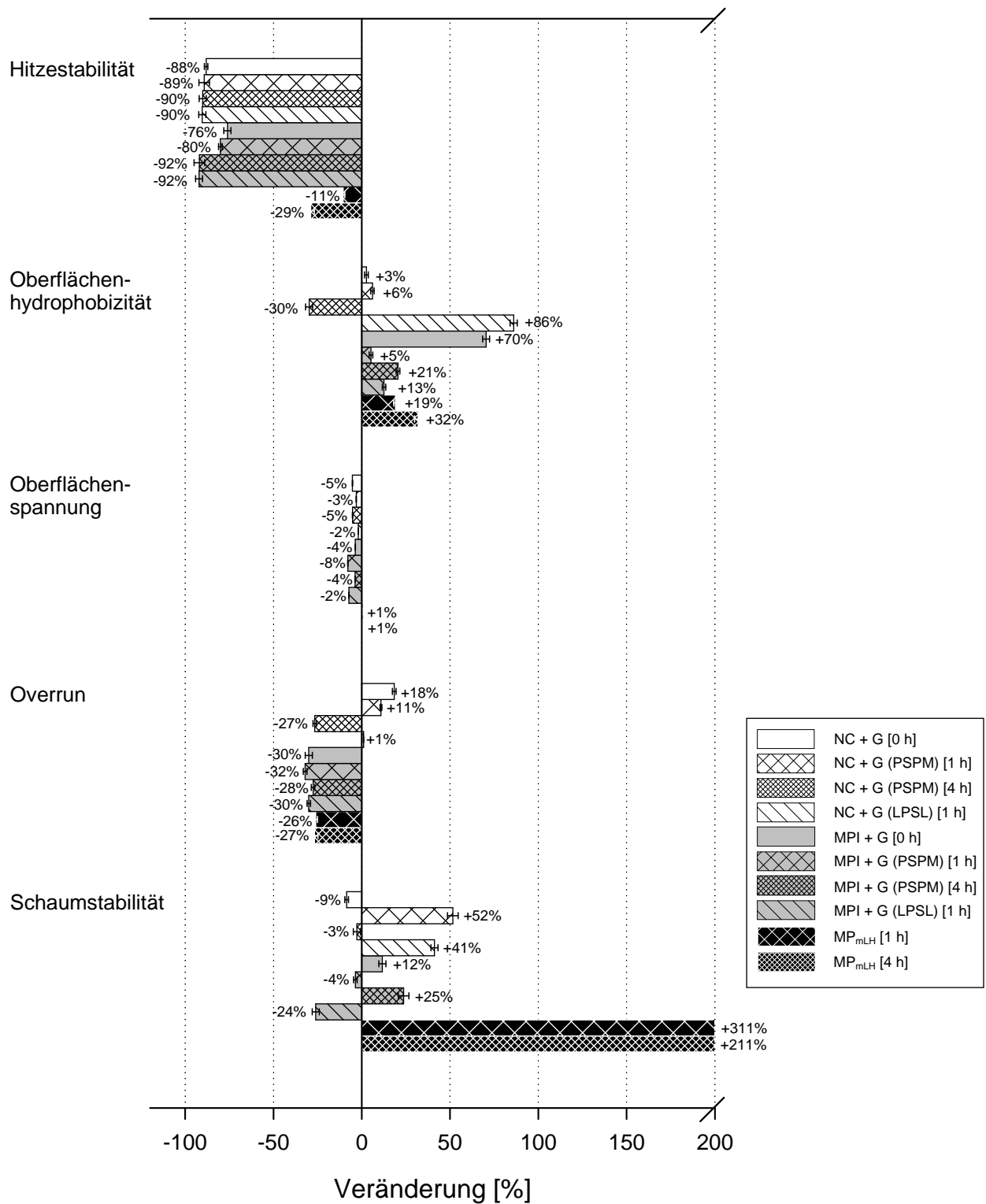
Keine Veränderungen der Hitzestabilität von Protein durch *Maillard*-Reaktion wurden berichtet für Caseinmacropeptid/Lactose-Mischungen (Morgan et al. 2002).

### **Oberflächenhydrophobizität**

Nach den Abbildungen 4.33a, 4.34a, 4.35a, 4.36a und A.14a wurden für unerhitzte Protein/Saccharid-Mischungen höhere Werte der Oberflächenhydrophobizität ermittelt als für unbehandeltes Milcheiweiß. Es wurde festgestellt (Tab. A.14), dass Saccharidmoleküle unter Anwendung der gewählten Methode zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß (s. Kap. 3.2.4.2.) selbst bis zu  $3,93 \pm 0,21 \mu\text{g SDS}/500 \mu\text{g Saccharid}$  binden.

Nach den Abbildungen 4.35a, 4.36a und A.14a sinkt die Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion von Protein/Pektin-Mischungen und von Protein/Dextran-Mischungen im Wesentlichen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion ab. Eine Abnahme der Oberflächenhydrophobizität durch *Maillard*-Reaktion ist für *Maillard*-Produkte aus Milcheiweiß und Glucose (Abb. 4.33a) oder für *Maillard*-Produkte aus Milcheiweiß und Lactose (Abb. 4.34a) weniger klar erkennbar. Im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß wurden für *Maillard*-Produkte aus Milcheiweiß und Glucose (Abb. 4.33a) oder aus Milcheiweiß und Lactose (Abb. 4.34a) meist höhere Werte der Oberflächenhydrophobizität ermittelt.

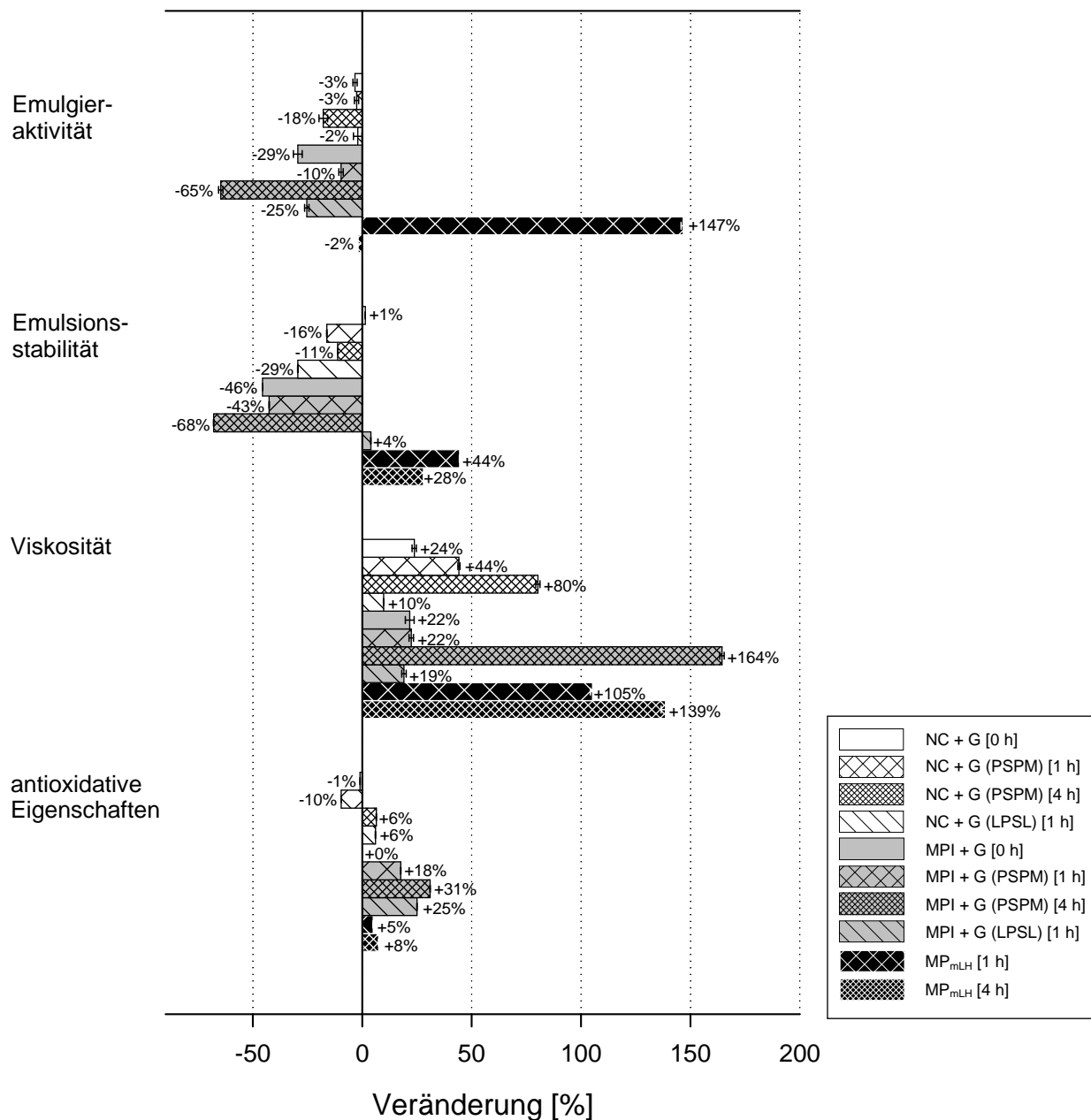
In Bezug auf Veränderungen der Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden müssen verschiedene Effekte diskutiert werden. Zum einen werden durch *Maillard*-Reaktion von Protein mit Sacchariden besonders die hydrophoben Seitenketten von Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinmolekülen glycosyliert (Burr et al. 1996, Leonil et al. 1997). Fechner et al. (2007) und Mu et al. (2006) beschrieben für die *Maillard*-Reaktion von Casein mit Dextran, dass die hydrophoben Eigenschaften von Casein durch die hydrophilen Eigenschaften von Dextran abgeschwächt werden.



**Abb. 4.33a.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Glucose

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, G = Glucose, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

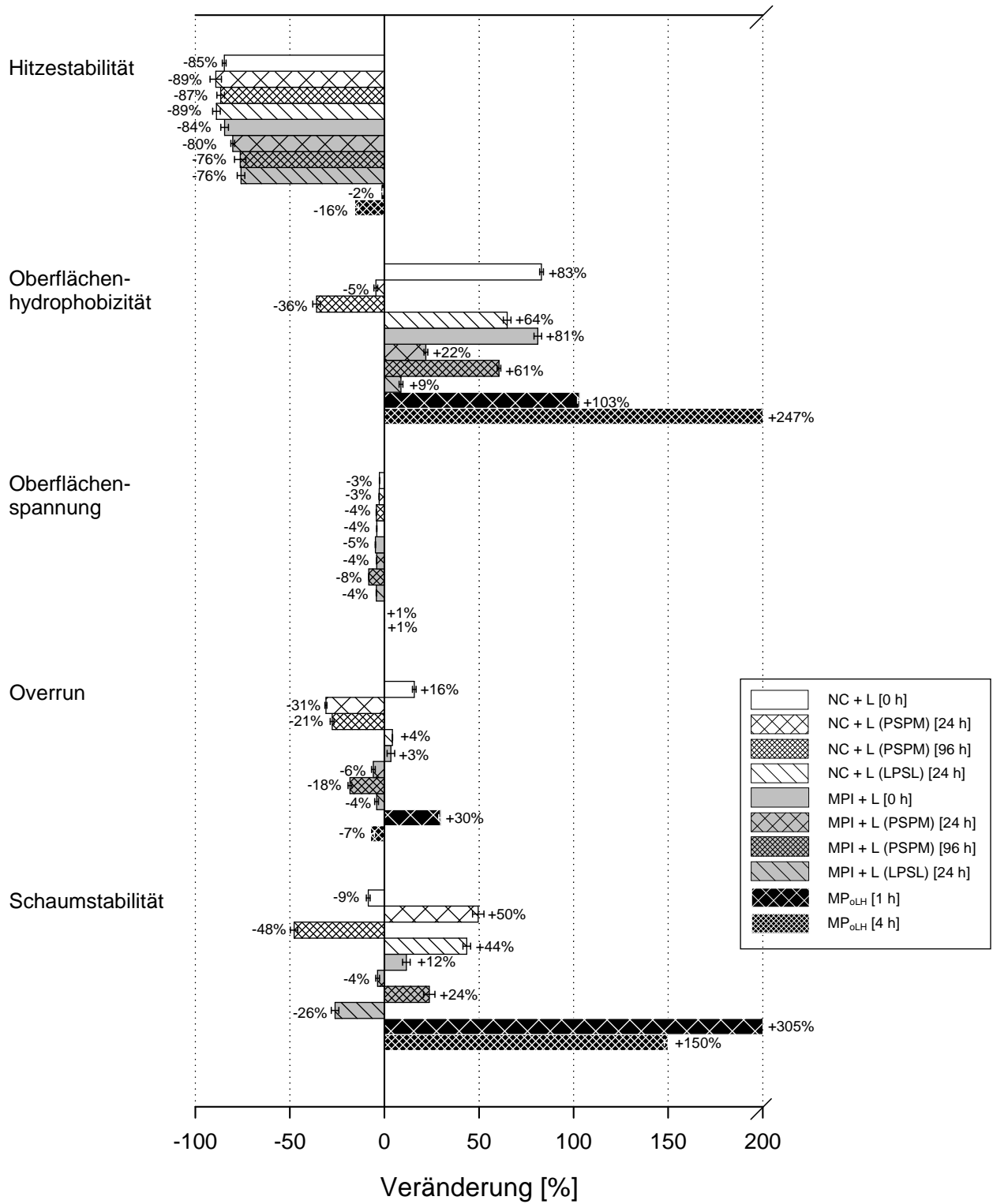
<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2) oder *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h



**Abb. 4.33b.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Glucose

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, G = Glucose, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

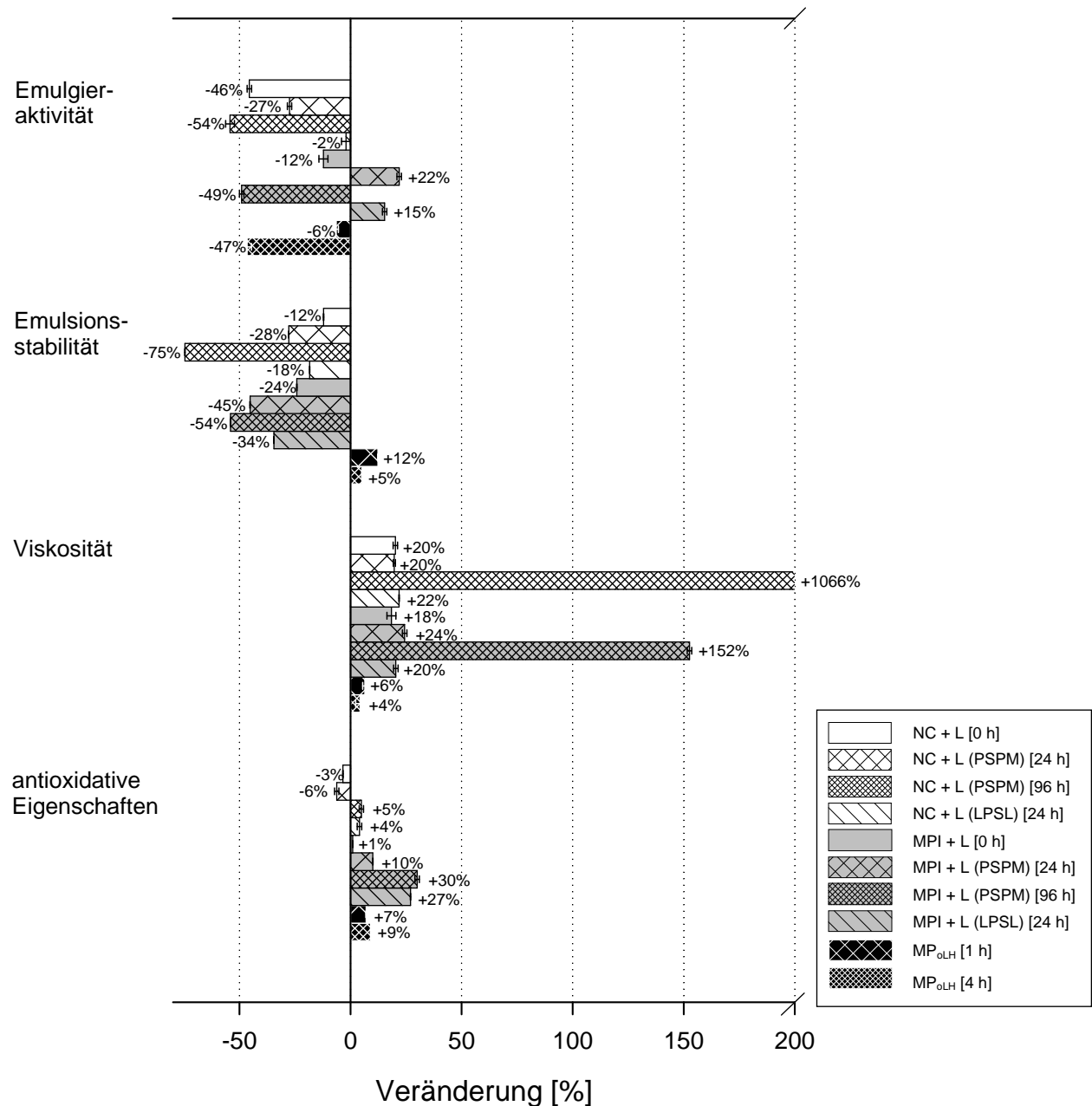
<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2) oder *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h



**Abb. 4.34a.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Lactose

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, L = Lactose, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2) oder *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 96 h

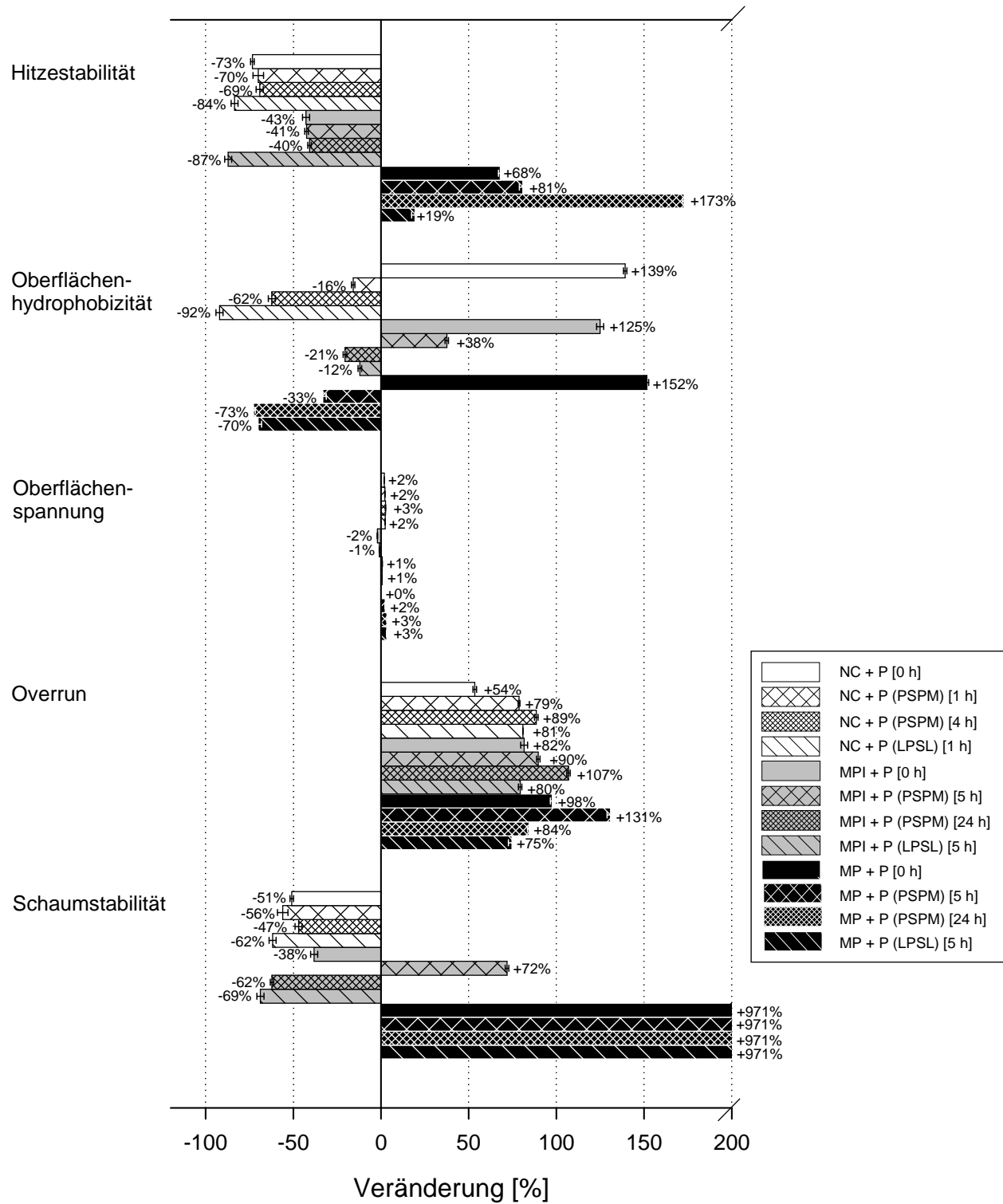


**Abb. 4.34b.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Lactose

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, L = Lactose, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2) oder *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 96 h

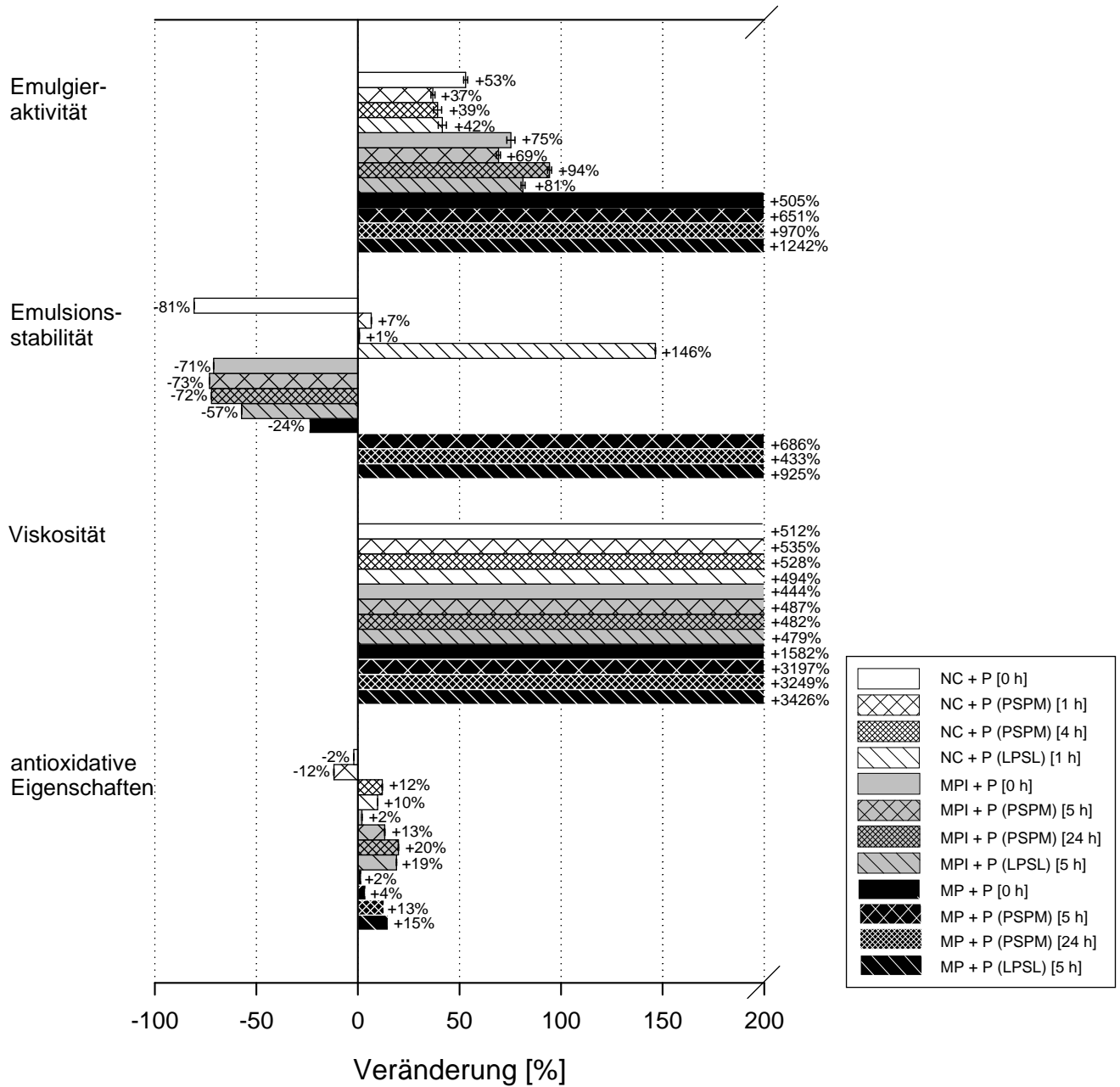




**Abb. 4.35a.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Pektin

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

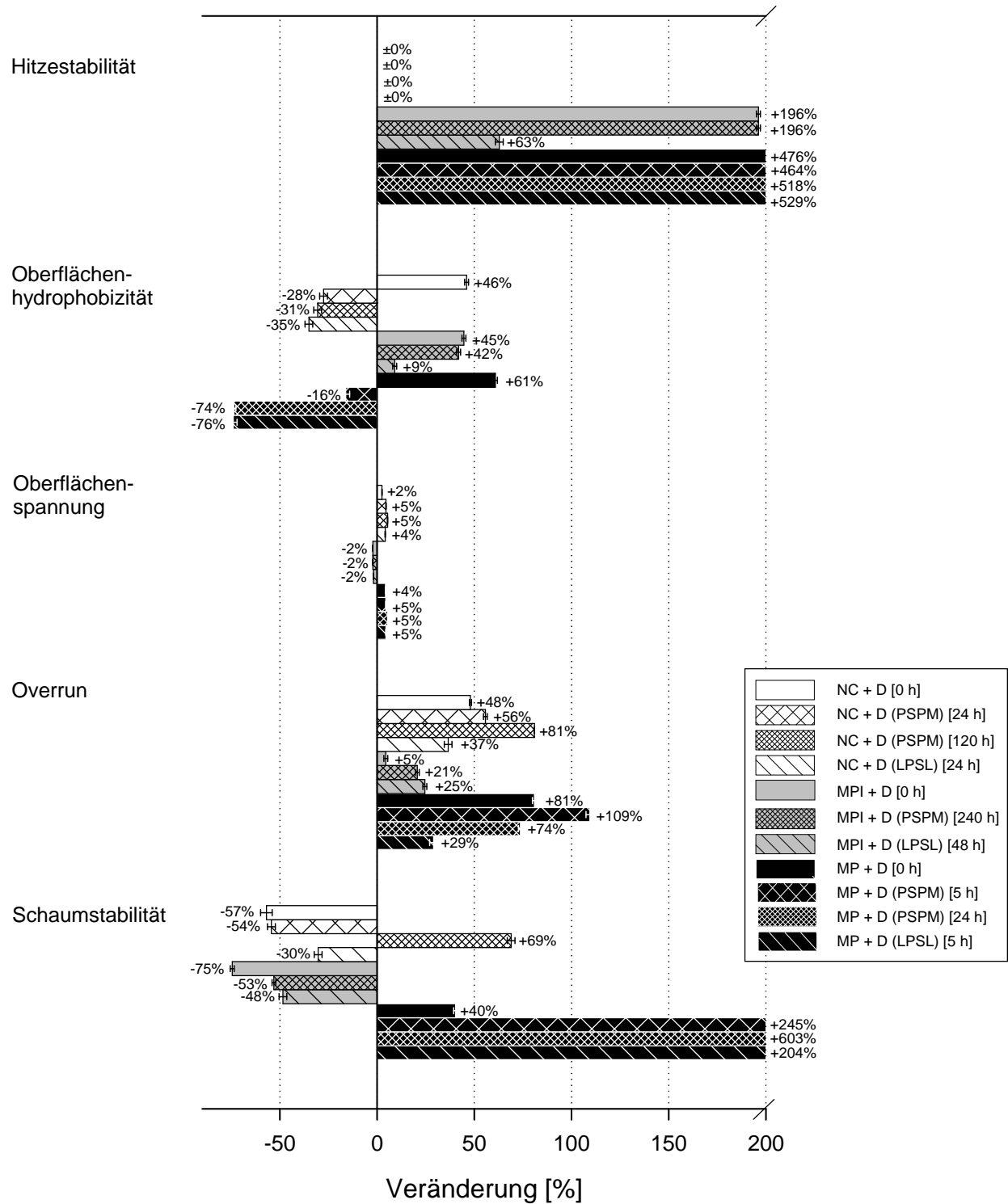
<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 24 h



**Abb. 4.35b.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Pektin

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin, PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

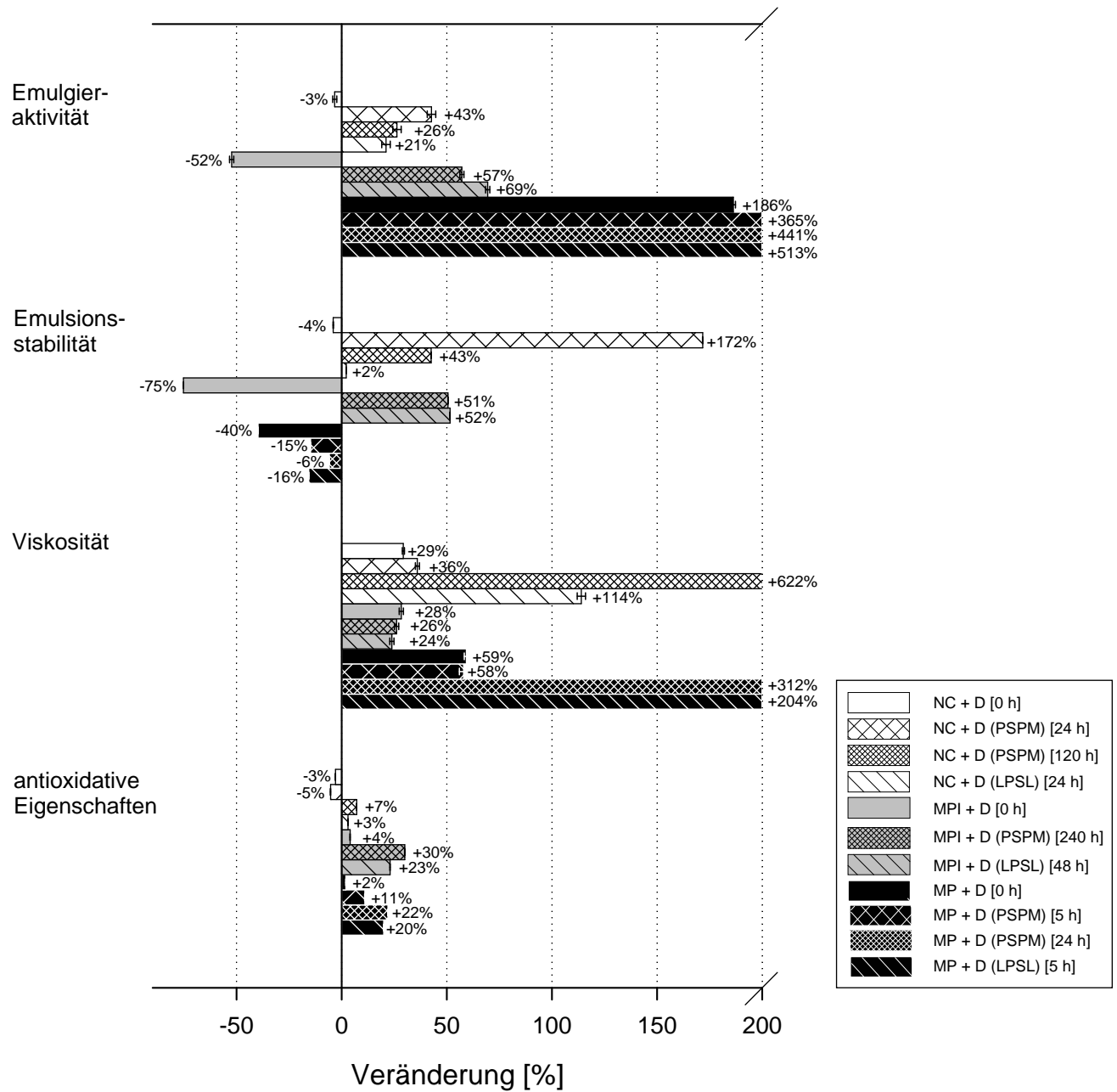
<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 24 h



**Abb. 4.36a.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Dextran [40.000 g/mol]

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D = Dextran [40.000 g/mol], PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSP = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 240 h



**Abb. 4.36b.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Dextran [40.000 g/mol]

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D = Dextran [40.000 g/mol], PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [40.000 g/mol] (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 240 h

Eine geringere Oberflächenhydrophobizität von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten im Vergleich zu unbehandeltem Protein wurde ermittelt für  $\beta$ -Lactoglobulin/Glucose-*Maillard*-Produkte (Nacka et al. 1998, van Teeffelen et al. 2005), für  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkte (Nacka et al. 1998, Bouhallab et al. 1999), für  $\beta$ -Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte (Mu et al. 2006) und für Sojaprotein/Carrageenan-*Maillard*-Produkte (Molina Ortiz et al. 2004). Molina Ortiz et al. (2004) erklärten die geringere Oberflächenhydrophobizität von Sojaprotein/Carrageenan-*Maillard*-Produkten im Vergleich zu unbehandeltem Sojaprotein auch mit hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen, die durch *Maillard*-Reaktion ausgebildet werden.

Zum anderen wurde beobachtet, dass die Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion infolge einer teilweisen Entfaltung der Tertiärstruktur von Proteinmolekülen ansteigt. Es wurde nachgewiesen, dass die Tertiärstruktur von Protein durch *Maillard*-Reaktion entfaltet wird infolge (a) einer chemisch-physikalischen Entfaltung des Proteins durch den Wärmeeintrag (Broersen et al. 2004) und die relative Feuchte (Morgan et al. 1999a) sowie infolge (b) einer sterischen Hinderung intra- und intermolekularer Proteinwechselwirkungen durch die Bindung von Zuckermolekülen (Nacka et al. 1998, Wooster und Augustin 2007). Ein Anstieg der Oberflächenhydrophobizität von Protein durch *Maillard*-Reaktion wurde für die *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lactose nachgewiesen (Morgan et al. 1999b).

Arakawa und Timasheff (1982) und Uruakpa und Arntfield (2006) wiesen nach, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Saccharid auch ohne *Maillard*-Reaktion auftreten, die die Moleküloberfläche von Proteinmolekülen vergrößern. Nach Uruakpa und Arntfield (2006) stieg die Oberflächenhydrophobizität von Rapsprotein in Gegenwart von Carrageenan und in Gegenwart von Guar an.

### Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung von Milcheiweißlösungen verändert sich durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden im Wesentlichen nicht (Abb. 4.33a, Abb. 4.34a, Abb. 4.35a, Abb. 4.36a, Abb. A.14a). Eine um bis zu 8% geringere Oberflächenspannung wurde für Lösungen von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Glucose (Abb. 4.33a) und für Lösungen von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Lactose (Abb. 4.34a) im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Milcheiweiß festgestellt. Eine um bis zu 5% höhere Oberflächenspannung wurde für Lösungen von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Pektin (Abb. 4.35a) und für Lösungen von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Dextran (Abb. 4.36a, Abb. A.14a) im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Milcheiweiß ermittelt.

Die Oberflächenspannung von Lösungen, die mit *Maillard*-Produkten von Milcheiweiß hergestellt wurden, wird bestimmt durch die Oberflächeneigenschaften des Proteins, die Oberflächeneigenschaften des Saccharids und die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte. Es ist wahrscheinlich, dass neben den Veränderungen der Oberflächenhydrophobizität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion (Abb. 4.33a, Abb. 4.34a, Abb. 4.35a, Abb. 4.36a, Abb. A.14a) auch Veränderungen der Nettoladung von Milcheiweißmolekülen durch *Maillard*-Reaktion die Werte der Oberflächenspannung beeinflussen. Es wurde nachgewiesen, dass eine Glycosylierung von Aminogruppen in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion zu einer weniger positiven Nettoladung von Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkten (Gaucher et al. 2008, Venkatachalam et al. 1993), von Molkenprotein/Lactose-*Maillard*-Produkten (Nacka et al. 1998) und von

Molkenprotein/Glucose-*Maillard*-Produkten (Nacka et al. 1998) führt. Besonders die kationischen, funktionellen Gruppen von Protein bestimmen nach Belloque and Smith (1998) die Oberflächeneigenschaften und die Schaumbildungseigenschaften von Protein. Andere Autoren wiesen eine höhere Nettoladung von  $\beta$ -Lactoglobulin/Glucose-*Maillard*-Produkten (van Teeffelen et al. 2005), von  $\beta$ -Lactoglobulin/Fructooligosaccharid-*Maillard*-Produkten (Trofimova und de Jongh 2004) und von Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkten (Neiryneck et al. 2004) im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß nach.

Für die Oberflächenspannung von Milcheiweißlösungen wurde berichtet, dass  $\beta$ -Lactoglobulin/Akaziengummi-*Maillard*-Produkte (Schmidt et al. 2005) und  $\beta$ -Lactoglobulin/Fructooligosaccharid-*Maillard*-Produkte (Trofimova und de Jongh 2004) zur Ausbildung einer geringeren Oberflächenspannung führen als unbehandeltes  $\beta$ -Lactoglobulin. Dunlap und Côté (2005) berichteten, dass kleine  $\beta$ -Lactoglobulin/Dextran-*Maillard*-Produkte die Oberflächenspannung von Proteinlösungen stärker senkten als vergleichsweise größere  $\beta$ -Lactoglobulin/Dextran-*Maillard*-Produkte. Große *Maillard*-Produkte konnten durch sterische Hinderung vergleichsweise schlecht an Oberflächen adsorbieren (Dunlap und Côté 2005, Courthaudon et al. 1989, Thomas et al. 2004b) und sich an der Grenzfläche entfalten (Thomas et al. 2004b). Fechner et al. (2007) konnten keine Veränderungen der Oberflächenspannung nachweisen, die durch Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte im Vergleich zu unbehandeltem Casein ausgebildet wird.

Nach Angaben in der Literatur verhalten sich neben Proteinen auch Saccharide oberflächenaktiv. Saccharide unterstützen (Leroux et al. 2003) oder hemmen (Martinez et al. 2007) die Oberflächenaktivität von Proteinen (Benichou et al. 2002). Es wurde berichtet, dass hydrophile Saccharide wie Glucose die Adsorption und die Dilatation von Milcheiweiß an Oberflächen fördern (Baeza et al. 2004). Saccharidmoleküle, die wie Milcheiweiß bei pH 7 negativ geladen sind, konkurrieren mit Milcheiweiß um die Adsorption an Oberflächen und um die Dilatation an Grenzflächen (Benichou et al. 2002). Eine Konkurrenz um Grenzfläche wurde berichtet für Molkenprotein und Dextran (Schaink und Smit 2007), für Molkenprotein und Pektin (Ercelebi und Ibanoglu 2007, Ganzevles et al. 2006) und für Molkenprotein und Xanthan (Sun et al. 2007).

### Overrun

Nach den Abbildungen 4.34a und 4.35a bilden Lösungen von Milcheiweiß/Glucose- und Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten im Wesentlichen einen geringeren Overrun aus als Lösungen von unbehandeltem Milcheiweiß. Im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Milcheiweiß wurde für Lösungen von Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkten ein um bis zu 131% höherer Overrun ermittelt (Abb. 4.35a) und für Lösungen von Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkten ein um bis zu 109% höherer Overrun (Abb. 4.36a). Nach eigenen Beobachtungen konnten Lösungen von Natriumcaseinat/Pektin-, Natriumcaseinat/Dextran- und Gesamtmilchprotein/Pektin-*Maillard*-Produkten unter den gegebenen Bedingungen (Kap. 3.2.4.4.) vollständig verschäumt werden.

In der Literatur wurden verschiedene Angaben zu den Schaumbildungseigenschaften von *Maillard*-Produkten aus Protein und Saccharid gemacht.

Nach Chevalier et al. (2001a) stieg die Schaumdichte von Proteinschäumen aus Lösungen von  $\beta$ -Lactoglobulin an, wenn  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose oder mit Lactose modifiziert wurde. Im Vergleich zu unbehandeltem Protein ermittelten Schmidt et al. (2005) eine verbesserte Aufschlagfähigkeit von  $\beta$ -Lactoglobulin/Akaziengummi-*Maillard*-Produkten, Mishra

et al. (2001) von Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkten, Dickinson und Izgi (1996) von Blutserumalbumin/Dextran-*Maillard*-Produkten, Dickinson und Izgi (1996) von Lysozym/Dextran-*Maillard*-Produkten und Diftis und Kiosseoglou (2006) von Sojaprotein/Dextran-*Maillard*-Produkten. Ein höheres Schaumvolumen wurde auch für Lösungen von Erbsenprotein nachgewiesen, das durch chemische Alkylierung mit Lactose modifiziert wurde (Pedrosa et al. 1997).

Andere Autoren berichteten über eine geringere Aufschlagfähigkeit von Lösungen von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Protein am Beispiel von Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkten (Thomas et al. 2004b) und von  $\beta$ -Casein/Dextran-*Maillard*-Produkten (Dickinson und Izgi 1996). Thomas et al. (2004b) diskutierten als Ursache einer geringen Aufschlagfähigkeit der Lösungen von Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkten eine vergleichsweise langsame Adsorption der *Maillard*-Produkte an die Luft/Flüssig-Grenzfläche.

Eine Beeinträchtigung der Schaumbildungseigenschaften von Protein wurde in der Literatur auch berichtet für Wechselwirkungen zwischen Protein und Saccharid, die ohne *Maillard*-Reaktion zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und Pektin (Ganzevles et al. 2006), zwischen Ovalbumin und Pektin (Kudryashova et al. 2007) und zwischen Sojaprotein und Hydroxypropylmethylcellulose (Martinez et al. 2007) auftreten. Ein geringes Aufschlagvolumen der Lösungen von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten im Vergleich zu Lösungen von unbehandeltem Protein kann auch mit einer höheren Viskosität der Lösungen von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten in Verbindung gebracht werden (Ganzevles et al. 2006). Die hohe Viskosität erschwert das mechanische Einschlagen von Luft in Proteinlösungen und verzögert die Adsorption von Proteinmolekülen an Grenzflächen (Ganzevles et al. 2006).

### Schaumstabilität

Aus den Abbildungen 4.33a, 4.34a, 4.35a, 4.36a und A.14a geht hervor, dass Proteinschäume, die durch Gesamtmilchprotein/Saccharid-*Maillard*-Produkte stabilisiert werden, wesentlich stabiler sind als Proteinschäume aus unbehandeltem Gesamtmilchprotein. Durch *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Glucose steigt die Schaumstabilität um bis zu 311% an (Abb. 4.33a), durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose um bis zu 305% (Abb. 4.34a), durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin um bis zu 971% (Abb. 4.35a) und durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran um bis zu 603% (Abb. 4.36a, Abb. A.14a). Proteinschäume, die durch Gesamtmilchprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte stabilisiert werden (Abb. 4.35a), waren nach eigenen Beobachtungen so stabil, dass die Messung nach einer Messdauer von 240 min abgebrochen wurde.

Für Proteinschäume, die durch Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte oder durch Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkte stabilisiert werden, kann kein eindeutiger Einfluss der *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß auf die Stabilität von Proteinschäumen abgeleitet werden. Eine Verbesserung der Schaumstabilität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion wurde für Natriumcaseinat/Glucose-Mischungen [1 h] um bis zu 52% festgestellt (Abb. 4.33a), für Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen [1 h] um bis zu 50% (Abb. 4.34a), für Molkenproteinisolat/Glucose-Pulvermischungen [4 h] um 25% (Abb. 4.33a), für Molkenproteinisolat/Lactose-Pulvermischungen [96 h] um 24% (Abb. 4.34a), für Molkenproteinisolat/Pektin-Pulvermischungen [5 h] um 72% (Abb. 4.35a) und für Natriumcaseinat/Dextran-Pulvermischungen [120 h] um 69% (Abb. 4.36a, Abb. A.14a).

In der Literatur wurde durch verschiedene Autoren - im Vergleich zu unbehandeltem Protein - sowohl ein Anstieg als auch eine Verminderung der Stabilität von Proteinschäumen berichtet, die durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte stabilisiert wurden.

Im Vergleich zu unbehandeltem Protein wurde eine höhere Schaumstabilität nachgewiesen für Proteinschäume von  $\beta$ -Lactoglobulin/Glucose-*Maillard*-Produkten (Chevalier et al. 2001a), von  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkten (Chevalier et al. 2001a, French und Harper 2003), von  $\beta$ -Lactoglobulin/Akaziengummi-*Maillard*-Produkten (Schmidt et al. 2005), von Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkten (Mishra et al. 2001) und von Hühnereineiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkten. Es wurde beschrieben, dass *Maillard*-Produkte aus Protein und Polysacchariden wie Pektin und Dextran besonders dicke, viskoelastische Grenzflächenfilme zwischen Luftphase und Wasserphase ausbilden (Wooster und Augustin 2006, Fechner et al. 2007, Trofimova und de Jongh 2004). Dunlap und Côté (2005) diskutierten, dass die verzweigte Struktur von Dextran in Protein/Dextran-*Maillard*-Produkten die innere Phase disperser Systeme sterisch vor einer Aufräumung schützt. Als Schutz von Proteinschäumen vor Aufräumung müssen auch die höhere Viskosität der Lösungen von *Maillard*-Produkten (Ganzevles et al. 2006) und die - je nach System - stärkeren hydrophilen Eigenschaften von *Maillard*-Produkten (Fechner et al. 2007) im Vergleich zu unbehandeltem Protein berücksichtigt werden.

Andere Autoren berichteten über eine Abnahme der Stabilität von Proteinschäumen als Folge einer Glycosylierung von Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose (Thomas et al. 2004b) oder aber als Folge einer chemischen Alkylierung von Erbsenprotein mit Glucose oder mit Lactose (Pedrosa et al. 1997). Wooster und Augustin (2006) beobachteten, dass Molkenprotein/Dextran-*Maillard*-Produkte zwar zur Ausbildung dicker Grenzflächenfilme zwischen Luftphase und Wasserphase führen, dass aber die Dicke der Grenzflächenschicht abnimmt, wenn die Menge an Dextran ansteigt, die pro Molekül Protein durch *Maillard*-Reaktion gebunden wird. Es ist wahrscheinlich, dass sich Moleküle von Molkenprotein/Dextran-*Maillard*-Produkten gegenseitig sterisch an einer Adsorption an die Grenzfläche hindern.

### Emulgieraktivität

Es wurde ermittelt, dass die Emulgieraktivität von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose (Abb. 4.33b) und durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose (Abb. 4.34b) im Wesentlichen absinkt. Nur für *Maillard*-Produkte von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver [1 h] (Abb. 4.33b) und für *Maillard*-Produkte aus Molkenproteinisolat und Lactose [24 h] (Abb. 4.34b) wurde eine höhere Emulgieraktivität ermittelt als für unbehandeltes Milcheiweiß.

Die Emulgieraktivität von Milcheiweiß - besonders die Emulgieraktivität von Gesamtmilchprotein - steigt durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin um bis zu 1242% (Abb. 4.35b) oder durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran um bis zu 513% (Abb. 4.36b, Abb. A.14b).

In Übereinstimmung mit den Abbildungen 4.36b und A.14b wurde in der Literatur ein Anstieg der Emulgieraktivität von Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran berichtet für Blutserumalbumin (Dickinson und Izgi 1996, Dickinson und Semenova 1992), für Casein (Mu et al. 2006, Aminlari et al. 2005, Dickinson und Izgi 1996), für Lysozym (Scaman et al. 2006, Kato et al. 1988a, Aminlari et al. 2005, Dickinson und Izgi 1996), für Hühnereineiweiß (Scaman et al. 2006, Kato et al. 1988a), für Fischprotein (Fujiwara et al. 1998), für Sojaprotein (Kato et al. 1988a, Diftis und Kiosseoglou 2004) und für Bohnenprotein (Dickinson und Semenova 1992).



Eine höhere Emulgieraktivität von Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin (Abb. 4.35b) wurde in der Literatur für Molkenprotein (Mishra et al. 2001, Einhorn-Stoll et al. 2005) und für Casein (Al-Hakkak und Kavale 2002) beschrieben. Es wurde beobachtet, dass Öltröpfchen in O/W-Emulsionen, die durch Protein/Dextran-*Maillard*-Produkte (Fechner et al. 2007, Dickinson und Semenova 1992) oder durch Protein/Pektin-*Maillard*-Produkte (Al-Hakkak und Kavale 2002, Neiryneck et al. 2004) ausgebildet werden, eine geringere Größe aufweisen als Öltröpfchen in O/W-Emulsionen, die durch unbehandeltes Protein ausgebildet werden.

Ein Anstieg der Emulgieraktivität von Protein durch *Maillard*-Reaktion wurde in der Literatur auch für Protein/Saccharid-Mischungen aus Molkenprotein und Glucose (Nacka et al. 1998), aus Molkenprotein und Lactose (Nacka et al. 1998, Hattori et al. 1997), aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Alginat (Hattori et al. 1997), aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Chitosan (Hattori et al. 2000), aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Chitopentose (Hattori et al. 2000), aus Caseinmacropeptid und Lactose (Moreno et al. 2002), aus Casein und Maltodextrin (Morris et al. 2004) und aus Fischprotein und Alginat (Sato et al. 2003) nachgewiesen. Nach Pedrosa et al. (1997) stieg die Emulgieraktivität von Erbsenprotein durch eine chemische Alkylierung mit Glucose oder mit Lactose. Nach Chevalier et al. (2001a), Miralles et al. (2007), Neiryneck et al. (2004) und Akhtar und Dickinson (2007) konnte ein Anstieg der Emulgieraktivität von Molkenprotein durch *Maillard*-Reaktion nur nachgewiesen werden bei pH  $\geq 5$  für Molkenprotein/Glucose-*Maillard*-Produkte, bei pH  $\geq 5$  für Molkenprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte, bei pH  $\geq 4$  für Molkenprotein/Chitosan-*Maillard*-Produkte, bei pH 5,5 für Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte und bei pH  $\leq 7$  für Molkenprotein/Maltodextrin-*Maillard*-Produkte.

Andere Autoren konnten für *Maillard*-Produkte aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactose (French und Harper 2003), aus Molkenproteinkonzentrat und Carboxymethylcellulose (Kika et al. 2007), aus Natriumcaseinat und Glucose (Oliver et al. 2006b), aus Natriumcaseinat und Lactose (Oliver et al. 2006b) sowie aus Ovalbumin und Pektin (Kato et al. 1988a) keine wesentlich andere Emulgieraktivität feststellen als für unbehandeltes Protein.

Einige Studien berichteten über verminderte Emulgiereigenschaften von Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden für Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte (Thomas et al. 2004b), für Casein/Pektin-*Maillard*-Produkte (Einhorn-Stoll et al. 2005) und für Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte (Dickinson und Semenova 1992). Thomas et al. (2004b) gaben an, dass sich Moleküle von Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkten an Grenzflächen weniger gut entfalten als Moleküle von unbehandeltem Gesamtmilchprotein. Nach Ganzevles et al. (2006) konkurrieren  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküle und Pektinmoleküle in  $\beta$ -Lactoglobulin/Pektin-Lösungen um die Adsorption an Grenzflächen. Die hohe Viskosität von  $\beta$ -Lactoglobulin/Pektin-Lösungen verzögert zusätzlich die Adsorption von  $\beta$ -Lactoglobulinmolekülen an Grenzflächen (Ganzevles et al. 2006).

### **Emulsionsstabilität**

Die Stabilität von Emulsionen, die durch Milcheiweiß stabilisiert werden, sinkt durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (Abb. 4.33b) und durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (Abb. 4.34b) um bis zu 65% ab. Nur *Maillard*-Produkte von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver (Abb. 4.33b) und *Maillard*-Produkte von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver (Abb. 4.34b) bilden um bis zu 44% stabilere Emulsionen als unbehandeltes Gesamtmilchprotein. Eine hohe Emulsionsstabilität wurde auch für Emulsionen ermittelt, die mit Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkten

(Abb. 4.35b), mit Natriumcaseinat/Dextran-*Maillard*-Produkten (Abb. 4.36b), mit Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkten (Abb. 4.36b) und mit Gesamtmilchprotein/Pektin-*Maillard*-Produkten (Abb. 4.35b) hergestellt wurden.

In der Literatur wurden unterschiedliche Ergebnisse zur Stabilisierung von Emulsionen durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte berichtet. Im Vergleich zu unbehandeltem Protein wurde eine höhere Stabilität von Emulsionen erreicht durch *Maillard*-Produkte aus  $\beta$ -Lactoglobulin und Dextran (Dunlap und Côté 2005), aus Blutserumalbumin und Dextran (Dickinson und Semenova 1992, Dickinson und Izgi 1996), aus Casein und Dextran (Fechner et al. 2007, Aminlari et al. 2005, Dickinson und Izgi 1996), aus Lysozym und Dextran (Aminlari et al. 2005, Scaman et al. 2006, Kato et al. 1988a, Dickinson und Izgi 1996), aus Hühnereieiweiß und Dextran (Scaman et al. 2006, Kato et al. 1988a), aus Fischprotein und Dextran (Fujiwara et al. 1998), aus Bohnenprotein und Dextran (Dickinson und Semenova 1992) und aus Sojaprotein und Dextran (Kato et al. 1988a). Morris et al. (2004) wiesen eine hohe Stabilität von Emulsionen mit Casein/Maltodextrin-*Maillard*-Produkten nach und Al-Hakkak und Kavale (2002) von Emulsionen mit Casein/Pektin-*Maillard*-Produkten. Eine hohe Emulsionsstabilität wurde auch ermittelt für Emulsionen, die mit *Maillard*-Produkten aus Molkenprotein und Glucose (Nacka et al. 1998), aus Molkenprotein und Lactose (Nacka et al. 1998), aus Molkenprotein und Pektin (Mishra et al. 2001, Einhorn-Stoll et al. 2005), aus Molkenprotein und Carboxymethylcellulose (Kika et al. 2007) und aus Molkenprotein und Maltopentose (Li et al. 2005) stabilisiert wurden. Nach Akhtar und Dickinson (2007) führen Molkenprotein/Maltodextrin-*Maillard*-Produkte nur bei pH-Werten  $\text{pH} \leq 7$  zur Ausbildung stabilerer Emulsionen als unbehandeltes Molkenprotein, nach Neiryneck et al. (2004) Molkenprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte nur bei pH 5,5.

Im Zusammenhang mit einer hohen Stabilität von Emulsionen, die durch *Maillard*-Produkte stabilisiert werden, wurde diskutiert, dass *Maillard*-Produkte aus Protein und Saccharid um bis zu 166% dickere Grenzflächenfilme ausbilden als unbehandeltes Protein (Fechner et al. 2007, Wooster und Augustin 2006, Mishra et al. 2001). Eine *Maillard*-Reaktion von Protein mit verzweigt-kettigen Polysacchariden verstärkt besonders die sterische Abstoßung von Öltröpfchen in Emulsionen (Dickinson 1998, Dunlap und Côté 2005, Kika et al. 2007, Dickinson und Semenova 1992, Diftis und Kiosseoglou 2006, Neiryneck et al. 2004). Wooster und Augustin (2006) führten eine hohe Emulsionsstabilität darauf zurück, dass sich der Proteinanteil von *Maillard*-Produkten in Emulsionen zur Ölphase ausrichtet und sich der Saccharidanteil von *Maillard*-Produkten zur wässrigen Phase ausrichtet. Auch Diftis und Kiosseoglou (2006) wiesen nach, dass die Oberfläche der Öltröpfchen in O/W-Emulsionen, die durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte stabilisiert werden, hydrophilere Eigenschaften aufweist. Nach Aminlari et al. (2005) führt besonders eine Zunahme der Hydrationsfähigkeit von Protein durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden zu einer Erhöhung der Stabilität disperser Systeme. Nach Dickinson (1998) fördert die hohe Viskosität, die *Maillard*-Produkte in wässriger Lösung ausbilden, eine Stabilisierung von O/W-Emulsionen gegenüber einer Entmischung von Ölphase und Wasserphase.

Keine Unterschiede der Emulsionsstabilität wurden festgestellt zwischen Emulsionen mit unbehandeltem Protein und Emulsionen mit Casein/Glucose-*Maillard*-Produkten (Oliver et al. 2006b), mit Casein/Lactose-*Maillard*-Produkten (Oliver et al. 2006b), mit  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkten (French und Harper 2003) oder mit Ovalbumin/Pektin-*Maillard*-Produkten (Kato et al. 1988a).

Weniger stabile Emulsionen im Vergleich zu unbehandeltem Protein wurden durch Thomas et al. (2004b) für Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte nachgewiesen und durch

Einhorn-Stoll et al. (2005) für Casein/Pektin-*Maillard*-Produkte. Es wurde diskutiert, dass durch die Anordnung großer Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte an der Grenzfläche disperser Systeme eine insgesamt nur kleine Proteindichte an der Phasengrenze erreicht wird (Diftis et al. 2005, Dunlap und Côté 2005, Wooster und Augustin 2006). Große Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte können an die Grenzfläche mehrerer Öltröpfchen adsorbieren und die Emulsion destabilisieren (Diftis et al. 2005, Dickinson 1998).

### Viskosität

Für Lösungen von Protein/Saccharid-Mischungen und besonders für Lösungen von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten wurde eine höhere Viskosität ermittelt als für unbehandeltes Milcheiweiß (Abb. 4.33b, Abb. 4.34b, Abb. 4.35b, Abb. 4.36b, Abb. A.14b). Im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß sind Lösungen von Milcheiweiß/Glucose-*Maillard*-Produkten um bis zu 164% viskoser (Abb. 4.33b), Lösungen von Milcheiweiß-Lactose-*Maillard*-Produkten um bis zu 1066% viskoser (Abb. 4.34b), Lösungen von Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkten um bis zu 3426% viskoser (Abb. 4.35b) und Lösungen von Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkten um bis zu 915% viskoser (Abb. 4.36b, Abb. A.14b).

Auch in der Literatur wird berichtet, dass Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte eine höhere Viskosität ausbilden als unmodifiziertes Protein. Nach Courthaudon et al. (1989) stieg die Viskosität von Proteinlösungen mit dem Grad der Glycosylierung von Protein durch chemische Alkylierung an. Es ist wahrscheinlich (Courthaudon et al. 1989), dass die Viskosität von Proteinlösungen durch die höhere Molmasse von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten und durch eine stärkere sterische Behinderung einzelner Moleküle in Lösungen von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten ansteigt. Oliver et al. (2006a) und Oliver et al. (2006b) wiesen für eine *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Glucose oder mit Lactose nach, dass die Viskosität von Proteinlösungen in Abhängigkeit der Zuckerkonzentration, der relativen Feuchte und der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion ansteigt. Lösungen von Natriumcaseinat/Glucose- oder Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkten waren um bis zu Faktor 28 viskoser als Lösungen von unbehandeltem Natriumcaseinat (Oliver et al. 2006a, Oliver et al. 2006b).

Ein Anstieg der Viskosität von Proteinlösungen durch *Maillard*-Reaktion von Protein mit Sacchariden wurde auch berichtet für Sojaprotein/Carrageenan-Mischungen (Molina Ortiz et al. 2004), für Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver (Fernández et al. 2003) und für Gesamtmilchprotein in konzentrierter Magermilch (Venkatachalam et al. 1993).

### Antioxidative Eigenschaften

Abbildungen 4.33b, 4.34b, 4.35b, 4.36b und A.14b stellen dar, dass die antioxidativen Eigenschaften von Milcheiweiß tendenziell durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, Lactose, Pektin oder Dextran ansteigen. Für Molkenproteinisolat ist ein Anstieg der antioxidativen Eigenschaften durch *Maillard*-Reaktion um bis zu 31% abgebildet (Abb. 4.33b) und für Gesamtmilchprotein um bis zu 22% (Abb. 4.36b). Die antioxidativen Eigenschaften von Natriumcaseinat steigen als Folge einer *Maillard*-Reaktion von Lyophilisaten aus Natriumcaseinat/Saccharid-Lösungen oder von Natriumcaseinat/Saccharid-Pulvermischungen, die über eine vergleichsweise längere Reaktionszeit von 4 Stunden (Abb. 4.33b, Abb. 4.35b),

von 96 Stunden (Abb. 4.34b) beziehungsweise von 120 Stunden (Abb. 4.36b, Abb. A.14b) hergestellt wurden, um bis zu 12% an.

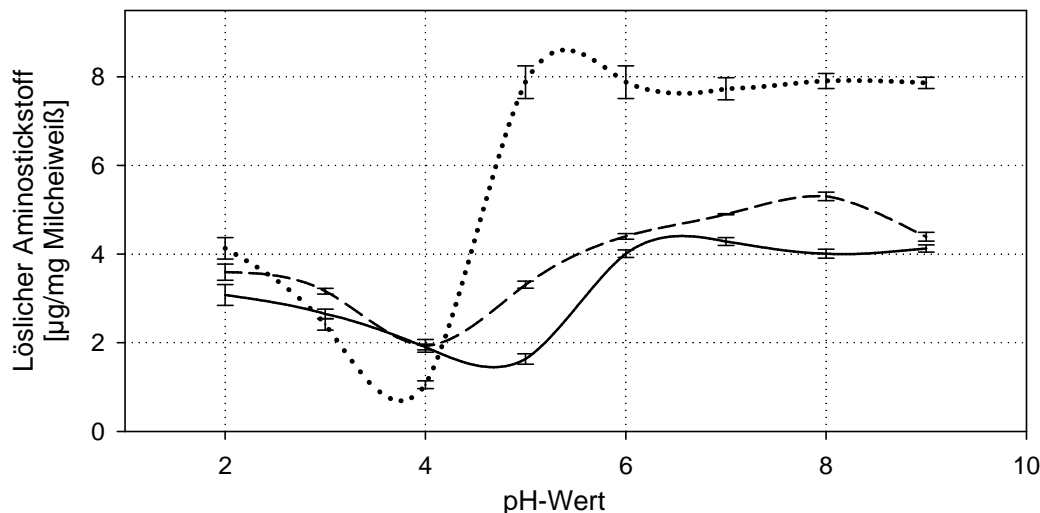
Dass durch *Maillard*-Reaktion von Aminoverbindungen mit Sacchariden antioxidativ wirksame Reaktionsprodukte gebildet werden, diskutierten Sun et al. (2006) für die *Maillard*-Reaktion von  $\alpha$ -Lactalbumin mit Allose, Fructose oder Glucose, Jing und Kitts (2002) für die *Maillard*-Reaktion von Casein mit Ribose, Fructose oder Glucose, Chevalier et al. (2001c) für die *Maillard*-Reaktion von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Glucose oder Lactose, Calligaris et al. (2004) für die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Lactose, Morales und Jimenez-Perez (2001) für die *Maillard*-Reaktion der Aminosäuren Alanin, Glycin und Lysin mit Glucose oder Lactose sowie Yilmaz und Toledo (2005) für die *Maillard*-Reaktion der Aminosäuren Histidin und Glutaminsäure mit Glucose. Nach Sun et al. (2006) konnten die antioxidativen Eigenschaften von  $\alpha$ -Lactalbumin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose bei 50°C und 55% r. F. über 48 Stunden um den Faktor 2,9 gesteigert werden und durch *Maillard*-Reaktion mit Allose um den Faktor 5,4.

Wie in den eigenen Untersuchungen für Natriumcaseinat bestätigt wurde, entstehen antioxidativ wirksame *Maillard*-Produkte nach Sun et al. (2006) und nach Calligaris et al. (2004) erst durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß über lange Reaktionszeiten im Zusammenhang mit der Bildung hochmolekularer Melanoidine. Nach Jing und Kitts (2002) und Yilmaz und Toledo (2005) wurde eine antioxidative Wirksamkeit von *Maillard*-Produkten besonders gegenüber wasserlöslichen Radikalen festgestellt.

### **Stickstofflöslichkeit**

Über die techno-funktionellen Eigenschaften hinaus, die in den Abbildungen 4.33, 4.34, 4.35, 4.36 und A.14 dargestellt sind, wurde untersucht, wie sich die Stickstofflöslichkeit von Milcheiweiß - als Maß der Proteinlöslichkeit - durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden verändert. Die Stickstofflöslichkeit von unbehandeltem Milcheiweiß und von Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkten wurde als der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß ermittelt (s. Kap. 3.2.3.4.) und ist in den Abbildungen 4.37 - 4.39 und A.15 - A.17 in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

Abbildung 4.37 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Milcheiweiß und dem pH-Wert am Beispiel von unmodifiziertem Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkten. Nach Abbildung 4.37 wurde der geringste Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unmodifiziertem Natriumcaseinat bei pH-Werten um pH 4,5 ermittelt, ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff bei pH-Werten <pH 4,5 und bei pH-Werten >pH 4,5. Für Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte wurde bei pH-Werten  $\geq$ pH 4,5 ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen als in unmodifiziertem Natriumcaseinat. Der niedrigste Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde für Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [1 h] bei  $\sim$ pH 3,8 festgestellt beziehungsweise für Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [4 h] bei  $\sim$ pH 4,0 (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37.** Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkten<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

Natriumcaseinat (—), Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [1 h] (....),  
Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [4 h] (---)

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose im isoelektrischen Bereich von unbehandeltem Natriumcaseinat (~pH 4,5) und bei pH-Werten  $\geq$ pH 4,5 ansteigt.

Auch für die *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Lactose (Abb. A.15A), mit Pektin (Abb. A.15B) und mit Dextran (Abb. A.15C) wurde eine höhere Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten bei pH-Werten  $\geq$ pH 4,5 nachgewiesen als in unmodifiziertem Natriumcaseinat. Für Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte wurde ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff im gesamten untersuchten pH-Bereich von pH 2 - pH 9 ermittelt als für unmodifiziertes Natriumcaseinat (Abb. A.15B). Für *Maillard*-Produkte, die über eine kurze Reaktionszeit hergestellt wurden, wurde ein vergleichsweise höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff ermittelt als für *Maillard*-Produkte, die über eine längere Reaktionszeit hergestellt wurden (Abb. A.15B, Abb. A.15C).

Auch in der Literatur wurde ein Anstieg der Stickstofflöslichkeit von Casein durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden berichtet. Dass die Stickstofflöslichkeit von Casein im isoelektrischen Bereich von unmodifiziertem Casein ansteigt, wurde durch Oliver et al. (2006b) für die *Maillard*-Reaktion von Casein mit Glucose und mit Lactose berichtet, durch Fechner et al. (2007) und Aminlari et al. (2005) für die *Maillard*-Reaktion von Casein mit Dextran und durch Courthaudon et al. (1989) für die chemische Alkylierung von Casein mit Glucose. Mu et al. (2006) und Pan et al. (2006) beobachteten, dass Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte im isoelektrischen Bereich von unbehandeltem Casein Strukturen ausbilden, die - chemisch betrachtet - Micellen ähneln. Die Autoren beschrieben, dass die „Micellen“ von Casein/Dextran-*Maillard*-Produkten aus einem „Caseinkern“ bestehen, der durch eine „Hülle“ von Dextranmolekülen umgeben ist. Es ist

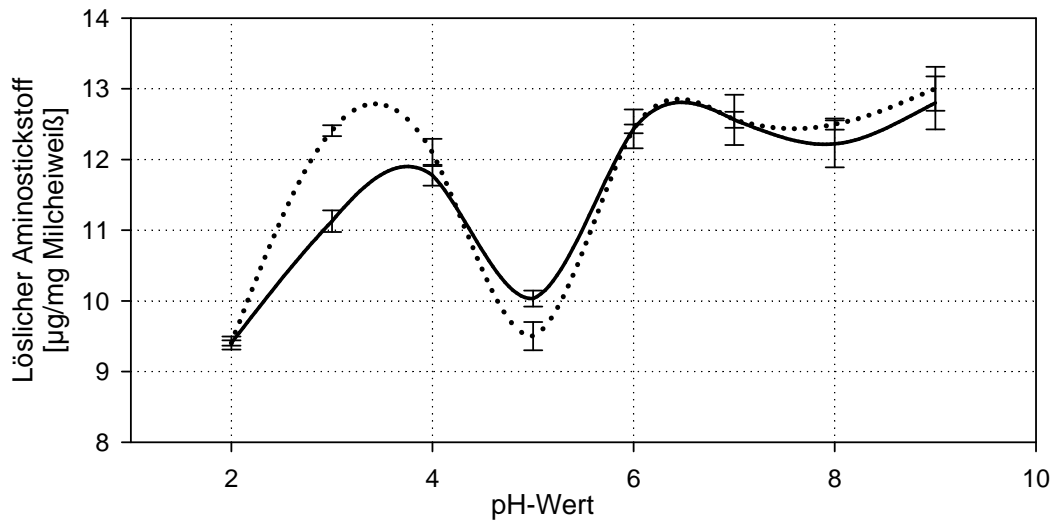
wahrscheinlich, dass die verzweigte Struktur von Dextranmolekülen die Caseinmoleküle sterisch vor einer Aggregation und einer Präzipitation im isoelektrischen Bereich schützt (Courthaudon et al. 1989).

In Abbildung 4.37 wurde festgestellt, dass sich der isoelektrische Bereich von unbehandeltem Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose von ~pH 4,5 bis auf ~pH 3,8 verschiebt. Auch Morris et al. (2004) ermittelten einen pH-Wert <pH 4,5 als den isoelektrischen Bereich von Casein/Maltodextrin-*Maillard*-Produkten. Da besonders die basischen Gruppen von Protein durch *Maillard*-Reaktion kovalente Bindungen mit Sacchariden eingehen, steigen als Folge die negative Nettoladung (Venkatachalam et al. 1993, Gaucher et al. 2008, Jiménez-Castaño et al. 2007) und die sauren Eigenschaften des Proteins an.

Abbildung 4.38 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an löslichem Aminostickstoff und dem pH-Wert für unmodifiziertes Molkenproteinisolat und für Molkenproteinisolat/Lactose-*Maillard*-Produkte dar. Nach Abbildung 4.38 wurde der geringste Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unmodifiziertem Molkenproteinisolat bei pH-Werten um pH 5 und bei pH <3 ermittelt. Wesentliche Unterschiede im Gehalt an löslichem Aminostickstoff zwischen Molkenproteinisolat und Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten wurden nicht festgestellt (Abb. 4.38). Ein tendenziell höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde nur bei pH-Werten um pH 3 in Molkenproteinisolat/Lactose-*Maillard*-Produkten (Abb. 4.38), in Molkenprotein/Glucose-*Maillard*-Produkten (Abb. A.16A) und in Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkten (Abb. A.16C) im Vergleich zu unmodifiziertem Molkenproteinisolat festgestellt. Für *Maillard*-Produkte aus Molkenproteinisolat und Pektin wurde ein geringerer Gehalt an löslichem Aminostickstoff ermittelt als für unbehandeltes Molkenproteinisolat (Abb. A.16B).

Die Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat im isoelektrischen Bereich von Molkenprotein (~pH 5) konnte unter den gegebenen Bedingungen durch *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Sacchariden im Wesentlichen nicht verbessert werden (Abb. 4.38, Abb. A.16).

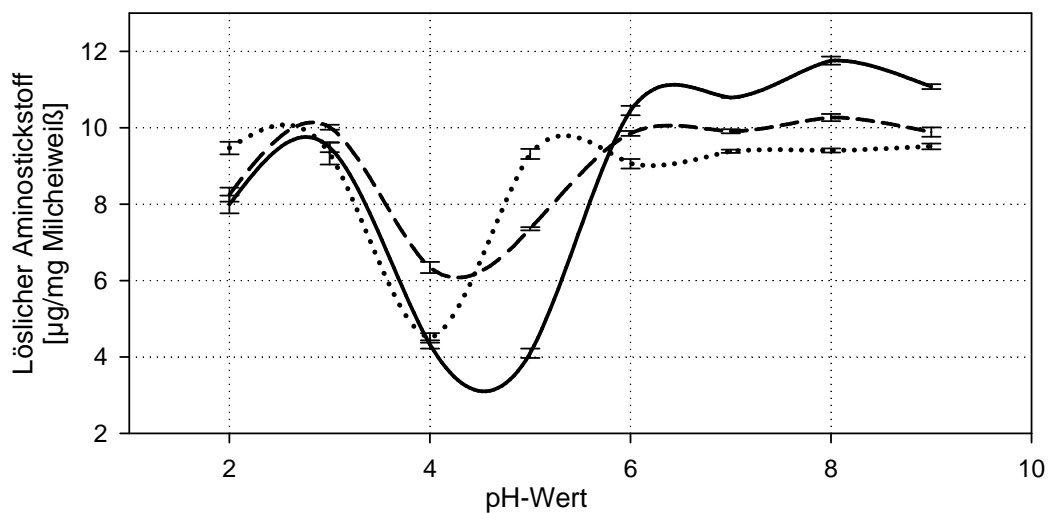
In der Literatur wurde im Vergleich zu unbehandeltem Molkenprotein von einer höheren Stickstofflöslichkeit von  $\beta$ -Lactoglobulin/Dextran-*Maillard*-Produkten bei pH 5 und bei pH 7 berichtet und von einer höheren Stickstofflöslichkeit von  $\alpha$ -Lactalbumin/Dextran-*Maillard*-Produkten bei pH 3 - pH 5 (Jiménez-Castaño et al. 2007). Eine höhere Stickstofflöslichkeit von  $\beta$ -Lactoglobulin im isoelektrischen Bereich wurde nach einer *Maillard*-Reaktion mit Glucose (Chevalier et al. 2001a) und mit Lactose (Chevalier et al. 2001a, Bouhallab et al. 1999) berichtet. Nach Nacka et al. (1998) sinkt der isoelektrische Bereich von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose oder mit Lactose von pH 5,15 bis auf pH 3,5 ab, nach Neiryneck et al. (2004) der isoelektrische Bereich von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin bis auf pH 4,0. Dass der isoelektrische Bereich von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion auf einen niedrigeren pH-Wert verschoben wird, berichteten auch Hattori et al. (1997) für  $\beta$ -Lactoglobulin/Alginat-*Maillard*-Produkte und Schmidt et al. (2005) für  $\beta$ -Lactoglobulin/Akaziengummi-*Maillard*-Produkte.



**Abb. 4.38.** Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Lactose-Maillard-Produkten<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

Molkenproteinisolat (—), Molkenproteinisolat/Lactose-Maillard-Produkte (....)

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 24 h



**Abb. 4.39.** Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein und von Maillard-Produkten aus Gesamtmilchprotein<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

Gesamtmilchprotein [0 h] (—), Gesamtmilchprotein [1 h] (....), Gesamtmilchprotein [4 h] (---)

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 0 h - 4 h

Abbildung 4.39 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an löslichem Aminostickstoff und dem pH-Wert für Gesamtmilchprotein und Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte dar.

Nach Abbildung 4.39 wurde der geringste Gehalt an löslichem Aminostickstoff in unmodifiziertem Gesamtmilchprotein bei pH-Werten um pH 4,5 ermittelt, ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff bei pH-Werten  $< \text{pH } 4,5$  und  $> \text{pH } 4,5$ . Für Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte wurde bei pH-Werten  $\geq \text{pH } 4,5$  ein höherer Gehalt an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen als in unmodifiziertem Gesamtmilchprotein (Abb. 4.39). Der niedrigste Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde für Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte [1 h] bei  $\sim \text{pH } 4,0$  festgestellt beziehungsweise für Gesamtmilchprotein/Lactose-*Maillard*-Produkte [4 h] bei  $\sim \text{pH } 4,2$  (Abb. 4.39).

Wie bereits für Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte dargestellt wurde, verschiebt sich der isoelektrische Bereich von Gesamtmilchprotein durch *Maillard*-Reaktion vermutlich als Folge einer Zunahme der sauren Eigenschaften von Milcheiweiß durch eine Glycosylierung basischer Aminosäurenreste (Venkatachalam et al. 1993).

Auch für *Maillard*-Produkte aus Gesamtmilchprotein und Pektin (Abb. A.17B) und aus Gesamtmilchprotein und Dextran (Abb. A.17C) wurde die geringste Löslichkeit des Proteins bei  $\sim \text{pH } 4,0$  festgestellt. Für Gesamtmilchprotein/Pektin-*Maillard*-Produkte und für Gesamtmilchprotein/Dextran-*Maillard*-Produkte wurde jedoch im gesamten untersuchten pH-Bereich ein geringerer Gehalt an löslichem Aminostickstoff nachgewiesen als in unbehandeltem Gesamtmilchprotein (Abb. A.17B, Abb. A.17C). Durch *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver wurden tendenziell höhere Gehalte an löslichem Aminostickstoff bei pH-Werten  $\geq \text{pH } 3$  festgestellt als für unmodifiziertes Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver (Abb. A.17A).

#### **Weitere techno-funktionelle Eigenschaften von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten**

Über die untersuchten techno-funktionellen Eigenschaften von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten hinaus werden in Literatur besonders die guten Gelbildungs- und Wasserbindungseigenschaften von *Maillard*-Produkten aus Molkenprotein und Pektin (Mishra et al. 2001), aus Molkenprotein und Maltopentose (Li et al. 2005), aus Sojaprotein und Carrageenan (Molina Ortiz et al. 2004), aus Hühnereieiweiß und Galactomannan (Matsudomi et al. 2002) und aus Hühnereieiweiß und Glucose (Handa und Kuroda 1999) berichtet.

Es wurde beschrieben, dass Casein/Dextran-*Maillard*-Produkte zur Verkapselung hydrophober Moleküle (Pan et al. 2006) oder zur Herstellung multipler Emulsionen (Fechner et al. 2007) eingesetzt werden können. Scamann et al. (2006) und Ho et al. (2000) synthetisierten Lysozym/Dextran-*Maillard*-Produkte und Polylysin/Dextran-*Maillard*-Produkte, für die neben ihren techno-funktionellen Eigenschaften auch eine antimikrobielle Wirkung in Lebensmitteln diskutiert wurde.

Nach Thomas et al. (2004b) schützt die *Maillard*-Reaktion, die während der Lagerung von Molkenpulver zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactose auftritt, das Molkenpulver vor der Bildung großer  $\alpha$ -Lactose-Monohydrat-Kristalle.



#### 4.2.8. In-vitro Proteolysierbarkeit von *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß

Es wurde untersucht, wie sich die Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden auf die in-vitro Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß auswirkt.

Milcheiweiß in unbehandelten Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen und in Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkten wurde mit Pancreatin inkubiert. Die Molmassenverteilung von Milcheiweiß und von Hydrolysaten aus Milcheiweiß wurde durch SDS-PAGE untersucht und densitometrisch ausgewertet.

**Tab. 4.30.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Natriumcaseinat, von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat, von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten und von Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten

		Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen			
		Molmassenfractionen [g/mol]			
		>2 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup>	<1 x 10 <sup>4</sup>
<b>[A]</b>	NC	19,0	56,8	13,9	10,3
	NC + G [1 h] <sup>2)</sup>	21,7	62,3	12,1	3,9
	NC + L [24 h] <sup>2)</sup>	20,9	57,9	12,7	8,5
	NC + P [1 h] <sup>2)</sup>	29,5	52,2	11,0	7,3
	NC + D40 [24 h] <sup>2)</sup>	38,5	43,4	10,9	7,2
<b>[B]</b>	NC	19,0	56,8	13,9	10,3
	NC + G [4 h] <sup>2)</sup>	54,8	28,3	13,3	3,6
	NC + L [96 h] <sup>2)</sup>	94,4	3,2	2,3	0,1
	NC + P [4 h] <sup>2)</sup>	45,6	37,3	12,1	5,0
	NC + D40 [120 h] <sup>2)</sup>	67,2	16,5	12,0	4,3
<b>[C]</b>	NC <sup>3)</sup>	0,1	0,7	33,5	65,7
	NC + G [1 h] <sup>2), 3)</sup>	0,0	0,5	32,1	67,4
	NC + L [24 h] <sup>2), 3)</sup>	0,0	0,7	30,7	68,6
	NC + P [1 h] <sup>2), 3)</sup>	0,2	0,3	29,3	70,2
	NC + D40 [24 h] <sup>2), 3)</sup>	0,3	9,6	42,9	47,2
<b>[D]</b>	NC <sup>3)</sup>	0,1	0,7	33,5	65,7
	NC + G [4 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	10,2	44,1	45,6
	NC + L [96 h] <sup>2), 3)</sup>	25,8	13,6	27,9	32,7
	NC + P [4 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	9,8	43,2	46,9
	NC + D40 [120 h] <sup>2), 3)</sup>	4,2	12,9	30,2	52,7

**[A]** = NC und NC/Saccharid-*Maillard*-Produkte [*Maillard*-Reaktion über kurze Reaktionszeit]

**[B]** = NC und NC/Saccharid-*Maillard*-Produkte [*Maillard*-Reaktion über lange Reaktionszeit]

**[C]** = Hydrolysate von NC und von NC/Saccharid-*Maillard*-Produkten [*Maillard*-Reaktion über kurze Reaktionszeit]

**[D]** = Hydrolysate von NC und von NC/Saccharid-*Maillard*-Produkten [*Maillard*-Reaktion über lange Reaktionszeit]

NC = Natriumcaseinat, G = Glucose, L = Lactose, P = Pektin, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 15 min, 37°C, pH 7,8

Tabelle 4.30 zeigt einen Überblick über die Molmassenverteilung, die für unbehandeltes Natriumcaseinat, für Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte, für Hydrolysate aus Natriumcaseinat und für Hydrolysate aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten ermittelt wurde.

Nach Tabelle 4.30 unterscheidet sich die Molmassenverteilung von unbehandeltem Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten besonders in Bezug auf Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol. In unbehandeltem Natriumcaseinat werden 19,0% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen, in Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten bis zu 94,4% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.30 [A], Tab. 4.30 [B]).

Hydrolysate aus unbehandeltem Natriumcaseinat und aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten unterscheiden sich besonders im prozentualen Gehalt an Proteinmolekülen  $<1 \times 10^4$  g/mol. In Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat werden 65,7% Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol nachgewiesen, in Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten 32,7% - 70,2% Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.30 [C], Tab. 4.30 [D]).

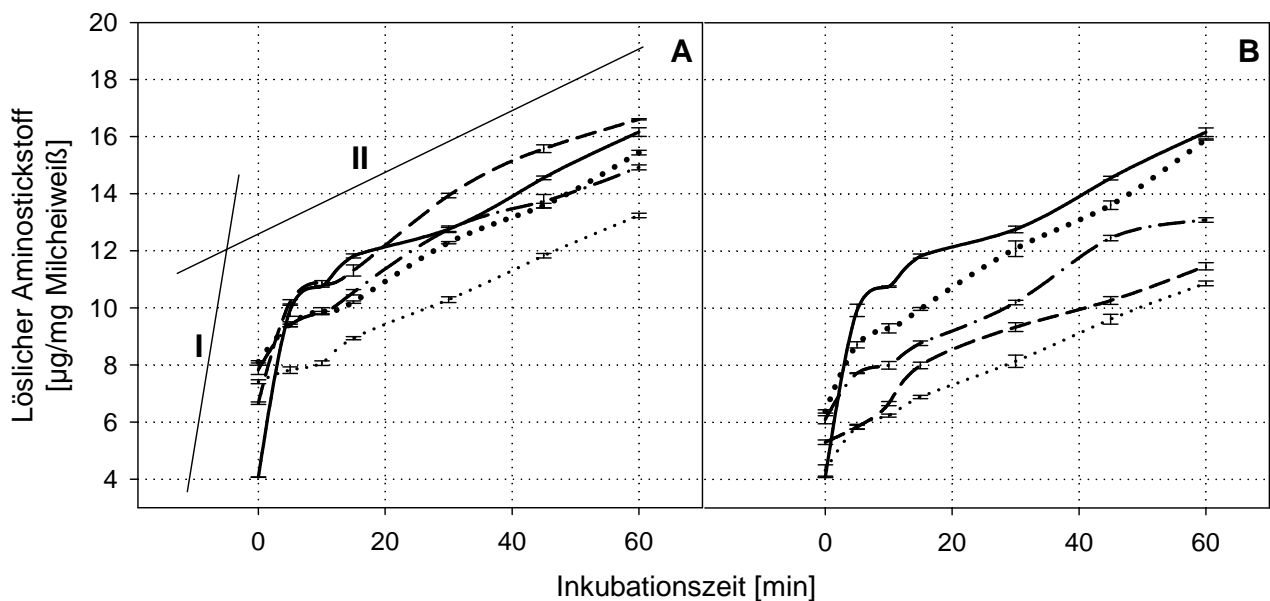
Proteinmoleküle mit Molmassen  $>2 \times 10^4$  g/mol sind in Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat im Wesentlichen nicht nachweisbar, sie treten jedoch besonders in Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten auf, die durch *Maillard*-Reaktion über eine lange Reaktionszeit hergestellt wurden (Tab. 4.30 [D]). In Hydrolysaten von *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat und Glucose [4 h], aus Natriumcaseinat und Lactose [24 h oder 96 h], aus Natriumcaseinat und Pektin [4 h] und aus Natriumcaseinat und Dextran [120 h] können bis zu 13,6% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen werden (Tab. 4.30 [C], Tab. 4.30 [D]). In Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkten [120 h] können 25,8% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen werden (Tab. 4.30 [D]).

Die Ergebnisse zur Molmassenverteilung zeigen, dass unbehandeltes Natriumcaseinat prozentual weniger Proteinpolymere enthält als Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte und dass Hydrolysate aus unbehandeltem Natriumcaseinat - im Wesentlichen - prozentual mehr Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol enthalten als Hydrolysate aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten.

Abbildung 4.40 stellt dar, wie sich der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat durch Inkubation mit Pancreatin verändert. Die Steigung der Graphen in Abbildung 4.40 steht im Zusammenhang mit einem Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat als Folge einer hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen.

Abbildung 4.40 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat und in Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten durch Inkubation mit Pancreatin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt. Der stärkste Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde innerhalb der ersten ~10 min der Inkubation von Natriumcaseinat mit Pancreatin ermittelt (Abb. 4.40, Reaktionskinetik I), ein weniger starker Anstieg innerhalb einer Inkubationszeit von 10 min - 60 min mit Pancreatin (Abb. 4.40, Reaktionskinetik II). Während sich der Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Reaktionskinetik II zwischen Natriumcaseinat und Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten nicht wesentlich unterscheidet, ist ein weniger starker Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Reaktionskinetik I für Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte im Vergleich zu Natriumcaseinat dargestellt (Abb. 4.40).

Vergleicht man die absoluten Veränderungen im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Hydrolyse von Natriumcaseinat, steigt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten durch Hydrolyse insgesamt weniger stark an als in unbehandeltem Natriumcaseinat (Abb. 4.40), besonders wenn Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte durch *Maillard*-Reaktion über eine lange Reaktionszeit hergestellt wurden (Abb. 4.40B)



**Abb. 4.40.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten<sup>1)</sup> aus Natriumcaseinat und in Hydrolysaten aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten<sup>2)</sup>

Natriumcaseinat (—), Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [1 h (A) oder 4 h (B)] (···), Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkte [24 h (A) oder 96 h (B)] (---), Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte [1 h (A) oder 4 h (B)] (-·-·-), Natriumcaseinat/Dextran-*Maillard*-Produkte [24 h (A) oder 120 h (B)] (···)

**A** = *Maillard*-Reaktion über kurze Erhitzungszeit, **B** = *Maillard*-Reaktion über lange Erhitzungszeit; **I** = Reaktionskinetik I, **II** = Reaktionskinetik II; Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

Für die Menge an Natriumhydroxid, die verbraucht wurde, um den pH-Wert während der Hydrolyse von Natriumcaseinat konstant zu halten, konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Hydrolyse von unbehandeltem Natriumcaseinat und der Hydrolyse von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten festgestellt werden (Abb. A.18). Durchschnittlich 0,23  $\mu\text{mol}$  Natriumhydroxid/mg Milcheiweiß wurden zur Hydrolyse von Natriumcaseinat beziehungsweise von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten über eine Reaktionszeit von 60 min mit Pancreatin verbraucht. Ein geringerer Verbrauch an Natriumhydroxid von 0,20  $\mu\text{mol}$ /mg Milcheiweiß wurde nur für die Hydrolyse von Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkten festgestellt, die durch *Maillard*-Reaktion über eine lange Reaktionszeit hergestellt wurden (Abb. A.18).

Die Ergebnisse zur pancreatischen Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten zeigen, dass die Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat durch *Maillard*-Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit tendenziell abnimmt. Besonders Hydrolysate aus Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten, die durch *Maillard*-Reaktion über eine lange Reaktionszeit hergestellt wurden, unterscheiden sich von Hydrolysaten aus unbehandeltem Natriumcaseinat durch einen prozentual höheren Gehalt an Protein  $>2 \times 10^4$  g/mol und durch einen insgesamt geringeren Anstieg im Gehalt von löslichem Aminostickstoff pro mg Milcheiweiß während der Inkubation mit Pancreatin.

Es ist wahrscheinlich, dass eine geringere in-vitro Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten im Vergleich zu unbehandeltem Natriumcaseinat auf den hohen Grad der Polymerisierung von Natriumcaseinat zurückzuführen ist, der nach Tabelle 4.30 durch *Maillard*-Reaktion erreicht wurde. Oliver et al. (2006a) beschrieben die Struktur von Natriumcaseinat/Fructose-*Maillard*-Produkten und von Natriumcaseinat/Inulin-*Maillard*-Produkten als ein kompaktes, „engmaschiges Netzwerk“. Die enzymatische Spaltung von Peptidbindungen wird vermutlich sterisch behindert.

Ergebnisse zur Untersuchung der pancreatischen in-vitro Proteolysierbarkeit von *Maillard*-Produkten aus Molkenproteinisolat sind in Tabelle 4.31, Abbildung 4.41 und Abbildung A.19 angegeben.

Tabelle 4.31 zeigt einen Überblick über die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten sowie den daraus hergestellten pancreatischen Hydrolysaten. Nach Tabelle 4.31 unterscheidet sich die Molmassenverteilung von unbehandeltem Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten besonders in Bezug auf Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol. In unbehandeltem Molkenproteinisolat werden 13,2% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und 0,9% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol nachgewiesen, in Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten bis zu 51,5% Proteinoligomere von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und bis zu 27,0% Proteinpolymere  $>2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 4.31 [A], Tab. 4.31 [B]).

Hydrolysate aus unbehandeltem Molkenproteinisolat und aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten unterscheiden sich besonders im prozentualen Gehalt an Proteinmolekülen  $<2 \times 10^4$  g/mol. In Hydrolysaten aus unbehandeltem Molkenproteinisolat werden 80,3% Proteinmoleküle von  $1 \times 10^4$  -  $2 \times 10^4$  g/mol und 19,3% Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol nachgewiesen, in Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten 41,7% -

73,4% Proteinmoleküle von  $1 \times 10^4$  -  $2 \times 10^4$  g/mol und 26,3% - 55,1% Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol (Tab. 4.31 [C], Tab. 4.31 [D]).

Die Ergebnisse zur Molmassenverteilung zeigen, dass unbehandeltes Molkenproteinisolat weniger Proteinoligomere und Proteinpolymere enthält als Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkte, dass aber Hydrolysate aus unbehandeltem Molkenproteinisolat weniger Proteinmoleküle  $<1 \times 10^4$  g/mol enthalten als Hydrolysate aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten.

**Tab. 4.31.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Molkenproteinisolat, von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat, von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten und von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten

		Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen			
		Molmassenfractionen [g/mol]			
		$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$	$<1 \times 10^4$
<b>[A]</b>	MPI	0,9	13,2	82,1	3,8
	MPI + G [1 h] <sup>2)</sup>	3,8	21,6	69,8	4,8
	MPI + L [24 h] <sup>2)</sup>	4,5	20,8	70,2	4,5
	MPI + P [5 h] <sup>2)</sup>	17,6	34,1	45,9	2,4
<b>[B]</b>	MPI	0,9	13,2	82,1	3,8
	MPI + G [4 h] <sup>2)</sup>	10,6	49,1	36,3	4,0
	MPI + L [96 h] <sup>2)</sup>	18,7	51,5	26,5	3,3
	MPI + P [24 h] <sup>2)</sup>	27,0	49,7	21,3	2,0
	MPI + D40 [240 h] <sup>2)</sup>	2,3	20,9	74,7	2,1
<b>[C]</b>	MPI <sup>3)</sup>	0,1	0,3	80,3	19,3
	MPI + G [1 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	0,2	73,4	26,3
	MPI + L [24 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	0,1	63,9	35,9
	MPI + P [5 h] <sup>2), 3)</sup>	0,0	0,3	51,0	48,7
<b>[D]</b>	MPI <sup>3)</sup>	0,1	0,3	80,3	19,3
	MPI + G [4 h] <sup>2), 3)</sup>	0,0	0,0	58,7	41,3
	MPI + L [96 h] <sup>2), 3)</sup>	0,0	0,1	44,8	55,1
	MPI + P [24 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	4,3	41,7	53,9
	MPI + D40 [240 h] <sup>2), 3)</sup>	0,1	0,5	54,8	44,6

**[A]** = MPI und MPI/Saccharid-*Maillard*-Produkte [*Maillard*-Reaktion über kurze Reaktionszeit]

**[B]** = MPI und MPI/Saccharid-*Maillard*-Produkte [*Maillard*-Reaktion über lange Reaktionszeit]

**[C]** = Hydrolysate von MPI und von MPI/Saccharid-*Maillard*-Produkten [*Maillard*-Reaktion über kurze Reaktionszeit]

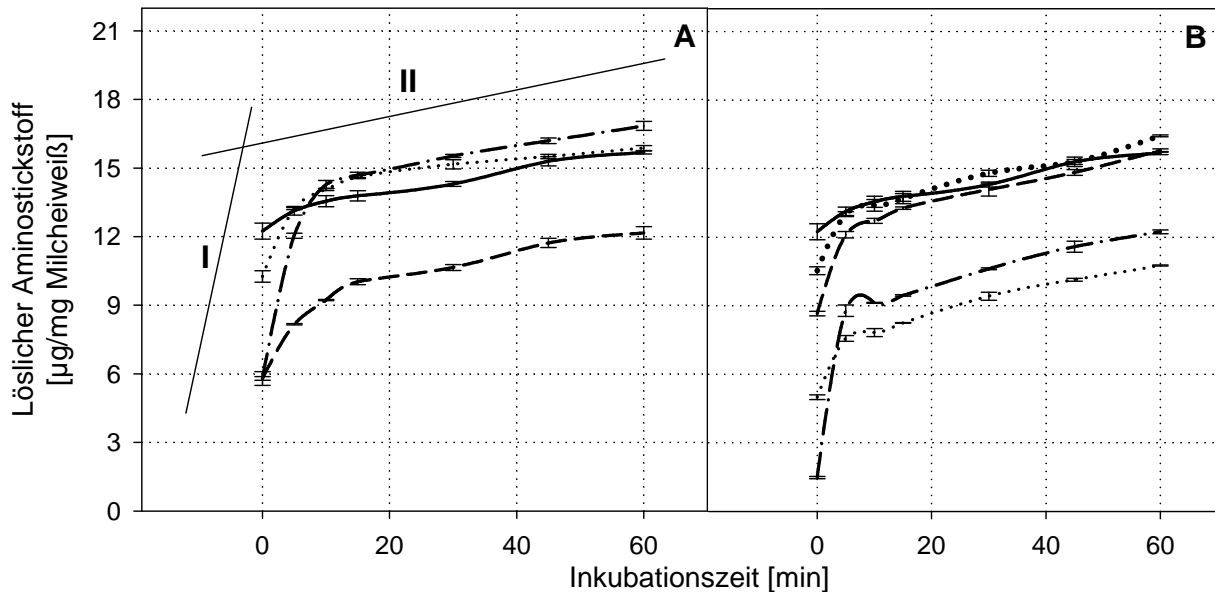
**[D]** = Hydrolysate von MPI und von MPI/Saccharid-*Maillard*-Produkten [*Maillard*-Reaktion über lange Reaktionszeit]

MPI = Molkenproteinisolat, G = Glucose, L = Lactose, P = Pektin, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 15 min, 37°C, pH 7,8



**Abb. 4.41.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Hydrolysaten<sup>1)</sup> aus Molkenproteinisolat und in Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten<sup>2)</sup>

Molkenproteinisolat (—), Molkenproteinisolat/Glucose-*Maillard*-Produkt [1 h (A) oder 4 h (B)] (···), Molkenproteinisolat/Lactose-*Maillard*-Produkt [24 h (A) oder 96 h (B)] (---), Molkenproteinisolat/Pektin-*Maillard*-Produkt [5 h (A) oder 24 h (B)] (----), Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkt [240 h (B)] (●●●)

**A** = *Maillard*-Reaktion über kurze Erhitzungszeit, **B** = *Maillard*-Reaktion über lange Erhitzungszeit; **I** = Reaktionskinetik I, **II** = Reaktionskinetik II; Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Inkubation von Protein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

Abbildung 4.41 stellt Veränderungen im Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat und in Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit Pancreatin dar. Abbildung 4.41 zeigt, dass der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat und in Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten durch Inkubation mit Pancreatin in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ansteigt. Der stärkste Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff wurde innerhalb der ersten ~10 min der Inkubation von Molkenproteinisolat mit Pancreatin ermittelt (Abb. 4.41, Reaktionskinetik I), ein weniger starker Anstieg innerhalb einer Inkubationszeit von 10 min - 60 min mit Pancreatin (Abb. 4.41, Reaktionskinetik II). Während sich der Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Reaktionskinetik II zwischen Molkenproteinisolat und Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten nicht wesentlich unterscheidet, ist ein stärkerer Anstieg im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch Reaktionskinetik I für Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkte im Vergleich zu Molkenproteinisolat dargestellt.

Vergleicht man die absoluten Veränderungen im Gehalt an löslichem Aminostickstoff durch pancreatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat, steigt der Gehalt an löslichem Aminostickstoff in Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten insgesamt stärker an als in unbehandeltem Molkenproteinisolat (Abb. 4.41A, Abb. A.41B).

Für den Verbrauch an Natriumhydroxid, um den pH-Wert während der Inkubation mit Pancreatin konstant zu halten, wurde ermittelt, dass zur Hydrolyse von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten mehr Natriumhydroxid verbraucht wurde als zur Hydrolyse von unbehandeltem Molkenproteinisolat (Abb. A.19). Nach Abbildung A.19 wurden zur Hydrolyse von unbehandeltem Molkenproteinisolat insgesamt 0,14  $\mu\text{mol}$  Natriumhydroxid/mg Milcheiweiß verbraucht, zur Hydrolyse von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten bis zu 0,21  $\mu\text{mol}$  Natriumhydroxid/mg Milcheiweiß.

Die Ergebnisse zur pancreatischen in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten zeigen, dass die Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion tendenziell ansteigt. Hydrolysate aus Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten unterscheiden sich von Hydrolysaten aus unbehandeltem Molkenproteinisolat durch einen prozentual höheren Gehalt an Protein  $<1 \times 10^4$  g/mol und durch einen insgesamt stärkeren Anstieg im Gehalt von löslichem Aminostickstoff pro mg Milcheiweiß während der Inkubation mit Pancreatin.

Es ist wahrscheinlich, dass sich die in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion als Folge einer partiellen Entfaltung (Miller und Gerard 2005) der globulären Tertiärstruktur von Molkenproteinmolekülen verbessert. Die Entfaltung von Molkenproteinmolekülen wird auf den Wärmeeintrag und die Feuchte der *Maillard*-Reaktion zurückgeführt (Morgan et al. 1999a), aber auch auf die Bindung von Saccharidmolekülen, die die Molekülstruktur von Molkenproteinmolekülen sterisch entfalten (Nacka et al. 1998, Chevalier et al. 2002, Thomas et al. 2004b). Besonders für die Bindung großer Saccharidmoleküle wie Dextran an die funktionellen Gruppen von  $\beta$ -Lactoglobulinmolekülen berichteten Wooster und Augustin (2007) und Jiménez-Castaño et al. (2007) eine Entfaltung der Tertiärstruktur von  $\beta$ -Lactoglobulin. Als Folge der Proteinentfaltung erhöht sich die Anzahl von Peptidbindungen, die potenziell durch proteolytisch wirkende Enzyme erreicht werden können.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat durch *Maillard*-Reaktion ansteigt, wohingegen die Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der *Maillard*-Reaktion vermindert wird.

In der Literatur wurden verschiedene Ergebnisse zur Proteolysierbarkeit von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten diskutiert.

Auf der einen Seite wurde berichtet, dass die in-vitro Proteolysierbarkeit nach einer Glycosylierung von Aminosäurenresten durch *Maillard*-Reaktion (Miller und Gerard 2005, Thomas et al. 2004b), aber auch nach einer chemischen Alkylierung mit Sacchariden (Lee et al. 1979) vermindert ist. Nach Nacka et al. (1998) und Chevalier et al. (2001b) hemmt eine Glycosylierung von Molkenprotein durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose oder mit Lactose die Hydrolysierbarkeit von Molkenprotein durch Trypsin. Es wurde diskutiert, dass Trypsin die Peptidbindungen, die C-terminal auf glycosylierte Lysylreste und Argininreste folgen, weniger

gut hydrolysieren kann. Nach Lee et al. (1979) nimmt durch Glycosylierung von Lysylresten in Casein besonders die chymotryptische in-vitro Proteolysierbarkeit von Casein ab und auch die biologische Wertigkeit von Casein in vivo.

Auf der anderen Seite wurde nachgewiesen, dass die Proteolysierbarkeit von Molkenprotein durch Pepsin als Folge einer *Maillard*-Reaktion von Molkenprotein mit Glucose oder mit Lactose nicht beeinträchtigt wird (Chevalier et al. 2001b) beziehungsweise verbessert wird (Chevalier et al. 2002). Nach Bouhallab et al. (1999) können  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkte sehr gut durch Trypsin hydrolysiert werden. Nach Morgan et al. (1999a) steigt die Proteolysierbarkeit von  $\beta$ -Lactoglobulin durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose an, wenn sie in wässriger Lösung abläuft.

#### **Weitere tropho-funktionelle Eigenschaften von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten**

Über die in-vitro Proteolysierbarkeit und die antioxidativen Eigenschaften (Kap. 4.2.7.) von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten hinaus werden in der Literatur weitere tropho-funktionell relevante Aspekte von *Maillard*-Produkten berichtet.

Rufián-Henares und Morales (2007) synthetisierten durch *Maillard*-Reaktion von Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin mit Glucose Melanoidine, für die antimikrobielle, antioxidative und antihypertensive Eigenschaften nachgewiesen wurden. Antimikrobielle Eigenschaften wurden auch berichtet für  $\beta$ -Lactoglobulin/Glucose-*Maillard*-Produkte (Chevalier et al. 2001c), für  $\beta$ -Lactoglobulin/Lactose-*Maillard*-Produkte (Chevalier et al. 2001c), für  $\beta$ -Lactoglobulin/Chitosan-*Maillard*-Produkte (Miralles et al. 2007), für Polylysin/Dextran-*Maillard*-Produkte (Ho et al. 2000) und für Lysozym/Dextran-*Maillard*-Produkte (Scamann et al. 2006).

Geringe antigene Eigenschaften wurden diskutiert für  $\beta$ -Lactoglobulin/Chitosan-*Maillard*-Produkte (Hattori et al. 2000), für Sojaprotein/Fructooligosaccharid-*Maillard*-Produkte (van de Lagemaat et al. 2007) und für *Maillard*-Produkte von allergen wirkenden Proteinen der Kirsche (Gruber et al. 2004).



#### 4.2.9. Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte

Es wurde untersucht, wie sich die Eigenschaften von Joghurt verändern, wenn die Trockenmasse von Joghurtmilch durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte erhöht wird. Eingesetzt wurden *Maillard*-Produkte aus Magermilchpulver, aus Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischungen und aus Natriumcaseinat/Pektin-Pulvermischungen. Die chemisch-analytischen, die chemisch-physikalischen und die sensorischen Eigenschaften von Joghurt aus Magermilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte werden den Eigenschaften von Joghurt mit Trockenmasseerhöhung durch unerhitzte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen gegenübergestellt.

##### 4.2.9.1. Chemisch-analytische Eigenschaften

Die Molmassenverteilung von Protein in Joghurtmilch und in Joghurt wurde durch SDS-PAGE untersucht und ist in Abbildung 4.42 am Beispiel von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Magermilchpulver dargestellt.

Abbildung 4.42 zeigt in den Elektropherogrammen von Joghurt (Abb. 4.42, Elektropherogramm 3) und von Joghurtmilch (Abb. 4.42, Elektropherogramme 1 und 2) mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandeltes Magermilchpulver im Wesentlichen die Proteinbanden der einzelnen Monomerenfraktionen (Abb. 4.42, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“).

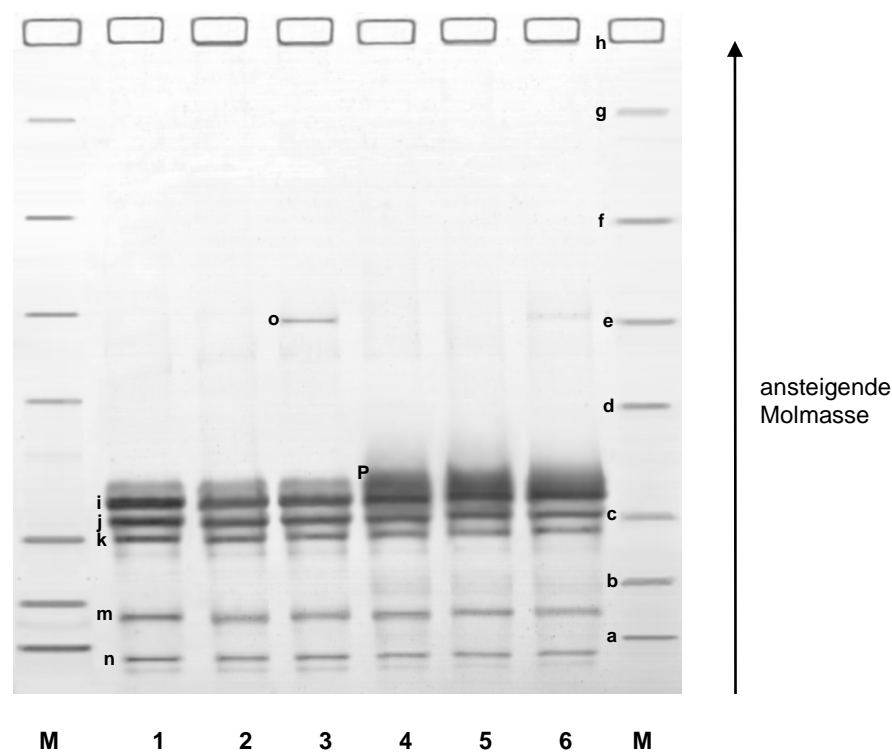
In den Elektropherogrammen von Joghurt (Abb. 4.42, Elektropherogramm 6) und von Joghurtmilch (Abb. 4.42, Elektropherogramme 4 und 5) mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte aus Magermilchpulver können neben den Proteinbanden der Monomerenfraktionen (Abb. 4.42, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) auch Proteinmoleküle mit tendenziell höherer Molmasse oberhalb der Banden der Proteinmonomere nachgewiesen werden (Abb. 4.42, „P“).

In Kapitel 4.2.3. wurde dargestellt, dass durch *Maillard*-Reaktion von Magermilchpulver [4 h] unter den gegebenen Bedingungen 56% der Proteinmonomere modifiziert werden (Abb. 4.27). Die im Wesentlichen oligomeren *Maillard*-Produkte in Magermilchpulver (Kap. 4.2.3) konnten in den Elektropherogrammen von Joghurt und von Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte aus Magermilchpulver als Moleküle mit höherer Molmasse (Abb. 4.42, „P“) oberhalb der Banden der Proteinmonomere (Abb. 4.42, Banden „i“, „j“, „k“, „m“, „n“) wiedergefunden werden.

Durch *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat/Pektin-Pulvermischungen konnten unter den gegebenen Bedingungen 29% der Caseinmonomere [1 h] beziehungsweise 47% der Caseinmonomere [4 h] (Abb. 4.29) modifiziert werden, durch *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischungen 5% der Proteinmonomere [4 h] beziehungsweise 98% der Proteinmonomere [96 h] (Abb. 4.27). In Joghurt und in Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Lactose- oder durch Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte konnten die oligomeren bis polymeren Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte wiedergefunden werden (ohne Abb./Tab.). Ein Vergleich der Molmassenverteilung von Protein in Joghurt und in Joghurtmilch ergab, dass Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkte in Joghurtmilch durch Milchsäurefermentation quantitativ und qualitativ nicht beeinflusst werden (ohne Abb./Tab.). Auch Abbildung 4.42 zeigt, dass *Maillard*-Produkte von

Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, die in Joghurtmilch (Abb. 4.42, Elektropherogramme 4 und 5) eingesetzt werden, durch Milchsäurefermentation qualitativ im Wesentlichen nicht verändert werden (Abb. 4.42, Elektropherogramm 6).

Proteinbande „o“ (Abb. 4.42, Elektropherogramme 3 und 6) wurde in allen Joghurtproben aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Protein/Saccharid-Mischungen oder durch Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkte nachgewiesen. Durch elektrophoretische Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass Proteinfraction „o“ aus der Starterkultur stammt (ohne Abb./Tab.).



**Abb. 4.42.** Elektropherogramme von Joghurtmilch und von Joghurt mit Trockenmasseerhöhung<sup>1)</sup> durch Magermilchpulver oder durch *Maillard*-Produkte<sup>2)</sup> aus Magermilchpulver

1 = JM + MP; 2 = JM + MP, erhitzt [90°C, 5 min]; 3 = J-MMP; 4 = JM + MP<sup>2)</sup>; 5 = JM + MP<sup>2)</sup>, erhitzt [90°C, 5 min]; 6 = J-MMP<sup>2)</sup>; M = Standard

JM = Joghurtmilch, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, J-MMP = Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Magermilchpulver; a-g = Standardsubstanzen (s. Kap. 3.2.3.2.), h = Trenngrenze, i =  $\alpha$ <sub>S</sub>-Casein, j =  $\beta$ -Casein, k =  $\kappa$ -Casein, m =  $\beta$ -Lactoglobulin, n =  $\alpha$ -Lactalbumin, o = Proteinfraction o, P = *Maillard*-Produkte

<sup>1)</sup> Trockenmasseerhöhung von Joghurtmilch (w/w = 5%) durch Magermilchpulver

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 4 h

#### 4.2.9.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Joghurt wurden über eine Lagerzeit von 4 Wochen untersucht und sind in Tabelle 4.32 für Joghurt aus Joghurtmilch mit Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkten dargestellt. In den Anlagen (Tab. A.15, Tab. A.16) sind die Ergebnisse aufgeführt, die für Joghurt aus Joghurtmilch mit *Maillard*-Produkten aus Magermilchpulver beziehungsweise mit *Maillard*-Produkten aus Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen ermittelt wurden.

#### Fermentationszeit

Die Fermentationszeit von Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte ist um bis zu 30 min kürzer als die Fermentationszeit von Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen (Tab. 4.32, Tab. A.15, Tab. A.16).

Der Einfluss von *Maillard*-Produkten auf die Fermentationszeit von Joghurtmilch wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da die *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilcheiweiß mit Lactose jedoch auch während der Erhitzung von Milch auftritt (Calligaris et al. 2004), können die Ergebnisse in den Tabellen 4.32, A.15 und A.16 möglicherweise mit den Ergebnissen verglichen werden, die Basic et al. (2005) für eine Erhitzung von Joghurtmilch bei Temperaturen von 65°C, 75°C, 85°C oder 100°C ermittelten. Basic et al. (2005) wiesen nach, dass die Fermentationszeit von Joghurtmilch in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur abnimmt.

#### Azidität

Für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurde während der gesamten Lagerzeit eine geringere Azidität ermittelt als für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen (Tab. 4.32, Tab. A.15, Tab. A.16). In Übereinstimmung mit einer geringeren Azidität wurde ein tendenziell niedrigerer Grad des Abbaus von Lactose in Joghurt mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte während der Lagerzeit beobachtet (Tab. 4.32, Tab. A.15, Tab. A.16).

Der Einfluss von *Maillard*-Produkten auf die Azidität von Joghurt wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. *Maillard*-Produkte aus Gesamtmilcheiweiß und Lactose entstehen jedoch auch während der Erhitzung von Milch (Calligaris et al. 2004). Kurultay et al. (2006) berichteten für Joghurt aus Joghurtmilch, die vor der Milchsäurefermentation bei 85°C oder bei 95°C erhitzt wurde, dass die Gesamtkeimzahl von Milchsäurebakterien in Joghurt nicht beeinflusst wird, dass aber die Keimzahl an Lactobazillen in 95°C-erhitzter Milch im Verhältnis stärker anwächst als die Keimzahl an säurebildenden Streptokokken. Basic et al. (2005) berichteten, dass Joghurt aus 100°C-erhitzter Milch weniger sauer ist als Joghurt aus 85°C-erhitzter Milch.

**Tab. 4.32.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Pektin-Pulvermischungen

		Chemisch-physikalische Eigenschaften		
		J-NCP	J-NCP <sup>1)</sup>	J-NCP <sup>2)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		163,0	160,0	155,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	51,9 ± 0,2	50,6 ± 0,3	51,2 ± 0,2
	8. Tag	53,9 ± 0,3	53,0 ± 0,2	54,0 ± 0,1
	29. Tag	56,1 ± 0,3	54,8 ± 0,3	55,5 ± 0,3
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,28	4,30	4,29
	8. Tag	4,14	4,15	4,15
	29. Tag	4,11	4,13	4,13
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,0	3,2 ± 0,1
	29. Tag	2,8 ± 0,0	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	10,6 ± 0,1	13,0 ± 0,2	12,1 ± 0,1
	29. Tag	9,3 ± 0,2	11,9 ± 0,1	11,6 ± 0,2
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	133,1 ± 2,3	106,8 ± 4,1	91,9 ± 4,4
	8. Tag	146,6 ± 1,6	123,1 ± 1,1	116,9 ± 0,1
	29. Tag	154,9 ± 2,7	134,0 ± 2,3	115,1 ± 4,2
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	16. Tag	33,8 ± 0,3	24,3 ± 0,4	20,1 ± 0,3
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	20,6 ± 0,2	13,2 ± 0,2	8,6 ± 0,3
	8. Tag	19,5 ± 0,3	12,7 ± 0,3	9,5 ± 0,2
	29. Tag	19,1 ± 0,4	12,0 ± 0,8	10,2 ± 0,5

J-NCP = Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung (w/w = 3%) durch Natriumcaseinat/Pektin-Pulvermischung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 1 h

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 4 h

### Acetaldehyd

In Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurde während der gesamten Lagerzeit ein höherer Gehalt an Acetaldehyd ermittelt als in Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen (Tab. 4.32, Tab. A.15, Tab. A.16).

*Maillard*-Produkte, die während der Erhitzung von Joghurtmilch entstehen (Calligaris et al. 2004), könnten möglicherweise mit folgenden Ergebnissen von Kurultay et al. (2006) zu Joghurt aus erhitzter Milch in Verbindung gebracht werden. Kurultay et al. (2006) berichteten, dass in Joghurt aus 95°C-erhitzter Joghurtmilch höhere Gehalte an Acetaldehyd nachgewiesen werden als in Joghurt aus 85°C-erhitzter Joghurtmilch.

### Viskosität und Gelstärke

Für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte wurde eine bis zu 31% geringere Gelstärke und eine bis zu 40% geringere Viskosität festgestellt als für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Natriumcaseinat/Pektin-Mischungen (Tab. 4.32). Für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte aus Magermilchpulver wurde eine um bis zu 50% geringere Gelstärke und um 27% geringere Viskosität ermittelt als für Joghurt mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandeltes Magermilchpulver (Tab. A.15).

In Kapitel 4.2.7. wurde diskutiert, dass die hydrophoben Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion teilweise vermindert werden. Da hydrophobe Wechselwirkungen wesentlich an der Ausbildung und der Stabilisierung von Joghurtgelen beteiligt sind, bildet Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte vermutlich schwächere Gele aus. Auch Dannenberg und Kessler (1988b) berichteten über einen negativen Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität von Milcheiweiß und der Gelstärke von Joghurt als Folge einer thermischen Behandlung von Milcheiweiß.

In Kapitel 4.2.7. wurde zusätzlich diskutiert, dass die Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkten und von *Maillard*-Produkten aus Magermilchpulver im isoelektrischen Bereich von unbehandeltem Protein ansteigt. Als Folge bildet Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat oder aus Gesamtmilchprotein weniger feste Joghurtgele aus, die als Säuregele im isoelektrischen Bereich von Caseinmolekülen hergestellt werden.

Da die *Maillard*-Reaktion auch während der Erhitzung (Calligaris et al. 2004) und der Lagerung (Lauber et al. 2001) von Milch auftritt, können möglicherweise auch folgende Ergebnisse von Krasaekoopt et al. (2004) und Sondini et al. (2006) im Zusammenhang mit der geringeren Gelstärke von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte (Tab. 4.32, Tab. A.15) diskutiert werden. Nach Krasaekoopt et al. (2004) bildet UHT-Milch weniger starke und weniger viskose Joghurtgele aus als pasteurisierte Milch (Krasaekoopt et al. 2004). Sondini et al. (2006) erhöhten die Trockenmasse von Joghurtmilch durch Molkenprotein aus erhitzter Süßmolke. Mit der Erhitzungstemperatur von Molke verminderten sich die elastischen Eigenschaften von Joghurtgelen aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Molkenprotein.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde nur für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkte eine tendenziell höhere Viskosität und Gelstärke nachgewiesen als für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen (Tab. A.16). Lauber et al. (2001) berichteten, dass die Gelstärke von Joghurt aus UHT-Milch mit der Lagerzeit von UHT-Milch vor der Joghurtherstellung ansteigt. Die Autoren diskutierten, dass während der Lagerzeit von UHT-Milch Caseinoligomere entstehen, die das Joghurtgel aus UHT-Milch stabilisieren (Lauber et al. 2001).

### **Molkenlässigkeit**

Im Vergleich zu Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen wurde für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte eine um bis zu 58% geringere Molkenlässigkeit ermittelt (Tab. 4.32, Tab. A.15, Tab. A.16).

In Kapitel 4.2.7. wurde diskutiert, dass die hydrophilen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden teilweise ansteigen. Es ist daher wahrscheinlich, dass *Maillard*-Produkte aus Milchweiß durch ihre hydrophilen Eigenschaften mehr Molke binden als unbehandeltes Milcheiweiß.

Es ist wahrscheinlich, dass *Maillard*-Produkte, die durch eine Erhitzung von Milcheiweiß (Calligaris et al. 2004) entstehen, zum Teil mit folgenden Ergebnissen von Dannenberg und Kessler (1988a) und Sondini et al. (2006) in Verbindung gebracht werden können. Dannenberg und Kessler (1988a) beschrieben, dass Joghurt weniger molkenlässig ist, wenn die Tertiärstruktur von  $\beta$ -Lactoglobulin in Joghurtmilch thermisch denaturiert wird. Sondini et al. (2006) erhöhten die Trockenmasse von Joghurtmilch durch Molkenprotein aus erhitzter Süßmolke. Mit dem Grad der thermischen Denaturierung von Molkenprotein erhöhte sich nach Angaben der Autoren die Molkenlässigkeit von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Molkenprotein.

#### **4.2.9.3. Sensorische Eigenschaften**

Die sensorischen Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen und durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurden durch ein Taste-Panel untersucht (s. Kap. 3.2.7.8.). Das Ergebnis der sensorischen Bewertung von Aussehen, Konsistenz, Geschmack und Geruch ist in den Abbildungen 4.43 und A.20 dargestellt.

### **Konsistenz**

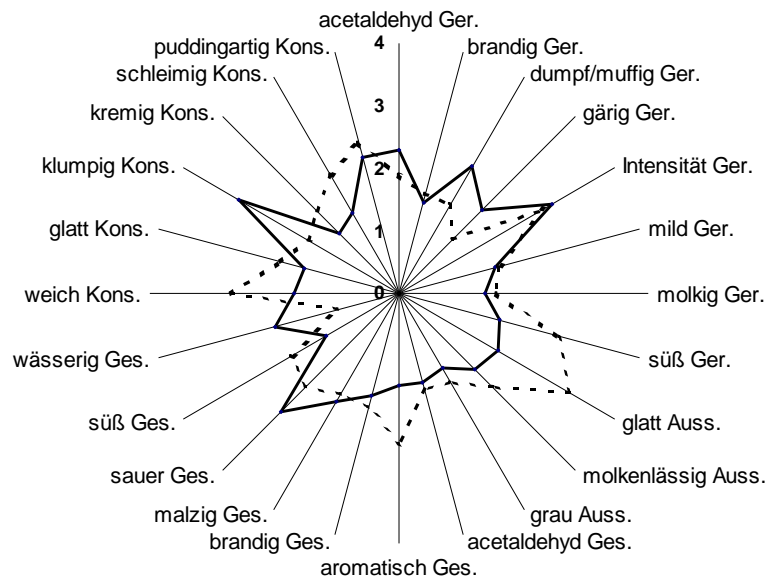
Aus den Abbildungen 4.43 und A.20 geht hervor, dass durch eine *Maillard*-Reaktion der eingesetzten Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen die Merkmalseigenschaften „schleimig“, „puddingartig“, „glatt“ und „kremig“ von Joghurt stärker ausgeprägt werden. Joghurtgele aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte und durch *Maillard*-Produkte aus Magermilchpulver wiesen nach eigenen Beobachtungen weniger die typische Konsistenz von Joghurt auf als die Konsistenz eines Stärkegels.

### **Geruch und Geschmack**

Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte aus Magermilch oder durch *Maillard*-Produkte aus Natriumcaseinat/Pektin-Mischungen wurden in Bezug auf Geruch und Geschmack als „süß“, „mild“, „aromatisch“ und als weniger „sauer“ beschrieben (Abb. 4.43, Abb. A.20) als Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen.

## Aussehen

Das Aussehen von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch *Maillard*-Produkte wurde tendenziell als „grau“ und als „glatt“ beschrieben (Abb. 4.43, Abb. A.20).



**Abb. 4.43.** Sensorische Bewertung<sup>1)</sup> von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung<sup>2)</sup> durch unbehandeltes Magermilchpulver (—) oder durch *Maillard*-Produkte<sup>3)</sup> aus Magermilchpulver (•••)

Auss. = Aussehen, Ger. = Geruch, Ges. = Geschmack, Kons. = Konsistenz

<sup>1)</sup> sensorische Bewertung nach DIN 10967-1

<sup>2)</sup> Trockenmasseerhöhung (w/w = 5%) von Joghurtmilch durch Magermilchpulver

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 4 h

## 5. Abschließende Bewertung

Proteine sind die Lebensmittelinhaltsstoffe, die die sensorischen, die techno-funktionellen und die tropho-funktionellen Eigenschaften von Lebensmitteln wesentlich bestimmen (Kinsella 1989). Um die Eigenschaften von Lebensmitteln den Anforderungen anzupassen, die die Industrie, der Handel und die Verbraucher an Lebensmittel stellen, ist es besonders interessant, die Eigenschaften von Proteinen zu modifizieren. In der Literatur werden chemische, physikalische, gentechnische und enzymatische Verfahren zur Modifizierung der Eigenschaften von Eiweiß beschrieben (Lorenzen 2000b, Singh 1991, Kinsella 1989, Matheis und Whitaker 1987). Unter den enzymatischen Verfahren ist in den letzten Jahren eine Quervernetzung von Protein durch das Enzym Transglutaminase intensiv untersucht und industriell eingesetzt worden (Lorenzen 2007, Yokoyama et al. 2004, Jaros et al. 2006).

Als Alternative zur Modifizierung von Protein durch Transglutaminase wurden bisher wenige Möglichkeiten zur enzymatischen und zur chemisch-physikalischen Quervernetzung von Protein beschrieben (Singh 1991, Færgemand et al. 1998a, Thalmann 2003).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur enzymatischen und zur chemisch-physikalischen Modifizierung von Protein ist bisher nur begrenzt möglich. In Studien wurden unterschiedliche Proteine unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen modifiziert. Reaktionsprodukte mit unterschiedlicher Molmasse, mit unterschiedlicher Struktur und mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften wurden gebildet.

Um erstmals einen direkten Vergleich der Eigenschaften von Milcheiweiß zu ermöglichen, das enzymatisch oder aber chemisch-physikalisch modifiziert wurde, wurde eine experimentelle, wissenschaftliche Übersichtsarbeit über die *Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften* mit folgenden Schwerpunkten durchgeführt:

- (I.) Enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase.
- (II.) Chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, mit Lactose, mit Pektin und mit Dextran.
- (III.) Charakterisierung der techno-funktionellen und der tropho-funktionellen Eigenschaften von enzymatisch modifiziertem beziehungsweise von chemisch-physikalisch modifiziertem Milcheiweiß.

Die wesentlichen Ergebnisse, die für eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß (durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase) und für eine chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß (durch *Maillard*-Reaktion) ermittelt wurden, sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Um die Ergebnisse bewerten zu können, sind auch die Ergebnisse aufgeführt, die für eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Transglutaminase (Abb. A.21) und für eine chemisch-physikalische Behandlung von Protein durch Erhitzung (Abb. A.22) ermittelt wurden. Die Ergebnisse geben erstmals - qualitativ und quantitativ - einen Überblick über die verschiedenen Verfahren zur Modifizierung von Milcheiweiß.



**Tab. 5.1.** Übersicht über die enzymatische und die chemisch-physikalische Modifizierung von Milcheiweiß [A] und die techno-funktionellen [B] und die tropho-funktionellen [C] Eigenschaften der Reaktionsprodukte

			Modifizierung von Milcheiweiß									
			enzymatisch <sup>1)</sup>				chemisch-physikalisch <sup>2)</sup>					
			TG	LPO	PPO	GOX	E	G	L	P	D	
<b>[A]</b>	<b>Modifizierungsgrad [%]</b> <sup>3)</sup>	Natriumcaseinat	98,2	39,8	90,5	70,3	6,1	62,3	98,1	51,3	87,3	
		Molkenproteinisolat	50,6	45,9	51,3	2,0	6,9	33,1	64,6	80,2	8,1	
		Gesamtmilchprotein	96,3	57,9	92,0	86,1		51,0	56,3	98,1	96,1	
<b>[A]</b>	<b>Reaktionsprodukte</b>	Natriumcaseinat	P	P	P	P	O	P	P	P	P	
		Molkenproteinisolat	O/P	O	O	-	O	O/P	O/P	P	O	
		Gesamtmilchprotein	P	O/P	P	P		O	O	P	P	
<b>[B]</b>	<b>Hitzestabilität</b>	Natriumcaseinat	0	-	-	-	0	-	-	-	0	
		Molkenproteinisolat	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
		Gesamtmilchprotein	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<b>[B]</b>	<b>Oberflächenhydrophobizität</b>	Natriumcaseinat	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
		Molkenproteinisolat	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
		Gesamtmilchprotein	+	+	+	+		+	+	-	-	
<b>[B]</b>	<b>Oberflächenspannung</b>	Natriumcaseinat	-	-	0	-	-	-	-	+	+	
		Molkenproteinisolat	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
		Gesamtmilchprotein	-	-	-	-		+	+	+	+	
<b>[B]</b>	<b>Overrun</b>	Natriumcaseinat	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
		Molkenproteinisolat	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
		Gesamtmilchprotein	-	+	-	-		-	+	+	+	
<b>[B]</b>	<b>Schaumstabilität</b>	Natriumcaseinat	-	+	-	-	+	+	+	-	-	
		Molkenproteinisolat	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
		Gesamtmilchprotein	-	+	+	+		+	+	+	+	
<b>[B]</b>	<b>Emulgieraktivität</b>	Natriumcaseinat	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
		Molkenproteinisolat	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
		Gesamtmilchprotein	-	-	-	-		+	-	+	+	
<b>[B]</b>	<b>Emulsionsstabilität</b>	Natriumcaseinat	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
		Molkenproteinisolat	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
		Gesamtmilchprotein	-	+	-	0		+	+	+	-	
<b>[B]</b>	<b>Viskosität</b>	Natriumcaseinat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Molkenproteinisolat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Gesamtmilchprotein	-	0	+	+		+	+	+	+	
<b>[B]</b>	<b>Antioxidative Eigenschaften</b>	Natriumcaseinat	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
		Molkenproteinisolat	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Gesamtmilchprotein	0	+	+	+		+	+	+	+	
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Isoleucin</b>	Natriumcaseinat	0	0	-	0	0	0	0	0	0
			Molkenproteinisolat	0	0	-	0	0	0	0	0	0
			Gesamtmilchprotein	0	0	-	0	0	0	0	0	0
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Leucin</b>	Natriumcaseinat	0	0	-	-	0	-	-	-	-
			Molkenproteinisolat	0	-	-	-	0	-	-	-	-
			Gesamtmilchprotein	0	-	-	-		-	-	-	-
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Lysin</b>	Natriumcaseinat	-	0	0	-	-	-	-	-	-
			Molkenproteinisolat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Gesamtmilchprotein	-	-	-	-		-	-	-	-
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Methionin</b>	Natriumcaseinat	0	-	-	-	-	-	0	0	0
			Molkenproteinisolat	0	-	0	-	-	-	-	-	-
			Gesamtmilchprotein	0	-	0	0		0	0	-	-
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Phenylalanin</b>	Natriumcaseinat	0	0	0	0	0	-	-	0	0
			Molkenproteinisolat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Gesamtmilchprotein	0	0	0	0		0	-	-	0
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Threonin</b>	Natriumcaseinat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Molkenproteinisolat	0	0	-	0	0	0	0	0	0
			Gesamtmilchprotein	0	0	0	0		0	0	0	0
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Tryptophan</b>	Natriumcaseinat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Molkenproteinisolat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Gesamtmilchprotein	0	0	0	0		0	0	0	0
<b>[C]</b>	<b>Gehalt an essentiellen Aminosäuren</b>	<b>Valin</b>	Natriumcaseinat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Molkenproteinisolat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Gesamtmilchprotein	0	0	0	0		0	0	0	0
<b>[C]</b>	<b>in-vitro Proteolysierbarkeit</b>	Natriumcaseinat	-	0	-	+	-	-	-	-	-	
		Molkenproteinisolat	-	+	-	+	+	+	+	+	+	

0 = keine Veränderung (bei >50% der Proben), - = Abnahme (bei >50% der Proben), + = Zunahme (bei >50% der Proben);  
O = Proteinoligomere ( $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol), P = Proteinpolymere ( $>2 \times 10^5$  g/mol)

<sup>1)</sup> Milcheiweiß, enzymatisch modifiziert durch Transglutaminase (TG) (s. Kap. 3.1.), Lactoperoxidase (LPO) (s. Kap. 3.2.1.3.), Laccase (PPO) (s. Kap. 3.2.1.3.) oder Glucoseoxidase (GOX) (s. Kap. 3.2.1.3.)

<sup>2)</sup> Milcheiweiß, chemisch-physikalisch modifiziert durch Maillard-Reaktion (s. Kap. 3.2.2.2.) mit Glucose (G), Lactose (L), Pektin (P) oder Dextran (D); (E) = Erhitzung von Milcheiweiß ohne Saccharid [70°C, 6.5% r. F., 10 d]

<sup>3)</sup> höchster erreichter Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren in Milcheiweiß; s. Kap. 4.1.4. und Kap. 4.2.6.

Durch eine **enzymatische Modifizierung** von Milcheiweiß wurden Proteinmonomere in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein zu oligomeren bis polymeren Reaktionsprodukten umgesetzt. Proteinmonomere in Natriumcaseinat und in Gesamtmilchprotein wurden durch enzymatische Modifizierung im Wesentlichen zu Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt, Proteinmonomere in Molkenproteinisolat im Wesentlichen zu Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol (Tab. 5.1).

Proteinmonomere in Milcheiweiß wurden durch Inkubation mit Transglutaminase zu 50,6% - 98,2% modifiziert und - in etwa gleich stark - durch Inkubation mit Laccase zu 51,3% - 92,0%. Ein prozentual geringerer Grad der Proteinmodifizierung als durch Inkubation von Protein mit Transglutaminase wurde durch Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase (mit 70,3% - 86,1% modifizierten Proteinmonomeren) und mit Lactoperoxidase (mit 45,9% - 57,9% modifizierten Proteinmonomeren) erreicht. Molkenproteinisolat wurde durch Inkubation mit Glucoseoxidase im Wesentlichen nicht modifiziert (Tab. 5.1).

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Proteinmonomere in Milcheiweiß nicht nur durch Inkubation mit Transglutaminase modifiziert beziehungsweise quervernetzt werden, sondern auch durch Inkubation mit anderen Enzymsystemen (wie Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase), die im industriellen Maßstab in Lebensmittelqualität verfügbar sind. Es entstehen jeweils Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse und modifizierten funktionellen Eigenschaften. Transglutaminasebehandeltes Milcheiweiß zeichnet sich im Wesentlichen durch eine höhere Hitzestabilität, eine verbesserte Stabilisierung disperser Systeme, eine höhere Viskosität von Milcheiweißlösungen und eine höhere Wasserbindung aus als unbehandeltes Milcheiweiß (Lorenzen 2000a, Lorenzen 2007, Flanagan et al. 2003, Tang et al. 2005). Für Milcheiweiß, das durch Lactoperoxidase, durch Laccase oder durch Glucoseoxidase modifiziert wurde, wurden in den eigenen Untersuchungen im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß eine geringere Hitzestabilität, eine höhere Oberflächenhydrophobizität, eine niedrigere Oberflächenspannung und eine höhere Viskosität der wässrigen Lösungen sowie stärkere antioxidative Eigenschaften ermittelt (Tab. 5.1). Für lactoperoxidasebehandeltes Milcheiweiß wurden sehr gute Grenzflächeneigenschaften nachgewiesen. Für laccasebehandeltes Molkenproteinisolat wurden ein höherer Overrun und eine höhere Schaumstabilität ermittelt als für unbehandeltes Molkenproteinisolat. Laccasebehandeltes Gesamtmilchprotein und glucoseoxidasebehandeltes Gesamtmilchprotein bildeten stabilere Proteinschäume aus als unbehandeltes Gesamtmilchprotein (Tab. 5.1).

Obwohl Transglutaminase, Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase gleichermaßen zur Quervernetzung von Milcheiweiß führen, entstehen aufgrund verschiedener Reaktionsmechanismen Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften. Da transglutaminasebehandeltes Milcheiweiß insgesamt unzureichende Grenzflächeneigenschaften aufweist (Flanagan et al. 2003), könnte besonders lactoperoxidasebehandeltes Milcheiweiß (Tab. 5.1) eine technologisch relevante Alternative zu transglutaminasebehandeltem Milcheiweiß darstellen. Auch die antioxidativen Eigenschaften von lactoperoxidase-, von laccase- und von glucoseoxidasebehandeltem Milcheiweiß stellen einen technologisch relevanten Aspekt dar. Es wurde diskutiert (Sun et al. 2006), dass Proteine mit antioxidativen Eigenschaften beispielsweise einen oxidativen Verderb von Lipiden in Emulsionen verzögern können. Relevant sind in diesem Zusammenhang zusätzlich die biokonservierenden Eigenschaften, die für Lactoperoxidase beschrieben werden (Kussendrager und van Hooijdonk 2000).

Interessant ist auch der Aspekt, dass die geringere Substratspezifität von Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase genutzt werden kann, um zum Beispiel durch Peroxidase

Reaktionsprodukte aus Protein und Saccharid herzustellen, die sowohl die funktionellen Eigenschaften von Proteinen und als auch die funktionellen Eigenschaften von Sacchariden aufweisen (Boeriu et al. 2004, Oudgenoeg et al. 2006). Die geringere Spezifität von Lactoperoxidase, Laccase und Glucoseoxidase gegenüber ihren Substratmolekülen kann nach Özer und Atamer (1999) jedoch auch zur Bildung von Fehlparomen und von Off-Flavour in Lebensmitteln führen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch eine enzymatische Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase auch Reaktionsprodukte aus Protein und phenolischen Substanzen synthetisiert werden können. Neben phenolischen Substanzen wie Chlorogensäure (Færgemand et al. 1998a) oder Kaffeesäure (Thalmann 2003) wurde in den vorliegenden Untersuchungen erstmals gezeigt, dass auch Pflanzenextrakte, die verschiedene phenolische Substanzen enthalten und die im industriellen Maßstab in Lebensmittelqualität verfügbar sind, zur Modifizierung von Milcheiweiß durch Laccase eingesetzt werden können.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals gezeigt, dass Milcheiweiß sowohl durch Inkubation mit Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid modifiziert wird, als auch durch Inkubation mit Lactoperoxidase ohne Wasserstoffperoxid. Besonders Wasserstoffperoxid wurde bisher als kritisch beurteilt, da es zur Oxidation von Seitenketten essentieller Aminosäuren (Marin et al. 2005) führt und nach den Grundsätzen der Zusatzstoffverkehrsverordnung nur als Zusatzstoff für technologische Zwecke (wie zur Reinigung und zur Desinfektion) eingesetzt werden darf.

In der Literatur wurde berichtet, dass der Grad der Modifizierung von Milcheiweiß durch Transglutaminase prä-enzymatisch durch eine Erhitzung von Protein (Lorenzen 2007) oder aber durch eine Behandlung von Protein mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (Mautner 2000) erhöht werden kann. In den eigenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Grad der Modifizierung von Proteinmonomeren durch Lactoperoxidase, Laccase oder Glucoseoxidase sowohl durch eine Erhitzung als auch durch eine Behandlung von Protein mit Lebensmittelzusatzstoffen (wie Ascorbinsäure, Cystein oder Cystin) vor der enzymatischen Modifizierung erhöht werden kann.

Kritisch zu beurteilen ist die Modifizierung von Aminosäureseitenketten essentieller Aminosäuren wie besonders Lysin, Leucin und Methionin durch Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase, mit Laccase und mit Glucoseoxidase (Tab. 5.1). Nach Matheis und Whitaker (1984) und Marin et al. (2005) gelten Oxidationsprodukte von Aminosäuren wie Methioninsulfoxid jedoch als teilweise verfügbar in-vivo.

Untersuchungen zur pancreatischen in-vitro Proteolysierbarkeit von enzymatisch modifiziertem Milcheiweiß haben ergeben, dass die Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß durch Inkubation mit Glucoseoxidase tendenziell ansteigt und durch Lactoperoxidase nicht verändert wird (Natriumcaseinat) oder ansteigt (Molkenproteinisolat) (Tab. 5.1). Nur durch Inkubation mit Laccase wurde eine tendenzielle Verminderung der in-vitro Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß festgestellt (Tab. 5.1). Hurrel et al. (1982) und Petzke et al. (2005) berichteten jedoch, dass durch die Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen Milcheiweiß und phenolischen Substanzen (wie Kaffeesäure oder Chlorogensäure) keine Aminosäuren zu limitierenden Aminosäuren im Protein werden. Vergleichende Untersuchungen zur pancreatischen in-vitro Proteolysierbarkeit von transglutaminase- und von laccasebehandeltem Milcheiweiß haben ergeben (ohne Abb./Tab.), dass die Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß durch Inkubation mit Transglutaminase wesentlich stärker vermindert wird als durch Inkubation mit Laccase.

Für weitergehende Untersuchung wäre es interessant, Untersuchungen zur in-vivo Proteolysierbarkeit und zu weiteren tropho-funktionellen Eigenschaften von enzymatisch

modifiziertem Protein durchzuführen. Erste Studien, die ein geringeres allergenes Potenzial von peroxidasebehandeltem Erdnusseweiß (Chung et al. 2004) und von laccasebehandeltem Kirscheiweiß (Gruber et al. 2004) nachweisen, liegen bereits vor.

Untersuchungen zur enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß in Joghurtmilch durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase haben gezeigt, dass sich die Fermentationszeit von Joghurtmilch im Vergleich zu unbehandelter Joghurtmilch verkürzt und dass sehr weiche, glatte und homogene Joghurtgele mit geringer Viskosität, geringer Gelstärke und geringer Molkenlässigkeit ausgebildet werden. Für Joghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch wurden während der Lagerzeit eine geringe Azidität und ein hoher Gehalt an Acetaldehyd nachgewiesen. Joghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch wurde sensorisch in Bezug auf Geruch und Geschmack als mild und wenig sauer beurteilt, in Bezug auf die Konsistenz als glatt und cremig und in Bezug auf die Farbe als grau bis bräunlich.

Für Untersuchungen zur Modifizierung von Milcheiweiß in Joghurtmilch durch Transglutaminase wurde berichtet (Mautner 2000, El-Nour et al. 2004, Lorenzen et al. 2002, Lorenzen et al. 2005), dass feste, viskose Joghurtgele mit geringer Molkenlässigkeit und geringer Azidität ausgebildet werden. Die Fermentationszeit von Joghurtmilch verlängert sich. Joghurt aus transglutaminase-behandelter Joghurtmilch wird sensorisch durch eine helle Oberfläche, durch ein cremiges Mundgefühl und durch ein wenig joghurttypisches Aroma beschrieben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Eigenschaften von Joghurt wesentlich durch das Enzym beeinflusst werden können, dass zur Modifizierung beziehungsweise zur Quervernetzung von Milcheiweiß in Joghurtmilch eingesetzt wird. Ein erstes Patent zur Herstellung von stichfestem Joghurt mit 50 mg Lactoperoxidase je kg Ausgangsmilch, der gute Transporteigenschaften und einen hohen Lebendkeimgehalt aufweist, der wenig nachsäuert und der wenig molkenlässig ist, liegt bereits vor (Hirano und Kudo 1998).

Durch eine **chemisch-physikalische Modifizierung** von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion wurden Proteinmonomere in Natriumcaseinat, in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein zu Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten umgesetzt. Proteinmonomere in Natriumcaseinat wurden im Wesentlichen zu Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt, Proteinmonomere in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein zu Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol. Tabelle 5.1 zeigt, dass durch eine Erhitzung von Milcheiweiß in Abwesenheit von Sacchariden über 10 Tage unter ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen [70°C, 65% r. F.] nur maximal 6,9% der Proteinmonomere in Milcheiweiß modifiziert werden.

Durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen 33,1% - 62,3% der Proteinmonomere modifiziert, durch *Maillard*-Reaktion mit Lactose 56,3% - 98,1% der Proteinmonomere, durch *Maillard*-Reaktion mit Pektin 51,3% - 98,1% der Proteinmonomere und durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran 8,1% - 96,1% der Proteinmonomere (Tab. 5.1).

Die Ergebnisse zeigen, dass Proteinmonomere in Milcheiweiß nicht nur durch Inkubation mit Transglutaminase modifiziert beziehungsweise quervernetzt werden, sondern auch durch die chemisch-physikalische *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden. Es entstehen jeweils Reaktionsprodukte mit höherer Molmasse und modifizierten funktionellen Eigenschaften. Die Ergebnisse in Tabelle 5.1 stellen erstmals vergleichbar dar, dass die funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß weniger durch eine Erhitzung von Milcheiweiß [70°C, 65% r. F.,

10 d] bestimmt werden, als wesentlich durch das Saccharid, das zur *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß eingesetzt wird.

Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte zeichnen sich besonders durch eine höhere Viskosität ihrer wässrigen Lösungen aus und durch stärkere antioxidative Eigenschaften als unbehandeltes Milcheiweiß (Tab. 5.1). Sun et al. (2006) diskutierten, dass die antioxidativen Eigenschaften von *Maillard*-Produkten aus  $\alpha$ -Lactalbumin und Alloose in Emulsionen eine Oxidation von ungesättigten Fettsäuren verzögern können. Die Hitzestabilität von Milcheiweiß wurde im Wesentlichen durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, mit Lactose und mit Pektin vermindert und durch *Maillard*-Reaktion mit Dextran erhöht. In den vorliegenden Untersuchungen wurden besonders für Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkte und für Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkte sehr gute Grenzflächeneigenschaften nachgewiesen. Es wurde durch verschiedene Autoren diskutiert, dass besonders *Maillard*-Produkte aus Protein und verzweigt-kettigen Polysacchariden dicke Grenzflächenfilme ausbilden, die Öltröpfchen in Emulsionen sterisch vor einer Aggregation und einer Koaleszenz schützen (Dickinson 1998, Dunlap und Côté 2005, Kika et al. 2007, Diftis und Kiosseoglou 2006, Neiryck et al. 2004).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Sacchariden oligomere bis polymere Reaktionsprodukte entstehen, deren funktionelle Eigenschaften durch das Protein einerseits und durch das Saccharid andererseits bestimmt werden.

Kritisch zu beurteilen ist die Modifizierung von Seitenketten essentieller Aminosäuren wie Lysin, Leucin, Methionin und Phenylalanin in Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden (Tab. 5.1). Die in-vitro Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat durch Pancreatin wurde als Folge einer *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden vermindert, die in-vitro Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat verbessert (Tab. 5.1). Grundsätzlich wird die *Maillard*-Reaktion jedoch als untoxisches Verfahren zur Modifizierung der Eigenschaften von Protein diskutiert (Miller und Gerrard 2005).

Für weitergehende Untersuchungen wäre es interessant, Untersuchungen zur in-vivo Proteolysierbarkeit und zu weiteren tropho-funktionellen Eigenschaften von Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten durchzuführen. Erste Studien, die antihypertensive (Rufián-Henares und Morales 2007) sowie antimikrobielle Eigenschaften (Chevalier et al. 2001c, Miralles et al. 2007) und ein geringes allergenes Potenzial (Hattori et al. 2000) von *Maillard*-Produkten nachweisen, liegen bereits vor.

Untersuchungen zur Trockenmasseerhöhung von Joghurtmilch durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte haben erstmals gezeigt, dass sich die Fermentationszeit von Joghurtmilch im Vergleich zu Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Milcheiweiß/Saccharid-Mischungen verkürzt und dass weiche, glatte Joghurtgele mit geringer Molkenlässigkeit ausgebildet werden. Joghurtmilch mit Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkten bildete tendenziell festere Gele aus als Joghurt mit unbehandelten Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen. Joghurtmilch mit *Maillard*-Produkten aus Magermilchpulver oder aus Natriumcaseinat/Pektin-Mischungen bildete vergleichsweise schwache, wenig viskose Gele aus. Für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurden während der Lagerzeit eine geringe Azidität und ein hoher Gehalt an Acetaldehyd nachgewiesen. Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurde sensorisch als mild, wenig sauer, aromatisch und süß in Geruch und in Geschmack beurteilt, als glatt, schleimig, puddingartig und cremig in Bezug auf die Konsistenz und als grau bis bräunlich in

Bezug auf die Farbe. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass *Maillard*-Produkte in Joghurtmilch eingesetzt werden können, um die chemisch-physikalischen und die sensorischen Eigenschaften von Joghurt zu beeinflussen.

Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen zur *Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften* ermöglichen erstmals einen Überblick und einen direkten - qualitativen und quantitativen - Vergleich von enzymatischen und chemisch-physikalischen Methoden zur Modifizierung von Milcheiweiß. Es wurde gezeigt, dass durch enzymatische Modifizierung (durch Lactoperoxidase, Laccase oder Glucoseoxidase) und durch chemisch-physikalische Modifizierung (durch *Maillard*-Reaktion) von Milcheiweiß Proteinoligomere und Proteinpolymere hergestellt werden können, deren techno-funktionelle und tropho-funktionelle Eigenschaften unbehandeltem Milcheiweiß oder auch transglutaminase-behandeltem Milcheiweiß teilweise überlegen sind. Auf der Basis der Eigenschaften, die für die modifizierten Proteine ermittelt wurden (Tab. 5.1), ist es prinzipiell möglich, enzymatisch oder chemisch-physikalisch modifiziertes Protein für industrielle Anwendungen so auszuwählen, dass die Eigenschaften von Protein den Anforderungen entsprechen, die an techno- und tropho-funktionelle Ingredienzien gestellt werden.

## 6. Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen zur (I.) enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase sowie zur (II.) chemisch-physikalischen Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Glucose, mit Lactose, mit Pektin und mit Dextran durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden (III.) auf die technofunktionellen und die trophofunktionellen Eigenschaften untersucht.

Durch eine **enzymatische Modifizierung** von Milcheiweiß wurden Proteinmonomere in Natriumcaseinat, Molkenproteinisolat und Gesamtmilchprotein zu oligomeren bis polymeren Reaktionsprodukten umgesetzt. Proteinmonomere in Natriumcaseinat und in Gesamtmilchprotein wurden durch enzymatische Modifizierung im Wesentlichen zu Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt, Proteinmonomere in Molkenproteinisolat im Wesentlichen zu Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol.

Durch Inkubation von Milcheiweiß mit **Lactoperoxidase** wurden unter optimalen Inkubationsbedingungen 39,8% - 57,9% der Proteinmonomere modifiziert. Lactoperoxidase-behandeltes Milcheiweiß zeichnete sich im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß durch eine geringere Hitzestabilität, eine höhere Oberflächenhydrophobizität, verbesserte Grenzflächeneigenschaften, stärkere antioxidative Eigenschaften und eine höhere Viskosität der Proteinlösungen aus. Es wurde nachgewiesen, dass essentielle Aminosäuren wie Lysin, Leucin und Methionin durch Inkubation von Milcheiweiß mit Lactoperoxidase modifiziert wurden. Die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von Milcheiweiß wurde durch Inkubation von Natriumcaseinat mit Lactoperoxidase nicht beeinflusst und durch Inkubation von Molkenproteinisolat mit Lactoperoxidase verbessert.

Durch Inkubation von Milcheiweiß mit **Laccase** wurden unter optimalen Inkubationsbedingungen 51,3% - 92,0% der Proteinmonomere modifiziert. Zur Modifizierung von Milcheiweiß mit Laccase konnten Chlorogensäure und andere phenolische Substanzen aus Blaubeer-, Johannisbeer-, Wein- und Grünteeextrakt eingesetzt werden. Laccase-behandeltes Milcheiweiß zeichnete sich im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß durch eine geringere Hitzestabilität, eine höhere Oberflächenhydrophobizität, verminderte Emulgierereigenschaften, stärkere antioxidative Eigenschaften und eine höhere Viskosität der Proteinlösungen aus. Laccase-behandeltes Molkenproteinisolat und laccase-behandeltes Gesamtmilchprotein führten zur Ausbildung stabiler Proteinschäume. Lösungen von laccase-behandeltem Molkenproteinisolat bildeten einen höheren Overrun aus als Lösungen von unbehandeltem Molkenproteinisolat. Es wurde nachgewiesen, dass im Wesentlichen die essentiellen Aminosäuren Lysin, Leucin und Isoleucin durch Inkubation von Milcheiweiß mit Laccase modifiziert wurden. Die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von laccase-behandeltem Milcheiweiß war tendenziell vermindert.

Durch Inkubation von Milcheiweiß mit **Glucoseoxidase** wurden unter optimalen Inkubationsbedingungen 70,3% - 86,1% der Proteinmonomere modifiziert. Die Molmassenverteilung von Molkenproteinisolat wurde durch Inkubation mit Glucoseoxidase quantitativ nicht wesentlich verändert. Glucoseoxidase-behandeltes Milcheiweiß zeichnete sich im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß durch eine geringere Hitzestabilität, eine höhere Oberflächenhydrophobizität, verminderte Grenzflächeneigenschaften, stärkere antioxidative Eigenschaften und eine höhere Viskosität der Proteinlösungen aus. Glucoseoxidase-behandeltes Gesamtmilchprotein führte zur Ausbildung stabiler Proteinschäume. Es wurde nachgewiesen, dass im Wesentlichen die essentiellen Aminosäuren Lysin, Leucin und

Methionin durch Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase modifiziert wurden. Die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit wurde als Folge einer Inkubation von Milcheiweiß mit Glucoseoxidase verbessert.

Untersuchungen zur **enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß in Joghurtmilch** durch Lactoperoxidase, durch Laccase und durch Glucoseoxidase haben gezeigt, dass sich die Fermentationszeit von Joghurtmilch im Vergleich zu unbehandelter Joghurtmilch verkürzt und dass sehr weiche, glatte und homogene Joghurtgele mit geringer Viskosität, geringer Gelstärke und geringer Molkenlässigkeit ausgebildet werden. Für Joghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch wurden während der Lagerzeit eine geringe Azidität und ein hoher Gehalt an Acetaldehyd nachgewiesen. Joghurt aus enzymbehandelter Joghurtmilch wurde sensorisch als mild und wenig sauer in Bezug auf Geruch und Geschmack beurteilt, als glatt und cremig in Bezug auf die Konsistenz und als grau bis bräunlich in Bezug auf die Farbe.

Durch eine **chemisch-physikalische Modifizierung** von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion wurden Proteinmonomere in Natriumcaseinat, Molkenproteinisolat und Gesamtmilchprotein zu Protein/Saccharid-*Maillard*-Produkten umgesetzt.

Proteinmonomere in Natriumcaseinat wurden im Wesentlichen zu Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol umgesetzt, Proteinmonomere in Molkenproteinisolat und in Gesamtmilchprotein zu Proteinoligomeren von  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol und Proteinpolymeren  $>2 \times 10^5$  g/mol.

Durch **Maillard-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose** wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen 33,1% - 62,3% der Proteinmonomere modifiziert, durch **Maillard-Reaktion von Milcheiweiß mit Lactose** 56,3% - 98,1% der Proteinmonomere. Milcheiweiß/Glucose-*Maillard*-Produkte und Milcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkte zeichneten sich im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß durch eine geringere Hitzestabilität, eine höhere Oberflächenhydrophobizität, stärkere antioxidative Eigenschaften und eine höhere Viskosität von Lösungen der *Maillard*-Produkte aus. Natriumcaseinat/Glucose- und Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkte bildeten stabile Proteinschäume aus. Gesamtmilcheiweiß/Glucose- und Gesamtmilcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkte bildeten stabile Schäume und stabile Emulsionen aus. Lösungen von Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkten und von Gesamtmilcheiweiß/Lactose-*Maillard*-Produkten bildeten einen höheren Overrun aus als Lösungen von unmodifiziertem Milcheiweiß. Es wurde nachgewiesen, dass im Wesentlichen die essentiellen Aminosäuren Lysin, Leucin, Methionin und Phenylalanin durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Glucose oder mit Lactose modifiziert wurden. Die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat wurde als Folge einer *Maillard*-Reaktion mit Glucose oder mit Lactose vermindert, die Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat verbessert.

Durch **Maillard-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin** wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen 51,3% - 98,1% der Proteinmonomere modifiziert, durch **Maillard-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran** 8,1% - 96,1% der Proteinmonomere. Milcheiweiß/Pektin-*Maillard*-Produkte und Milcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkte zeichneten sich im Vergleich zu unbehandeltem Milcheiweiß durch eine geringere Oberflächenhydrophobizität, eine höhere Oberflächenspannung, einen höheren Overrun, verbesserte Emulgiereigenschaften, stärkere antioxidative Eigenschaften und eine höhere Viskosität von Lösungen der *Maillard*-Produkte aus. Gesamtmilcheiweiß/Pektin- und Gesamtmilcheiweiß/Dextran-*Maillard*-Produkte bildeten stabile Schäume aus. Für Gesamtmilchprotein/Pektin-, Gesamtmilchprotein/Dextran- und Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkte wurde eine höhere Hitzestabilität ermittelt als für unmodifiziertes Milcheiweiß. Es wurde nachgewiesen,



dass im Wesentlichen die essentiellen Aminosäuren Lysin, Leucin und Methionin durch *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Pektin oder mit Dextran modifiziert wurden. Die pancreatische in-vitro Proteolysierbarkeit von Natriumcaseinat wurde als Folge einer *Maillard*-Reaktion mit Pektin oder mit Dextran vermindert, die Proteolysierbarkeit von Molkenproteinisolat verbessert.

Untersuchungen zur **Trockenmasseerhöhung von Joghurtmilch durch Milcheiweiß/Saccharid-Maillard-Produkte** haben gezeigt, dass sich die Fermentationszeit von Joghurtmilch im Vergleich zu Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch unbehandelte Protein/Saccharid-Mischungen verkürzt und dass weiche, glatte Joghurtgele mit geringer Molkenlässigkeit ausgebildet werden. Joghurtmilch mit Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkten bildete tendenziell festere Gele aus als Joghurt mit unbehandelten Natriumcaseinat/Lactose-Mischungen. Joghurtmilch mit *Maillard*-Produkten aus Magermilchpulver oder aus Natriumcaseinat/Pektin-Mischungen bildete vergleichsweise schwache, wenig viskose Gele aus. Für Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurden während der Lagerzeit eine geringe Azidität und ein hoher Gehalt an Acetaldehyd nachgewiesen. Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Milcheiweiß/Saccharid-*Maillard*-Produkte wurde sensorisch als mild, wenig sauer, aromatisch und süß in Geruch und in Geschmack beurteilt, als glatt, schleimig, puddingartig und cremig in Bezug auf die Konsistenz und als grau bis bräunlich in Bezug auf die Farbe.

Die Untersuchungen zur *Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften* geben erstmals einen Überblick über techno-funktionelle und tropho-funktionelle Eigenschaften von Proteinoligomeren und auch Proteinpolymeren, die aus der enzymatischen Modifizierung von Milcheiweiß durch Lactoperoxidase, Laccase oder Glucoseoxidase auf der einen Seite und aus der chemisch-physikalischen Modifizierung von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion mit Sacchariden auf der anderen Seite hervorgehen. Der Überblick ermöglicht einen direkten - qualitativen und quantitativen - Vergleich und eine Bewertung der unterschiedlichen enzymatischen und chemisch-physikalischen Verfahren untereinander und einen Vergleich mit der Modifizierung von Milcheiweiß durch Transglutaminase. Auf der Basis der Eigenschaften, die für die modifizierten Proteine ermittelt wurden, ist es prinzipiell möglich, enzymatisch oder chemisch-physikalisch modifiziertes Protein für industrielle Anwendungen so auszuwählen, dass die Eigenschaften von Protein den Anforderungen entsprechen, die an techno- und tropho-funktionelle Ingredienzien gestellt werden.

## 7. Summary

The aim of this work was to (I.) modify milk protein enzymatically by lactoperoxidase, laccase and glucose oxidase, to (II.) modify milk protein physicochemically by *Maillard* reaction with glucose, lactose, pectin and dextran and to (III.) characterize the techno- and tropho-functional properties of the reaction products.

Upon **enzymatic modification** protein oligomers and polymers were formed from protein monomers in sodium caseinate, whey protein isolate and total milk protein. Protein monomers in sodium caseinate and in total milk protein were mainly cross-linked to protein polymers  $>2 \times 10^5$  g/mol, protein monomers in whey protein isolate to protein oligomers of  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol.

Under optimal reaction conditions, milk protein monomers were modified by 39.8% - 57.9% upon incubation with **lactoperoxidase**. Lactoperoxidase-treated milk protein was characterized by lower heat stability, higher surface hydrophobicity, superior interfacial properties, increased antioxidant capacity and higher viscous solutions in relation to untreated milk protein. It was demonstrated that essential amino acids like lysine, leucine and methionine in milk protein were modified by lactoperoxidase. Modification of milk protein by lactoperoxidase did not impact pancreatic in vitro digestibility of sodium caseinate, but increased digestibility of whey protein isolate.

Under optimal reaction conditions, milk protein monomers were modified by 51.3% - 92.0% upon incubation with **laccase**. Chlorogenic acid and phenolic substances from blueberry extract, black currant extract, wine extract and green tea extract were applied to modify milk protein by laccase. Laccase-treated milk protein was characterized by lower heat stability, higher surface hydrophobicity, diminished emulsifying properties, increased antioxidant capacity and higher viscous solutions than untreated milk protein. Laccase-treated whey protein isolate and laccase-treated total milk protein formed stabile protein foams. Higher overrun was obtained from solutions of laccase-treated whey protein isolate than from solutions of untreated whey protein isolate. It was demonstrated that essential amino acids like lysine, leucine and isoleucine in milk protein were modified by laccase. Pancreatic in vitro digestibility was slightly impaired by modification of milk protein by laccase.

Under optimal reaction conditions, milk protein monomers were modified by 70.3% - 80.1% upon incubation with **glucose oxidase**. The molar mass distribution of whey protein isolate remained mainly unaffected by glucose oxidase. Glucose oxidase-treated milk protein was characterized by lower heat stability, higher surface hydrophobicity, decreased interfacial properties, higher antioxidant capacity and higher viscous solutions than untreated milk protein. Glucose oxidase-treated total milk protein formed stabile protein foams. It was observed that essential amino acids like lysine, leucine and methionine in milk protein were modified by glucose oxidase. Pancreatic in vitro digestibility of sodium caseinate and whey protein isolate increased upon modification with glucose oxidase.

**Enzymatic modification of milk proteins in yoghurt milk** by lactoperoxidase, laccase and glucose oxidase caused reduced fermentation periods of yoghurt milk and the formation of soft, smooth and homogeneous yoghurt gels. Yoghurt gels from enzymatically treated yoghurt milk were characterized by lower viscosity, lower gel strength, less syneresis, inferior post acidification during storage and higher amounts of acetaldehyde than yoghurt from untreated yoghurt milk. Sensory analysis characterized yoghurt from enzymatically treated milk as mild and less sour concerning taste and smell, as smooth and creamy concerning consistency and as slightly grey to brown in colour.

Upon **physicochemical modification** of sodium caseinate, whey protein isolate and total milk protein by *Maillard* reaction protein/saccharide *Maillard* reaction products were formed from protein monomers. Protein monomers in sodium caseinate were mainly converted to protein polymers  $>2 \times 10^5$  g/mol, whereas protein monomers in whey protein isolate and in total milk protein were converted to protein oligomers of  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  g/mol and protein polymers  $>2 \times 10^5$  g/mol.

Under optimal reaction conditions, milk protein monomers were modified by 33.1% - 62.3% upon **Maillard reaction of milk protein with glucose** or by 56.3% - 98.1% upon **Maillard reaction with lactose**. Milk protein/glucose *Maillard* reaction products and milk protein/lactose *Maillard* reaction products were characterized by lower heat stability, higher surface hydrophobicity, increased antioxidant capacity and higher viscous solutions than untreated milk protein or untreated milk protein/saccharide mixtures. Sodium caseinate/glucose and sodium caseinate/lactose *Maillard* reaction products formed stabile protein foams. Total milk protein/glucose and total milk protein/lactose *Maillard* reaction products formed stabile protein foams as well as stabile emulsions. Higher overrun was obtained from solutions of sodium caseinate/glucose *Maillard* reaction products and total milk protein/lactose *Maillard* reaction products than from solutions of untreated milk protein. It was demonstrated that essential amino acids like lysine, leucine, methionine and phenylalanine in milk protein were modified by *Maillard* reaction with glucose and lactose. Pancreatic in vitro digestibility of sodium caseinate was impaired upon *Maillard* reaction with glucose and lactose, whereas digestibility of whey protein isolate was improved by *Maillard* reaction.

Under optimal reaction conditions, milk protein monomers were modified by 51.3% - 98.1% upon **Maillard reaction with pectin** and by 8.1% - 96.1% upon **Maillard reaction with dextran**. Milk protein/pectin *Maillard* reaction products and milk protein/dextran *Maillard* reaction products were characterized by lower surface hydrophobicity, higher surface tension, increased overrun, improved emulsifying properties, increased antioxidant capacity and higher viscous solutions than untreated milk protein. Total milk protein/pectin *Maillard* reaction products as well as total milk protein/dextran *Maillard* reaction products formed stabile foams. Total milk protein/pectin, total milk protein/dextran and whey protein isolate/dextran *Maillard* reaction products performed higher heat stability. It was demonstrated that essential amino acids like lysine, leucine and methionine in milk protein were modified upon *Maillard* reaction with pectin or dextran. Pancreatic in vitro digestibility of sodium caseinate was impaired upon *Maillard* reaction with pectin and dextran, whereas digestibility of whey protein isolate was improved by *Maillard* reaction.

**Increasing dry matter of yoghurt milk by milk protein/saccharide *Maillard* reaction products** caused reduced fermentation periods of yoghurt milk and the formation of soft and smooth yoghurt gels. Yoghurt milk with sodium caseinate/lactose *Maillard* reaction products formed more stabile yoghurt gels than yoghurt milk with untreated sodium caseinate/lactose mixtures. Yoghurt milk with *Maillard* reaction products from skim milk powder or from sodium caseinate/pectin mixtures formed comparatively weak yoghurt gels of low viscosity. Yoghurt from yoghurt milk with *Maillard* reaction products was characterized by lower syneresis, lower post acidification during storage and higher amounts of acetaldehyde than yoghurt from milk with untreated protein/saccharide mixtures. Sensory analysis revealed that yoghurt from yoghurt milk with *Maillard* reaction products was judged as mild, less sour, aromatic and sweet in taste and smell, as smooth, slimy, pudding-like and creamy in consistency and as slightly grey to brown in colour.

The investigations of the *Oligomerisation of milk protein by enzymatic and physicochemical methods and evaluation of techno-functional and in-vitro tropho-functional properties* present for the first time an overview over techno-functional and tropho-functional properties of protein oligomers as well as protein polymers obtained by enzymatic modification of milk protein by lactoperoxidase, laccase and glucose oxidase on the one hand and by physicochemical modification of milk protein by *Maillard* reaction with saccharides on the other hand. The overview facilitates a direct - qualitative and quantitative - comparison and evaluation of the different enzymatic and physicochemical methods with each other or with an enzymatic protein modification by transglutaminase. In principle, the results make it possible to select enzymatically and physicochemically modified milk proteins for industrial applications according to the requirements techno- and tropho-functional food ingredients should meet.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aeschbach, R, Amado, R, Neukom, H. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochim. Biophys. Acta* 439, 292-301, **1976**.
- Ajandouz, EH, Desseaux, V, Tazi, S, Puigserver, A. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and *Maillard* reactions in aqueous model systems. *Food Chem., Article in Press*, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.062.
- Akhtar, M, Dickinson, E. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. *Food Hydrocoll.* 21, 607-616, **2007**.
- Al-Hakkak, J, Kavale, S. Improvement of emulsification properties of sodium caseinate by conjugating to pectin through *Maillard* reaction. *Int. Congr. Ser.* 1245, 491-499, **2002**.
- Alzari, P, Anicet, N, Bourdillon, C, Moiroux, J, Saveant, J-M. Molecular recognition of artificial single-electron acceptor cosubstrates by glucose oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6788-6789, **1996**.
- Aminlari, M, Ramezani, R, Jadidi, F. Effect of *Maillard*-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2617-2624, **2005**.
- Arakawa, T, Timasheff, SN. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochem.* 21, 6536-6544, **1982**.
- Baeza, R, Carrera Sanchez, C, Pilosof, AMR, Rodríguez Patino, JM. Interactions of polysaccharides with  $\beta$ -lactoglobulin absorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 19, 239-248, **2004**.
- Barbeau, WE, Kinsella, EA. Effects of free and bound chlorogenic acid on the in vitro digestibility of ribulose biphosphate carboxylase from spinach. *J. Food Sci.* 50, 1083-1087, **1985**.
- Basaga, H, Dik, T. Effect of the lactoperoxidase system on the activity of starter cultures for yoghurt production. *Milchwiss.* 49, 144-146, **1994**.
- Basic, M, Vilusic, M, Dulovic, M. Temperature influence of heat treatment of raw milk on the stirred yoghurt quality. *Works of the Faculty of Agriculture University of Sarajevo* 56, 129-138, **2005**.
- Belloque, J, Smith, G. M.  $^1\text{H}$ -Nuclear magnetic resonance studies on the conformational changes related to the foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 81, 2580-2587, **1998**.
- Benichou, A, Aserin, A, Lutz, R, Garti, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J. Dispersion Sci. Technol.* 23, 93-123, **2002**.
- Boeriu, CG, Oudgenoeg, G, Spekking, WTJ, Berendsen, LBJM, Vancon, L, Boumans, H, Gruppen, H, van Berkel, BJH, Laane, C, Voragen, AGJ. Horseradish peroxidase-catalyzed cross-linking of feruloylated arabinoxylans with  $\beta$ -casein. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6633-6639, **2004**.
- Bonet, A, Rosell, CM, Caballero, PA, Gómez, M, Pérez-Munuera, I, Lluch, MA. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality. A study from macroscopic to molecular level. *Food Chem.* 99, 408-415, **2006**.

- Boots, J-W, Floris, R. Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *Int. Dairy J.* 16, 1272-1276, **2006**.
- Borcherding, K. Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2004**.
- 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, 1489-1494, **1999**.
- Brands, CMJ, Wedzicha, B, van Boekel, MAJS. Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1178-1183, **2002**.
- Broersen, K, Voragen, AGJ, Hamer, RJ, de Jongh, HHJ. Glycoforms of  $\beta$ -lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packaging. *Biotech. Bioeng.* 86, 78-87, **2004**.
- Burr, R, Moore, CH, Hill, JP. Evidence of multiple glycosylation of bovine lactoglobulin by electrospray ionization mass spectrometry. *Milchwiss.* 51, 488-492, **1996**.
- Caballero, PA, Gomez, M, Rosell, CM. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *J. Food Eng.* 81, 42-53, **2007**.
- Calligaris, S, Manzocco, L, Anese, M, Nicoli, MC. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *Int. Dairy J.* 14, 421-427, **2004**.
- Capitani, C, Pérez, OE, Pacheco, B, Teresa, M, Pilosof, AMR. Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocoll.* 21, 1344-1354, **2007**.
- Cardamone, M, Puri, NK. Spectrofluorometric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* 282, 589-593, **1992**.
- Casal, E, Corzo, N, Moreno, FJ, Olano, A. Glycation of caseinmacropeptide. *Food Chem.* 92, 33-36, **2005**.
- Chan, TW, Bruce, TC. One and two electron transfer reactions of glucose oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 2387-2389, **1977**.
- Chevalier, F, Chobert, J-M, Popineau, Y, Nicolas, MG, Haertlé, T. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated by *Maillard* reaction is related to the nature of the sugar. *Int. Dairy J.* 11, 145-152, **2001a**.
- Chevalier, F, Chobert, J-M, Mollé, D, Haertlé, T. *Maillard* glycation of  $\beta$ -lactoglobulin with several sugars: Comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait* 81, 651-666, **2001b**.
- Chevalier, F, Chobert, J-M, Genot, C, Haertlé, T. Scavenging of free radicals, antimicrobial and cytotoxic activities of the *Maillard* reaction products of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5031-5038, **2001c**.
- Chevalier, F, Chobert, D, Dalgalarondo, M, Choiset, Y, Haertlé, T. *Maillard* glycation of  $\beta$ -lactoglobulin induces conformation changes. *Nahrung* 46, 58-63, **2002**.

- Chica, RA, Gagnon, P, Keillor, JW, Pelletier, JN. Tissue transglutaminase acylation: Proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding. *Protein Sci.* 13, 979-991, **2004**.
- Choi, SJ, Kim, HJ, Park, KH, Moon, TW. Molecular characteristics of ovalbumin-dextran conjugates formed through the *Maillard* reaction. *Food Chem.* 92, 93-99, **2005**.
- Chung, S-Y, Maleki, SJ, Champagne, ET. Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4541-4545, **2004**.
- Claus, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93-96, **2004**.
- Courthaudon, J-L, Colas, B, Lorient, D. Covalent binding of glycosyl residues to bovine caseine: Effects on solubility and viscosity. *J. Agric. Food Chem.* 37, 32-36, **1989**.
- Dai, Z, Nement, I, Shen, W, Monnier, VM. Isolation, purification and characterization of histidino-threosidine, a novel *Maillard* reaction protein crosslink from threose, lysine and histidine. *Archives Biochem. Biophys.* 463, 78-88, **2007**.
- Dannenber, F, Kessler, H-G. Effect of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin on texture properties of set-style nonfat yoghurt. 1. Syneresis. *Milchwiss.* 43, 632-635, **1988a**.
- Dannenber, F, Kessler, H-G. Effect of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin on texture properties of set-style nonfat yoghurt. 2. Firmness and flow properties. *Milchwiss.* 43, 700-704, **1988b**.
- Davies, KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901, **1987**.
- Davies, KJA, Delsignore, ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 262, 9908-9913, **1987**.
- Davies, KJA, Delsignore, ME, Lin, SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* 262, 9902-9907, **1987a**.
- Davies, KJA, Lin, SW, Pacifici, RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 262, 9914-9920, **1987b**.
- Dean, RT, Shanlin, FU, Stocker, R, Davies, MJ. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18, **1997**.
- De Block, J, Merchiers, M, Mortier, L, Braekman, A, Ooghe, W, van Renterghem, R. Monitoring nutritional quality of milk powders: Capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. *Int. Dairy J.* 13, 83-94, **2003**.
- Decker, EA, Xiong, YL, Calvert, JT, Crum, AD, Blanchard, SP. Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* 41, 186-189, **1993**.
- De Jong, GAH, Boumans, J, Wilhelmus, L, Wijngaards, G. Food grade transglutaminase inhibitor and uses thereof. Patent des Europäischen Patentamtes **2005**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: NZ526163.
- De Montellano, PRO. Control of the catalytic activity of prosthetic heme by the structure of hemoproteins. *Acc. Chem. Res.* 20, 289-294, **1987**.

- Dickinson, E, Izgi, E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 113, 191-201, **1996**.
- Dickinson, E, Semenowa, MG. Emulsifying properties of covalent protein-dextran hybrids. *Colloids and Surfaces* 64, 299-310, **1992**.
- Dickinson, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 334-339, **1997**.
- Dickinson, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 347-354, **1998**.
- Diftis, NG, Biliaderis, CG, Kiosseoglou, VD. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture. *Food Hydrocoll.* 19, 1025-1031, **2005**.
- Diftis, NG, Kiosseoglou, VD. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate-dextran mixture. *Food Hydrocoll.* 20, 787-792, **2006**.
- Dills, WL. Protein fructosylation: Fructose and the *Maillard* reaction. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 779S-787S, **1993**.
- DIN (Hrsg.). DIN 10967-1: Sensorische Prüfverfahren - Profilprüfung - Teil 1: Konventionelles Profil. Deutsches Institut für Normung, **1999**.
- Dunlap, CA, Côté, GL.  $\beta$ -lactoglobulin-dextran conjugates: Effect of polysaccharide size on emulsion stability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 419-423, **2005**.
- Dunnewind, B, van Vliet, T, Orsel, R. Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *J. Cereal Sci.* 36, 357-366, **2002**.
- Eidwin, DMN, Murphy, E, O'Beirne, D. Polyphenol oxidase from apple: Purification strategies and characterization. *J. Food Sci.* 71, C51-C58, **2006**.
- Einhorn-Stoll, U, Ulbrich, M, Sever, S, Kunzek, H. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. *Food Hydrocoll.* 19, 329-340, **2005**.
- Eissa, AS, Bisram S, Khan SA. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4456-4464, **2004**.
- Ellman, GL. Assessment of protein sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77, **1959**.
- EI-Nour, AMA, El-Kholy, AM, El-Salam, MHA. Rheological properties of cows milk yoghurt treated by transglutaminase. *Egypt. J. Dairy Sci.* 32, 73-86, **2004**.
- Ercelebi, EA, Ibanoglu, E. Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *J. Food Eng.* 80, 454-459, **2007**.
- Færgemand, M, Otte, J, Qvist, KB. Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1326-1333, **1998a**.
- Færgemand M, Otte J, Qvist KB. Emulsifying properties of milk proteins crosslinked with microbial transglutaminase. *Int. Dairy J.* 8, 715-723, **1998b**.



- Fechner, A, Knoth, A, Scherze, I, Muschiolik, G. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocoll.* 21, 943-952, **2007**.
- Fenaille, F, Morgan, F, Parisod, V, Tabet, JC, Guy, PA. Solid-state glycation of  $\beta$ -lactoglobulin by lactose and galactose: Localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. *J. Mass Spectrom.* 39, 16-28, **2004**.
- Fernández, E, Schebor, C, Chirife, J. Glass transition temperature of regular and lactose hydrolysed milk powders. *LWT* 36, 547-551, **2003**.
- Figuroa-Espinoza, MC, Rouau, X. Effect of cysteinyl caffeic acid, caffeic acid and L-Dopa on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *J. Agric. Food Chem.* 47, 497-503, **1999**.
- Fitzgerald, RJ, Meisel, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: Fox, PF, McSweeney, PLH (Hrsg.). *Advanced dairy chemistry – 1. Proteins*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, London, **2003**.
- Flanagan, J, Gunning, Y, FitzGerald, RJ. Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Res. Int.* 36, 267-274, **2003**.
- Fonteh, FA, Grandison, AS, Lewis, MJ. Factors affecting lactoperoxidase activity. *Int. J. Dairy Technol.* 58, 233-236, **2005**.
- French, SJ, Harper, WJ. *Maillard* reaction induced lactose attachment to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Foam and emulsion functionality. *Milchwiss.* 58, 252-256, **2003**.
- Friedman, M. Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem.* 44, 631-653, **1996**.
- Frister, H, Meisel, H, Schlimme, E. Modifizierte OPA-Methode zur Charakterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwiss.* 41, 483-487, **1986**.
- Fujiwara, K, Oosawa, T, Saeki, H. Improved thermal stability and emulsifying properties of carp myofibrillar proteins by conjugation with dextran. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1257-1261, **1998**.
- Ganzevles, RA, Stuart, MAC, van Vliet, T, de Jongh, HHJ. Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 20, 872-878, **2006**.
- Gaucher, I, Mollé, D, Gagnaire, V, Gaucheron, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocoll.* 22, 130-143, **2008**.
- Girginov, T, Choroleeva, M. Effect of hydrogen peroxide on the development of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* cultivated separately. *Nauchni Trudove, Vissh Institut pro Khranitelna i Vkusova Promishlenost* 19, 209-217, **1972**.
- Grabber, JH, Ralph, J, Hatfield, RD. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6106-6113, **2000**.
- Gruber, P, Vieths, S, Wangorsch, A, Nerkamp, J, Hofman, T. *Maillard* reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*prunus avium*). *J. Agric. Food Chem.* 51, 4002-4007, **2004**.

- Gursel, A, Atamer, M. Some textural characteristics of yoghurts made from lactoperoxidase-system treated milk. Texture of fermented milk products and dairy desserts. *Proceedings of the IDF Symposium, Vicenza*, 139-146, **1998**.
- Guyomarc'h, F, Warin, F, Muir, DD, Leaver, J. Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders. *Int. Dairy J.* 10, 863-872, **2000**.
- Haarasilta, S, Pullinen, T. Novel enzyme combination. A tool to improve baking results. *Agro Food Ind. Hi Technol.* 3, 12-13, **1992**.
- Halaouli, S, Asther, M, Kruus, K, Guo, L, Hamdi, M, Sigoillot, JC, Asther, H, Lomascolo, A. Characterization of new tyrosinase from pycnopus species with high potential for food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* 98, 332-343, **2005**.
- Han, X-Q, Damodaran, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *J. Agric. Food. Chem.* 44, 1211-1217, **1996**.
- Handa, A, Kuroda, N. Functional improvements in dried egg-white through the *Maillard* reaction. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1845-1850, **1999**.
- Hanft, F, Köhler, P. Quantitation of dityrosine in wheat flour and dough by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 2418-2423, **2005**.
- Hanft, F, Köhler, P. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J. Sci. Food. Agric.* 86, 1699-1704, **2006**.
- Hansen, G, Frömmel, C. Biochemische Charakteristik der Enzyme. In: Ruttloff, H. (Hrsg.). Industrielle Enzyme. Behr's Verlag, Hamburg **1994**.
- Hassan, AB, Osman, GA, Babiker, EE. Effect of chymotrypsin digestion followed by polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on functional properties of millet proteins. *Food Chem.* 102, 257-262, **2007**.
- Hattori, M, Numamoto, K, Kobayashi, K, Takahashi, K. Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2050-2056, **2000**.
- Hattori, M, Ogino, A, Nakai, H, Takahashi, K. Functional improvement of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugating with alginate lyase-lysate. *J. Agric. Food Chem.* 45, 703-708, **1997**.
- Havea, P. Protein interactions in milk protein concentrate powders. *Int. Dairy. J.* 16, 415-422, **2006**.
- Heimdal, H, Bro, R, Larsen, LM, Poll, L. Prediction of polyphenol oxidase activity in model solutions containing various combinations of chlorogenic acid, epicatechin, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperature and pH by multiway data analysis. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2399-2406, **1997**.
- Hilhorst, R, Dunnewind, B, Orsel, R, Stegemann, R, Vliet, TV, Gruppen, H, Schols, HA. Baking performance, rheology and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *J. Food Sci.* 64, 808-813, **1999**.
- Hiller, B, Lorenzen, PC. Effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1140-1144, **2008**.
- Hirano, R, Hirano, M, Oooka, M, Dosako, S. Changes in physical properties of acid milk gels by addition of lactoperoxidase. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 44, 877-881, **1997**.

- Hirano, R, Kudo, T. Hard yoghurt and its production. Patent des Europäischen Patentamtes **1998**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: JP10099019.
- Hirano, R, Hirano, M, Oooka, M, Dosako, S, Nakajima, I, Igoshi, K. Lactoperoxidase effects on the rheological properties of yoghurt. *J. Food Sci.* 63, 35-38, **1998a**.
- Hirano, R, Hirano, M, Oooka, M, Hatanaka, K. Effects of lactoperoxidase on gelation properties of yoghurt. *Food Res. Int.* 31, 1-6, **1998b**.
- Hirano, R, Hirano, M, Hatanaka, K. Changes in hardness of acid milk gel by addition of hypothiocyanite ion, hydrogen peroxide and their effects on sulfhydryls in milk proteins. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 46, 376-381, **1999**.
- Ho, Y-T, Ishizaki, S, Tanaka, M. Improving emulsifying activity of  $\epsilon$ -polylysine by conjugation with dextran through the *Maillard* reaction. *Food Chem.* 68, 449-455, **2000**.
- Hurrell, RF, Finot, PA, Cuq, JL. Protein-polyphenol reactions. 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Br. J. Nutr.* 47, 191-211, **1982**.
- Jaros, D, Partschefeld, C, Henle, T, Rohm, H. Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *J. Texture Studies* 37, 113-155, **2006**.
- Jee, J-G, Park, S-J, Kim, H-J. Tyrosinase-induced cross-linking of tyrosine-containing peptides investigated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1563-1567, **2000**.
- Jiménez-Castaño, L, López-Fandiño, R, Olano, A, Villamiel, M. Study on  $\beta$ -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability. *Food Chem.* 93, 689-695, **2005a**.
- Jiménez-Castaño, L, Villamiel, M, Martín-Álvarez, PJ, Olano, A, López-Fandiño, R. Effect of dry-heating conditions on the glycosylation of  $\beta$ -lactoglobulin with dextran through the *Maillard* reaction. *Food Hydrocoll.* 19, 831-837, **2005b**.
- Jiménez-Castaño, L, Villamiel, M, López-Fandiño, R. Glycosylation of individual whey proteins by *Maillard* reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocoll.* 21, 433-443, **2007**.
- Jing, H, Kitts, DD. Chemical and biochemical properties of casein-sugar *Maillard* reaction products. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1007-1015, **2002**.
- Jöbstl, E, Howse, JR, Fairclough, JP, Williamson, MP. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4077-4081, **2006**.
- Jones, AD, Tier, CM, Wilkins, JPG. Analysis of the *Maillard* reaction products of  $\beta$ -lactoglobulin and lactose in skimmed milk powder by capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *J. Chromatography A* 822, 147-154, **1998**.
- Kamin-Belsky, N, Brillon, AA, Arav, R, Shaklai, N. Degradation of myosin by enzymes of the digestive system. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1641-1646, **1996**.
- Kato, A, Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties. *Biochim. Biophys. Acta* 624, 13-20, **1980**.

- Kato, A, Matsuda, T, Matsudomi, N, Kobayashi, K. Determination of protein hydrophobicity using sodium dodecyl sulfate binding. *J. Agric. Food Chem.* 32, 284-288, **1984**.
- Kato, Y, Matsuda, T, Kato, N, Watanabe, K, Nakamura, R. Browning and insolubilization of ovalbumin by the *Maillard* reaction with some aldohexoses. *J. Agric. Food Chem.* 34, 806-809, **1986**.
- Kato, A, Murata, K, Kobayashi, K. Preparation and characterization of ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.* 36, 421-425, **1988a**.
- Kato, Y, Matsuda, T, Kato, N, Nakamura, R. Browning and protein polymerization induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose. *J. Agric. Food Chem.* 36, 806-809, **1988b**.
- Keshavarz, E, Nakai, S. The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 576, 269-279, **1979**.
- Khalid, S, Masud, T. Effect of activated lactoperoxidase system on the quality characteristics of yoghurt. *Electric J. Environ. Agric. Food Chem.* 3, 777-783, **2004**.
- Kika, K, Korlos, F, Kiosseoglou, V. Improvement, by dry-heating, of the emulsion-stabilizing properties of a whey protein concentrate obtained through carboxymethylcellulose complexation. *Food Chem.* 104, 1153-1159, **2007**.
- Kim, C-H, Lee, K-W, Baick, S-C, Moon, J-W. Inhibition of acid production in gel type yoghurt by the lactoperoxidase system. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28, 736-742, **1996**.
- Kinsella, JE. Protein modification: Effects on functional properties and digestibility. In: Barth, CA, Schlimme, E (Hrsg.). *Milk proteins - Nutritional, clinical, functional and technological aspects*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, **1989**.
- Konrad, G, Lieske, B. Gezielte thermische Denaturierung - Ein alternativer Weg zu funktionellerem Molkenprotein. *Deutsche Milchwirt.* 23, 1130-1134, **1994**.
- Koppelman, SJ, Wijngaards, T. Enzymatic cross linking of proteins, an overview. In: Gruppen, H, van Hartingsveldt, W (Hrsg.). *International symposium on enzymatic food processing*. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, **2000**.
- Krasaekoopt, W, Bhandari, B, Deeth, H. Comparison of textures of yoghurt made from conventionally treated milk and UHT milk fortified with low-heat skim milk powder. *J. Food Sci.* 69, E276-E280, **2004**.
- Kristinsson, H. G, Hultin, H. O. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle protein. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5103-5110, **2003**.
- Kroll, J, Rawel, HM, Seidelmann, N. Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1580-1587, **2000**.
- Kudryashova, EV, Visser, AJWG, van Hoek, A, de Jongh, HHJ. Molecular details of ovalbumin-pectin complexes at the air/water interface. *Langmuir* 23, 7942-7950, **2007**.
- Kumar, S, Mathur, BN. Studies on the manufacture of yoghurt and mozzarella cheese from milk preserved by lactoperoxidase-system. *Ind. J. Dairy Sci.* 42, 194-197, **1989**.

- Kurultay, S, Oksuz, O, Kaptan, B. Effects of different heat treatments of milk on some growth characteristics of mixed and single cell cultures of yoghurt bacteria. *Milchwiss.* 61, 52-55, **2006**.
- Kussendrager, KD, van Hooijdonk, AC. Lactoperoxidase. Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British J. Nutr.* 84, S12-S25, **2000**.
- Lantto, R, Puolanne, E, Kalkkinen, N, Buchert, J, Autio, K. Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: Effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9231-9237, **2005**.
- Lantto, R, Plathin, P, Niemistö, M, Buchert, J, Autio, K. Effects of transglutaminase, tyrosinase and freeze-dried apple pomace powder on gel forming and structure of pork meat. *LWT* 39, 1117-1124, **2006**.
- Lantto, R, Puolanne, E, Katina, K, Niemistö, M, Buchert, J, Autio, K. Effect of laccase and transglutaminase on the textural and water-binding properties of cooked chicken breast meat gels. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 75-83, **2007a**.
- Lantto, R, Puolanne, E, Kruus, K, Buchert, J, Autio, K. Tyrosinase-aided protein cross-linking. Effects on gel formation of chicken breast myofibrils and texture and water-holding of chicken breast meat homogenate gels. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1248-1255, **2007b**.
- Lauber, S, Klostermeyer, H, Henle, T. On the influence of non-enzymatic crosslinking of caseins on the gel strength of yoghurt. *Nahrung* 45, 215-217, **2001**.
- Lee, HS, Sen, LC, Clifford, AJ, Whitaker, JR, Feeney, RE. Preparation and nutritional properties of caseins covalently modified with sugars. Reductive alkylation of lysines with glucose, fructose or lactose. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1094-1098, **1979**.
- Leonil, J, Molle, D, Fauquant, J, Maubois, JL, Pearce, RJ, Bouhallab, S. Characterization by ionisation 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, 2270-2281, **1997**.
- Leroux, J, Langendorff, V, Schick, G, Vaishnav, V, Mazoyer, J. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocoll.* 17, 455-462, **2003**.
- Leskovac, V, Trivic, S, Wohlfahrt, G, Kandrač, J, Peričin, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. The mechanism of action with molecular oxygen, quinones and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 731-750, **2005**.
- Li, CP, Enomoto, H, Ohki, S, Ohtomo, H, Aoki, T. Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *Int. Dairy Sci.* 88, 4137-4145, **2005**.
- Lieske, B, Konrad, G. A new approach to estimate surface hydrophobicity of proteins. *Milchwiss.* 49, 663-666, **1994**.
- Liu, G, Xiong, YL, Butterfield, DA. Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. *J. Food Sci.* 65, 811-818, **2000**.
- Liu, M, Damodaran, S. Effect of transglutaminase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -casein on its emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1514-1519, **1999**.

- Liu, HC, Chen, WL, Mao, SJT. Antioxidant nature of bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 90, 547-555, **2007**.
- Lorenzen, PC. Untersuchungen zur Charakterisierung der Emulgatoreigenschaften von Milchproteinen. Dissertation am Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchforschung zu Kiel, **1983**.
- Lorenzen, PC. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwiss.* 55, 667-670, **2000a**.
- Lorenzen, PC. Verfahren zur Modifizierung von Milcheiweiß. *Kieler Milchwirt. Forsch.* 52, 47-59, **2000b**.
- Lorenzen, PC, Neve, H Mautner, A, Schlimme, E. Effect of enzymatic-crosslinking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* 55, 152-157, **2002**.
- Lorenzen, PC, Schrader, K, Einhoff, K, Rohenkohl, H. Impact of enzymatic crosslinking of milk protein on the properties of stirred yoghurt and stirred cultured yoghurt products. *Kieler Milchwiss. Forsch.* 57, 97-115, **2005**.
- Lorenzen, PC. Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. *Food Res. Int.* 40, 700-708, **2007**.
- Malec, LS, Pereyra Gonzales, AS, Naranjo, GB, Vigo, MS. Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Res. Int.* 35, 849-853, **2002**.
- Marin, E, Sanchez, L, Perez, MD, Pocovi, C, Calvo, M. Effect of hydrogen peroxide on methionine and cysteine levels in bovine milk. *Milchwiss.* 60, 426-429, **2005**.
- Martinez, KD, Sanchez, CC, Ruiz-Henestrosa, VP, Rodríguez Patino, JM, Pilosof, AMR. Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 21, 804-812, **2007**.
- Matheis, G, Whitaker, JR. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.* 8, 137-162, **1984**.
- Matheis, G, Whitaker, JR. A review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *J. Food Biochem.* 11, 309-327, **1987**.
- Matsudomi, N, Nakano, K, Soma, A, Ochi, A. Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the *Maillard* reaction. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4113-4118, **2002**.
- Mattinen, M-L, Hellmann, M, Permi, P, Autio, K, Kalkkinen, N, Buchert, J. Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8836-8890, **2006**.
- Mattinen, M-L, Kruus, K, Buchert, J, Nielsen, JH, Andersen, HJ, Steffensen, CL. Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptide. *FEBS J.* 272, 3640-3650, **2005**.
- Mautner, A, Meisel, H, Lorenzen, PC, Schlimme, E. Determination of the dipeptide epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in transglutaminase crosslinked proteins by amino acid analysis. *Kieler Milchwirt. Forsch.* 51, 155-163, **1999**.

- Mautner, A. Enzymatische Quervernetzung von Milchproteinen durch Transglutaminase am Beispiel von Milcherzeugnissen. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2000**.
- McCue, PP, Shetty, K. Phenolic antioxidant mobilization during yoghurt production from soymilk using kefir cultures. *Process Biochem.* **40**, 1791-1797, **2005**.
- Mehanna, NM, Hefnawy, SA. Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system on the manufacture and properties of yoghurt. *Egypt. J. Dairy Sci.* **16**, 55-63, **1988**.
- Michon, T, Wang, W, Ferrasson, E, Gueguen, J. Wheat prolamine crosslinking through dityrosine formation catalyzed by peroxidases. Improvement in the modification of a poorly accessible substrate by indirect catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 449-458, **1999**.
- Miller, AG, Gerrard, JA. The *Maillard* reaction and food protein crosslinking. *Prog. Food Biopolym. Res.* **1**, 69-86, **2005**.
- Miller, KA, Hosney, RC. Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour-water doughs. *Cereal Chem.* **76**, 100-104, **1999**.
- Minussi, RC, Pastore, GM, Durán, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **13**, 205-216, **2002**.
- Miralles, B, Martínez-Rodríguez, A, Santiago, A, van de Lagemaat, J, Heras, A. The occurrence of a *Maillard*-type protein-polysaccharide reaction between  $\beta$ -lactoglobulin and chitosan. *Food Chem.* **100**, 1071-1075, **2007**.
- Mishra, S, Mann, B, Joshi, VK. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocoll.* **15**, 9-15, **2001**.
- Modler, HW, Schroder, KE, Pratt, CE. Inhibition of bacterial growth in whey by the activation of lactoperoxidase. *Bulletin of the International Dairy Federation* **332**, 32-47, **1998**.
- Molina Ortiz, SE, Puppo, MC, Wagner, JR. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolate-carrageenan systems. *Food Hydrocoll.* **18**, 1045-1053, **2004**.
- Montgomery, RE. Enzymatic powder milk. Patent des Europäischen Patentamtes **1986**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: US 4617190.
- Morales, FJ, Jiménez-Pérez, S. Free radical scavenging capacity of *Maillard* reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* **72**, 119-125, **2001**.
- Morales, FJ, Jiménez-Pérez, S. Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of *Amadori* product in milk-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3885-3890, **1998**.
- Morales, FJ, Romero, C, Jiménez-Pérez, S. Evaluation of heat-induced changes in spanish commercial milk: Hydroxymethylfurfural and available lysine content. *J. Food Sci. Technol.* **31**, 411-418, **1996**.
- Moreau, L, Kim, H-J, Decker, EA, McClements, DJ. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin-pectin membranes. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6612-6617, **2003**.

- Moreaux, V, Birlouez-Aragon, I. Degradation of tryptophan in heated  $\beta$ -lactoglobulin-lactose mixtures is associated with intense *Maillard* reaction. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1905-1910, **1997**.
- Moreno, FJ, López-Fandiño, R, Olano, A. Characterization and functional properties of lactosyl caseinmacropeptide conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5179-5184, **2002**.
- Morgan, F, Mollé, D, Henry, G, Vénien, A, Léonil, J, Peltre, G, Levieux, D, Maubois, J-L, Bouhallab, S. Glycation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Effect on the protein structure. *Int. J. Food Sci. Technol.* **34**, 429-435, **1999a**.
- Morgan, F, Vénien, A, Bouhallab, S, Mollé, D, Léonil, J, Peltre, G, Levieux, D. Modification of  $\beta$ -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: Immunochemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4543-4548, **1999b**.
- Morgan, FJ, López-Fandiño, R, Olano, A. Characterization and functional properties of lactosyl caseinmacropeptide conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5179-5184, **2002**.
- Morgan, F, Nouzille, CA, Baechler, R, Vuataz, G, Raemy, A. Lactose crystallisation and early *Maillard* reaction in skim milk powder and whey protein concentrates. *Lait* **85**, 315-323, **2005**.
- Morris, GA, Sims, IM, Robertson, AJ, Furneaux, RH. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates. *Food Hydrocoll.* **18**, 1007-1014, **2004**.
- Mounsey, JS, O'Kennedy, BT, Kelly, PM. Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Lait* **85**, 405-418, **2005**.
- Mu, M, Pan, X, Yao, O, Jiang, M. Acidic solution properties of  $\beta$ -graft-dextran copolymer prepared through *Maillard* reaction. *J. Colloid Interface Sci.* **301**, 98-106, **2006**.
- Nacka, F, Chobert, JM, Burova, T, Léonil, J, Haertlé, T. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *J. Protein Chem.* **17**, 495-503, **1998**.
- Nagaraj, RH, Shipanova, IN, Faust, FM. Protein cross-linking by the *Maillard* reaction. *J. Biol. Chem.* **271**, 19338-19345, **1996**.
- Nakada, M, Dosako, S, Hirano, R, Ooka, M, Nakajima, I. Lactoperoxidase suppresses acid production in yoghurt during storage under refrigeration. *Int. Dairy J.* **6**, 33-42, **1996**.
- Nakamura, S, Fujiki, S. Comparative studies on the glucose oxidases of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem.* **63**, 51-58, **1968**.
- Neiryck, N, van der Meeren, P, Gorbe, SB, Dierckx, S, Dewettinck, K. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocoll.* **18**, 949-957, **2004**.
- Noguchi, T, Tanimoto, H, Motoki, M, Mori, M. A promoting material for absorption of minerals and compositions containing it. Patent des Europäischen Patentamtes **1992**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: JP 04349869.
- Noguchi, T, Takano, K. Method for producing bread. Patent des Europäischen Patentamtes **2004**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: JP 2004242647.



- Norsker, M, Jensen, M, Adler-Nissen, J. Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocoll.* 14, 237-243, **2000**.
- Özer, BH, Atamer, M. Some properties of yoghurts produced from milk preserved by hydrogen peroxide. *Milchwiss.* 54, 628-631, **1999**.
- Özer, B, Grandison, A, Robinson, R, Atamer, M. Effects of lactoperoxidase and hydrogen peroxide on the rheological properties of yoghurt. *J. Dairy Res.* 70, 227-232, **2003**.
- Oliver, CM, Melton, LD, Stanley, RA. Functional properties of caseinate glycoconjugates prepared by controlled heating in 'dry' state. *J. Sci. Food Agric.* 86, 732-740, **2006a**.
- Oliver, CM, Melton, LD, Stanley, RA. Glycation of caseinate by fructose and fructo-oligosaccharides during controlled heat treatment in 'dry' state. *J. Sci. Food Agric.* 86, 722-731, **2006b**.
- O'Malley, JJ, Weaver, JL. Subunit structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem.* 11, 3527-3532, **1972**.
- Oommen, BS, McMahon, DJ, McManus, WR. A comparative study of the microstructure of caseins in dried milk. 96th American Dairy Science Association Meeting, *J. Dairy Sci.* 84 (S1), 381, **2001**.
- Østdal, H, Bjerrum, MJ, Pedersen, JA, Andersen, HJ. Lactoperoxidase-induced protein-oxidation in milk. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3939-3944, **2000**.
- Oudgenoeg, G, Hilhorst, R, Piersma, SR, Boeriu, CG, Gruppen, H, Hessing, M, Voragen, AGJ, Laane, C. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2503-2510, **2001**.
- Pan, X, Mu, M, Hu, B, Yao, P, Jiang, M. Micellization of casein-graft-dextran copolymer prepared through *Maillard* reaction. *Biopolym.* 81, 29-38, **2006**.
- Partschefeld, C, Richter, S, Schwarzenbolz, U, Henle, T. Modification of  $\beta$ -lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure. Localization of reactive glutamine residues. *Biotechnology J.* 2, 462-468, **2007**.
- Patel, MT, Kilara, A. Studies on whey protein concentrates: Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *J. Dairy Sci.* 73, 2731-2740, **1990**.
- Pazur, JH, Kleppe, K. The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem.* 3, 578-583, **1964**.
- Pearce, KN, Kinsella, JE. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716-723, **1978**.
- Pedersen, LC, Yee, VC, Bishop, PD, Le-Trong, I, Teller, DC, Stenkamp, RE. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci.* 3, 1131-1135, **1994**.
- Pedrosa, C, Trisciuzzi, C, Ferreira, ST. Effects of glycosylation on functional properties of vicillin, the 7S storage globulin from pea. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2025-2030, **1997**.

- Pellegrini, N, Re, R, Yang, M, Rice-Evans, C. Screening of dietary carotinoids and carotinoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis-3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 299, 379-389, **1999**.
- Petzke, KJ, Schuppe, S, Rohn, S, Rawel, HM, Kroll, J. Chlorogenic acid moderately decreases quality of whey proteins in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3714-3720, **2005**.
- Peyron, S, Abecassis, J, Autran, J-C, Ronan, X. Enzymatic oxidative treatment of wheat bran layers. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4694-4699, **2001**.
- Phillips, LG, Whitehead, DM, Kinsella, J. Functional properties of proteins. In: Phillips, LG, Whitehead, DM (Hrsg.). Structure-function properties of food proteins. Academic Press, San Diego, CA, **1994**.
- Poulsen, C, Bak Høstrup, P. Purification and characterization of a hexose oxidase with excellent strengthening effects in bread. *Cereal Chem.* 75, 51-57, **1998**.
- Prasad, V, Sukumaran, MV. Effect of preservation of milk on lactic count and sensory qualities of yoghurt. *J. Dairying Foods Home Sci.* 11, 65-70, **1992**.
- Prigent, SVE, Gruppen, H, Visser, AJWG, van Koningsveld, GA, de Jong, GAH, Voragen, AGJ. Effects of non-covalent interactions with chlorogenic acid on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5088-5095, **2003**.
- Prigent, SVE. Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties. PhD Thesis, Wageningen University **2005**.
- Primo-Martin, C, Valera, R, Matinez-Anaya, UA. Effect of pentosanases and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4673-4679, **2003**.
- Primo-Martin, C, Wang, M, Lichtendonk, WJ, Plijter, JJ, Hamer, RJ. An explanation for the combined effect of xylanase-glucose oxidase in dough systems. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1186-1196, **2005**.
- Rasiah, IA, Sutton, KH, Low, FL, Lin, MH, Gerrard, JA. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on breads and croissants. *Food Chem.* 89, 325-332, **2005**.
- Rawel, HM, Meidtnr, K, Kroll, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4228-4235, **2005**.
- Rawel, HM, Rohn, S, Kruse, HP, Kroll, J. Structural changes in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chem.* 78, 443-455, **2002**.
- Rodriguez-Mateos, A, Millar, SJ, Biiandari, DG, Frazier, RA. Formation of dityrosine cross-links during breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2761-2766, **2006**.
- Rojas-Graü, MA, Sobrino-López, A, Tapia, MS, Martín-Belloso, O. Browning inhibition in fresh-cut fuji-apple slices by natural antibrowning agents. *J. Food Sci.* 71, S59-S65, **2006**.
- Roos, N, Lorenzen, PC, Sick, H, Schrezenmeir, J, Schlimme, E. Cross-linking by transglutaminase changes neither in vitro proteolysis nor the in vivo digestibility of caseinate. *Kieler Milchwirt. Forsch.* 55, 261-276, **2003**.

- Rosell, CM, Wang, J, Aja, S, Bean, S, Lookhart, G. Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chem.* 80, 52-53, **2003**.
- Rufián-Henares, JA, Morales, FJ. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res. Int.* 40, 995-1002, **2007**.
- Russell, TA, Drake, MA, Gerard, PD. Sensory properties of whey and soy proteins. *J. Food Sci.* 71, S447-S455, **2006**.
- Ruttloff, H. Industrielle Enzyme. Behr's Verlag Hamburg **1994**.
- Sarkar, S, Misra, AK. Implication of the lactoperoxidase-system on manufacture of fermented milk products. *Ind. J. Dairy Sci.* 47, 133-139, **1994**.
- Sato, R, Katayama, S, Sawabe, T, Saeki, H. Stability and emulsion forming ability of water soluble fish myofibrillar protein prepared by conjugation with alginate oligosaccharide. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4376-4381, **2003**.
- Sava, van der Plancken, I, Claeys, W, Hendrickx, M. The kinetics of heat-induced structural changes of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 88, 1646-1653, **2005**.
- Scaloni, A, Perillo, V, Franco, P, Fedele, E, Froio, R, Ferrara, L, Bergamo, P. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. *Biochim. Biophys. Acta* 1598, 30-39, **2002**.
- Scaman, C, Nakai, S, Aminlari, M. Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cysteine on the level of *Maillard*-based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan and mannan. *Food Chem.* 99, 368-380, **2006**.
- Schaefer, C, Funda, E. Method for producing transglutaminase-cross-linked protein of vegetable origin, protein gels and use thereof. Patent des Europäischen Patentamtes **2004**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: US 2004241284.
- Schalink, HM, Smit, JAM. Protein-polysaccharide interactions: The determination of the osmotic second virial coefficients in aqueous solutions of  $\beta$ -lactoglobulin and dextran. *Food Hydrocoll.* 21, 1389-1396, **2007**.
- Schlimme, E, Buchheim, W. Milch und ihre Inhaltsstoffe. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, **1999**.
- Schmidt, C, Bovay, C, Frossard, P. Kinetics of formation and functional properties of conjugates prepared by dry-state incubation of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9089-9099, **2005**.
- Schooneveld-Bergmans, MEF, Dignum, MJW, Grabber, JH, Beldman, G, Voragen, AGJ. Studies on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran. *Carbohydrate Polym.* 38, 309-317, **1999**.
- Seifert, A, Rawel, HM, Kroll, J, Harding, SE. Characterization of bovine serum albumin/chlorogenic acid solution mixtures by analytical ultracentrifugation. In: Kremer, F, Richtering, W (Hrsg.). Progress in colloid and polymer science. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2004**.
- Seifu, E, Buys, EM, Donkin, EF. Effect of the lactoperoxidase system on the activity of mesophilic starter cultures in goat milk. *Int. Dairy J.* 13, 953-959, **2003**.

- Seifu, E, Buys, EM, Donkin, EF. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 137-154, **2005**.
- Sejerssen, MT, Salomonsen, T, Ipsen, R, Clark, R, Rolin, C, Engelsen, SB. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. *Int. Dairy J.* 17, 302-307, **2007**.
- Selinheimo, E, Autio, K, Kruus, K, Buchert, J. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6357-6365, **2007**.
- Sharma, R, Zakora, M, Qvist, KB. Characteristics of oil-water emulsions stabilised by an industrial  $\alpha$ -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification, by a microbial transglutaminase. *Food Chem.* 79, 493-500, **2002**.
- Shotaro, Y. Method for crosslinking proteins by using enzyme. Patent des Europäischen Patentamtes **2002**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: US 2002009770.
- Singh, H. Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 196-200, **1991**.
- Sithole, R, McDaniel, MR, Goddik, LM. Rate of *Maillard* browning in sweet whey powder. *J. Dairy Sci.* 88, 1636-1645, **2005**.
- Sondini, I, Mattas, J, Tong, PS. Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. *Int. Dairy J.* 16, 1464-1469, **2006**.
- Stahmann, MA, Spencer, AK, Honold, GR. Cross linking of proteins in vitro by peroxidase. *Biopolym.* 16, 1307-1318, **1977**.
- Sun, C, Gunasekaran, S, Richards, MP. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 21, 555-564, **2007**.
- Sun, YX, Hayakawa, S, Puangmanee, S, Izumori, K. Chemical properties and antioxidant activity of glycated  $\alpha$ -lactalbumin with rare sugar, D-allose, by *Maillard* reaction. *Food Chem.* 95, 509-517, **2006**.
- Swoboda, BEP, Massey, V. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* 240, 2209-2215, **1965**.
- Taguchi, S, Nishihama, KI, Igi, K, Ito, K, Taira, H, Motoki, M, Momose, H. Substrate specificity analysis of microbial transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates. *J. Biochem.* 128, 415-25, **2000**.
- Takasaki, S, Kato, Y, Murata, M, Homma, S, Kawakishi, S. Effects of peroxidase and hydrogen peroxide on the dityrosine formation and the mixing characteristics of wheat-flour dough. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1686-1692, **2005**.
- Tamsma, A, Tarassuk, NP. Removal of oxygen from evaporated milk with glucose oxidase. *J. Dairy Sci.* 40, 1181-1188, **1957**.
- Tang, CH, Yang, XQ, Chen, Z, Wu, H, Peng, ZY. Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase. *J. Food Biochem.* 29, 402-421, **2005**.
- Thalman, CR. Tyrosinase-induzierte Quervernetzung von Proteinen. Dissertation an der Universität Bremen. GCA-Verlag Herdecke **2003**.

- Thomas, EL, Aune, TM. Peroxidase-catalyzed oxidation of protein sulfhydryls mediated by iodine. *Biochem.* 16, 3581-3586, **1977**.
- Thomas, MEC, Scher, J, Desobry, S. Lactose/ $\beta$ -lactoglobulin interaction during storage of model whey powders. *J. Dairy Sci.* 87, 1158-1166, **2004a**.
- Thomas, MEC, Scher, J, Desobry-Banon, S, Desobry, S. Milk powders aging: Effect on physical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 297-322, **2004b**.
- Tilley, KA, Benjamin, RE, Bagorogoza, KE, Okot-Kotber, BM, Prakash, O, Kwen, H. Tyrosine cross-links. molecular basis of gluten structure and function. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2627-2632, **2001**.
- Töpel, A. Chemie und Physik der Milch. Behr's Verlag Hamburg, **2004**.
- Tokutake, H, Tatsumo, Y, Koganezawa, T, Kaneko, A, Yagi, T. Frozen dough improver and production of frozen dough using the same. Patent des Europäischen Patentamtes **1996**. <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: JP 8196200.
- Tong, LM, Sasaki, S, McClements, DJ, Decker, EA. Mechanism of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1473-1478, **2000**.
- Trespalacios, P, Pla, R. Synergistic action of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates. *Food Chem.* 104, 1718-1727, **2007**.
- Trivić, S, Leskovac, V, Zeremski, J, Vrvic, M, Winston, GW. Bioorganic mechanisms of the formation of free radicals catalyzed by glucose oxidase. *Bioorg. Chem.* 30, 95-106, **2002**.
- Trofimova, D, de Jongh, HHJ. Modification of  $\beta$ -lactoglobulin by oligofructose: Impact of protein adsorption at the air-water interface. *Langmuir* 20, 5544-5552, **2004**.
- Troyano, E, Olano, A, Matinez-Castro, I. Changes in free monosaccharides during storage of dried milk. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1543-1545, **1994**.
- Tsuge, Natsuaki, O, Ohashi, K. Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* 78, 835-843, **1975**.
- Uruakpa, FO, Arndtfield, SD. Surface hydrophobicity of commercial canola proteins mixed with k-carrageenan or guar gum. *Food Chem.* 95, 255-263, **2006**.
- van Boekel, MAJS. Effect of heating on *Maillard* reactions in milk. *Food Chem.* 62, 403-414, **1998**.
- van Boekel, MAJS. Kinetic aspects of the *Maillard* reaction: A critical review. *Nahrung* 45, 150-159, **2001**.
- van de Lagemaat, J, Silván, JM, Moreno, FJ, Olano, A, del Castillo, MD. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Res. Int.* 40, 153-160, **2007**.
- van Teeffelen, AMM, Broersen, K, de Jongh, HHJ. Glycosylation of  $\beta$ -lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics. *Protein Sci.* 14, 2187-2194, **2005**.
- Vasbinder, AJ, Alting, AC, Visschersa, RW, de Kruifa, CG. Texture of acid milk gels. Formation of disulfide cross-links during acidification. *Int. Dairy J.* 13, 29-38, **2003**.

- VDLUFA - Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (Hrsg.). VDLUFA-Methodenbücher III (**1997**), VI (**1996**) und VI (**2000**). VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- Venkatachalam, N, McMahon, DJ, Savello, PA. Role of protein lactose interactions in the age gelation of ultra-high temperature processed concentrated skim milk. *J. Dairy Sci.* 76, 1882-1894, **1993**.
- Vernullapalli, V, Hosney, RC. Glucoseoxidase effects on gluten and water solubles. *Cereal Chem.* 75, 859-862, **1998**.
- Vernulapalli, V, Miller, H, Hosney, RC. Glucoseoxidase in bread making systems. *Cereal Chem.* 75, 439-442, **1998**.
- Villamiel, M, Corzo, N. Changes in furosine, free monosaccharides and  $\beta$ -lactoglobulin during storage of dried milk products. *Milchwiss.* 55, 90-92, **2000**.
- Walstra, P, Wouters, JTM, Geurts, TJ. Dairy science and technology. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, USA, **2006**.
- Wang, M, Fan C, Xu, R. The effects of transglutaminase on functional properties of casein in milk. *J. Wuxi Univ. Light Ind.* 21, 499-502, **2002**.
- White, JW. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62, 509-514, **1979**.
- Wooster, TJ, Augustin, MA. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *Food Hydrocoll.* 21, 1072-1080, **2007**.
- Wooster, TJ, Augustin, MA.  $\beta$ -Lactoglobulin-dextran-*Maillard* conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *J. Colloid Interface Sci.* 303, 564-572, **2006**.
- Wu, X, Monnier, VM. Enzymatic deglycation of proteins. *Archives Biochem. Biophys.* 419, 16-24, **2003**.
- Yamauchi, K, Uenokawa, S, Enomoto, A, Tanimoto, H, Ohata, K, Motoki, M: Low-allergenizing agent and method for reducing allergenization. Patent des Europäischen Patentamtes **1991**, <http://ep.espacenet.com>. Patentnr.: JP 3027253.
- Yamazaki, S, Morioka, C, Itoh, S. Kinetic evaluation of catalase and peroxygenase activities of peroxygenase. *Biochem.* 43, 11546-11553, **2004**.
- Yeboah, FK, Alli, I, Yaylayan, VA. Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3164-3172, **1999**.
- Yildirim, M, Hettiarachchy, NS, Kalapathy, U. Properties of biopolymers from cross-linking whey protein isolate and soybean 11S globulin. *J. Food Sci.* 61, 1129-1132, **1996**.
- Yilmaz, Y, Toledo, R. Antioxidant activity of water-soluble *Maillard* reaction products. *Food Chem.* 93, 273-278, **2005**.
- Yokoyama, K, Nio, N, Kikuchi, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 447-454, **2004**.

Zall, RR, Chen, JH, Dzurek, DJ. Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system and farm heat treatment on the manufacturing of cottage cheese and cheddar cheese. *Milchwiss.* 38, 203-206, **1983**.

Zhu, Y, Rinzema, A, Tramper, J. Microbial transglutaminase - a review of its production and application in food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 277-282, **1995**.

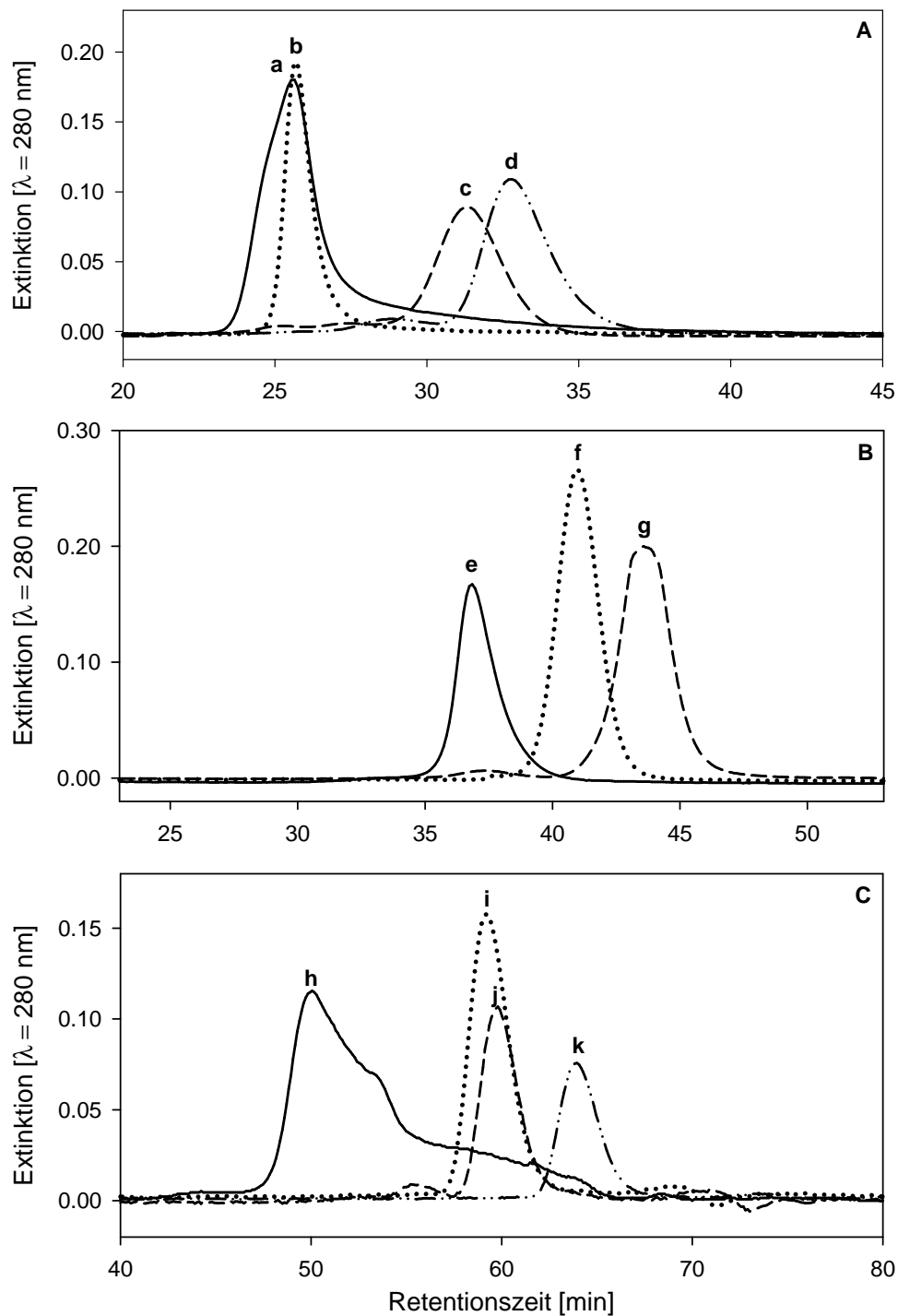
Zusatzstoffverkehrsverordnung. Verordnung über Anforderungen an Zusatzstoffe und das Inverkehrbringen von Zusatzstoffen für technologische Zwecke. Vom 19.01.1998 [BGBl. I S. 230, 269], zuletzt geändert durch die Verordnung vom 2. August **2007** (BGBl. I S. 1814).





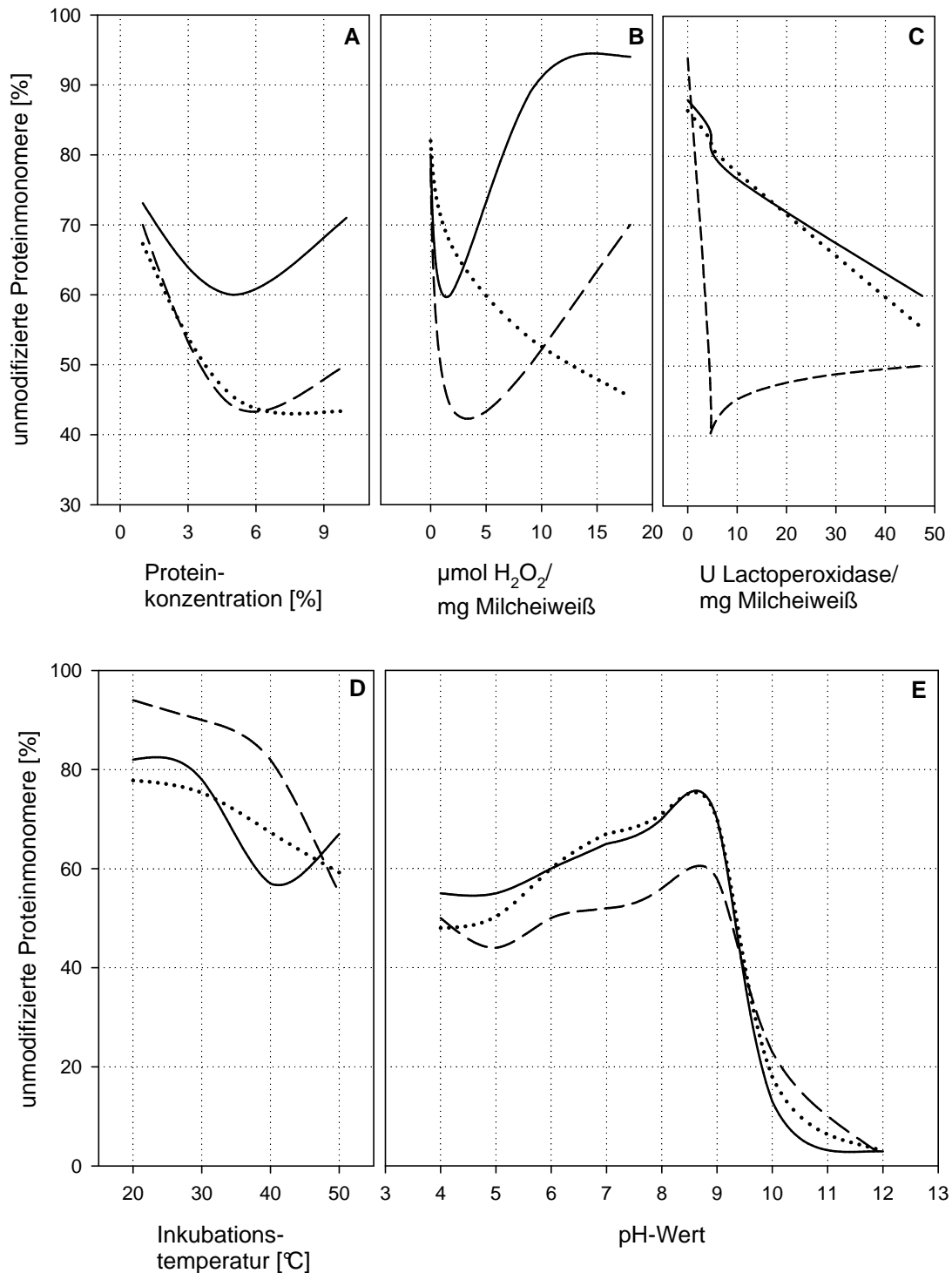
## 9. Anlagen

## 9.1. Zusätzliche Abbildungen



**Abb. A.1.** Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Referenzsubstanzen  $>2 \times 10^5 \text{ g/mol}$  (A), von  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5 \text{ g/mol}$  (B) und  $<2 \times 10^4 \text{ g/mol}$  (C)

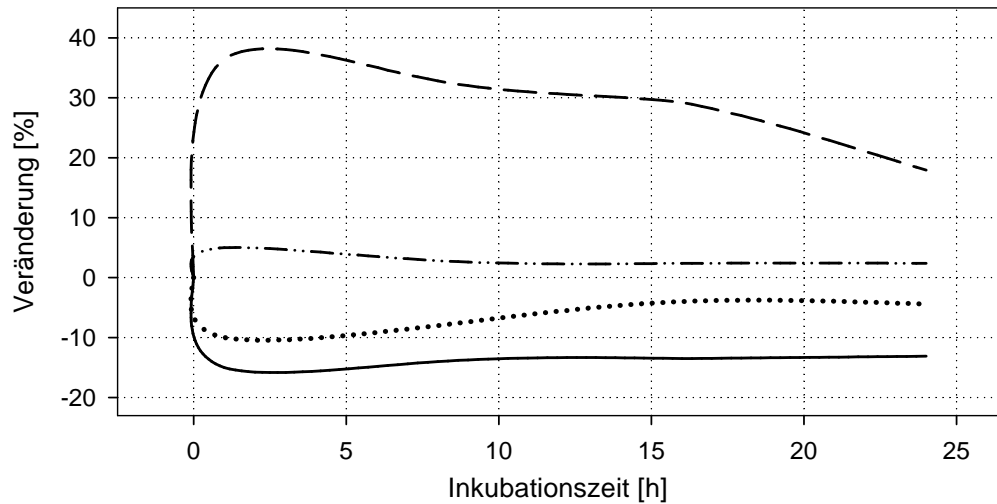
Peak a = Dextranblau [ $2 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ], Peak b = Thyroglobulin [ $6,7 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ], Peak c = Ferritin [ $4,5 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ], Peak d = Catalase [ $2,3 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ], Peak e = Aldolase [ $1,6 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ], Peak f = Ovalbumin [ $4,3 \times 10^4 \text{ g/mol}$ ], Peak g = Chymotrypsinogen [ $2,5 \times 10^4 \text{ g/mol}$ ], Peak h = Ribonuclease [ $1,3 \times 10^4 \text{ g/mol}$ ], Peak i = Aprotinin [ $6,5 \times 10^3 \text{ g/mol}$ ], Peak j = Insulin, Kette B [ $3,5 \times 10^3 \text{ g/mol}$ ], Peak k = Bradykinin [ $1,1 \times 10^3 \text{ g/mol}$ ]



**Abb. A.2.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (....) und in Gesamtmilchprotein (---) durch Inkubation mit Lactoperoxidase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC- und densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ , 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (A), von der Wasserstoffperoxidkonzentration (B), von der Enzymaktivität (C), von der Inkubationstemperatur (D) und vom pH-Wert (E)

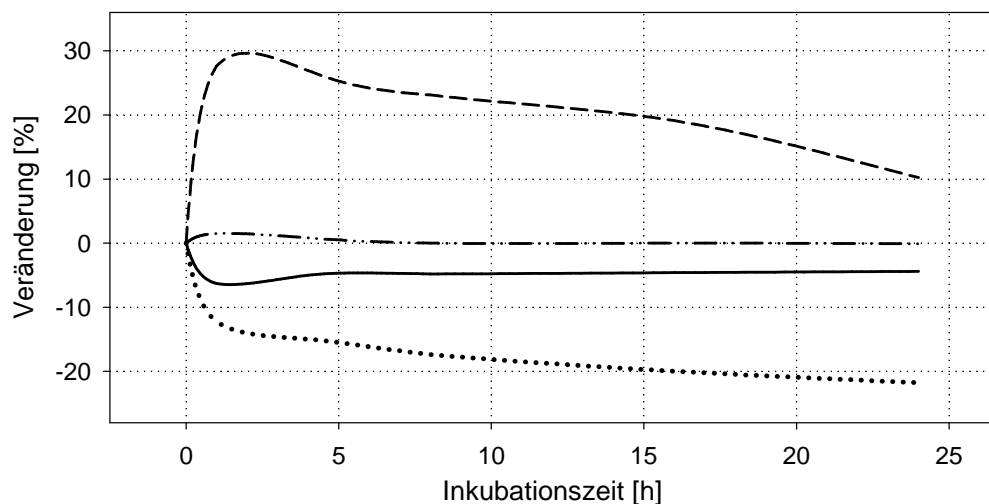


**Abb. A.3.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Lactoperoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

$\beta$ -Lactoglobulin (—),  $\alpha$ -Lactalbumin (.....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^6$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch FPLC; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und  $1,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ , 24 h, 40°C, pH 7,0

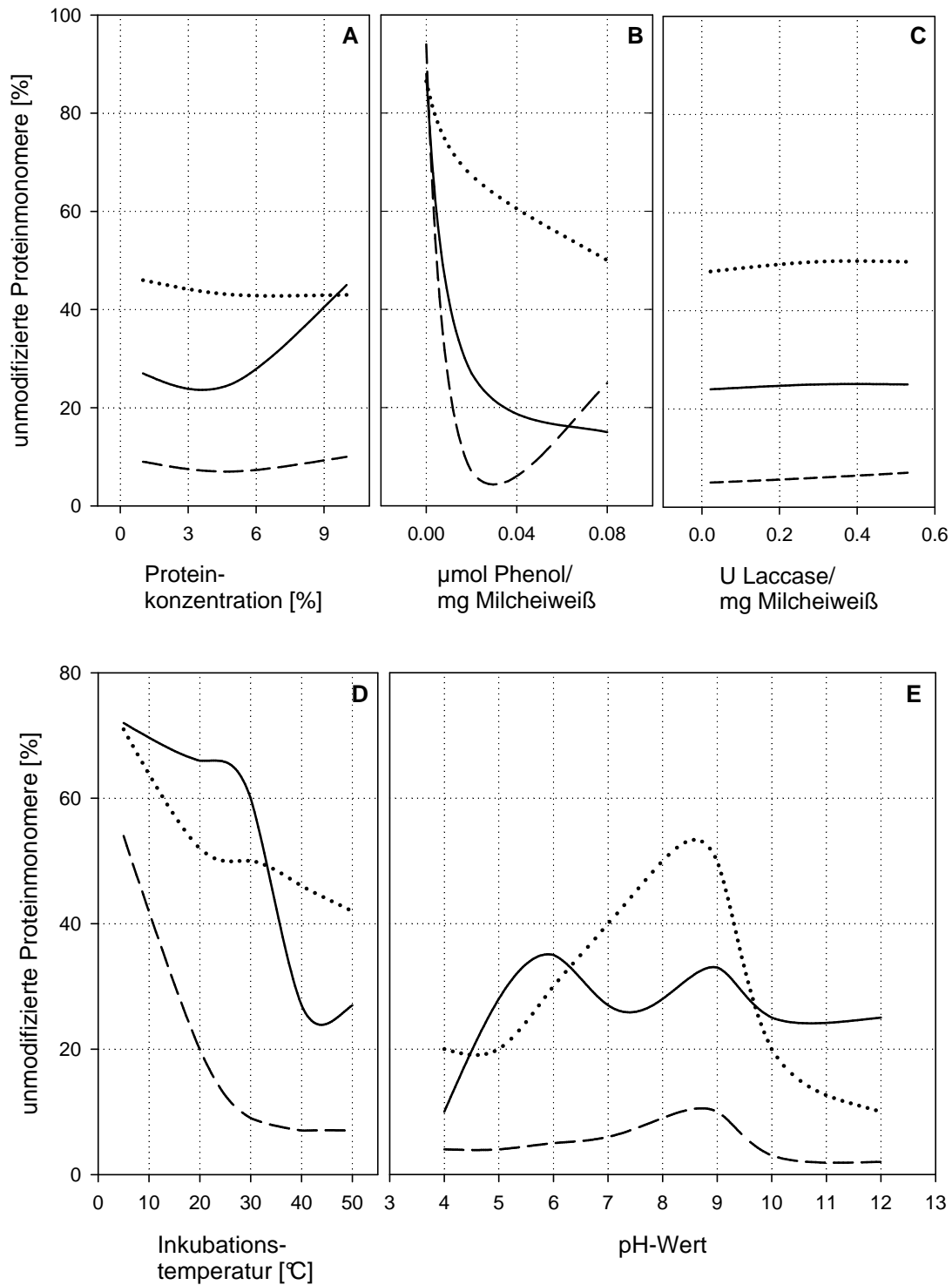


**Abb. A.4.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Lactoperoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Molkenproteinmonomere (—), Caseinmonomere (.....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

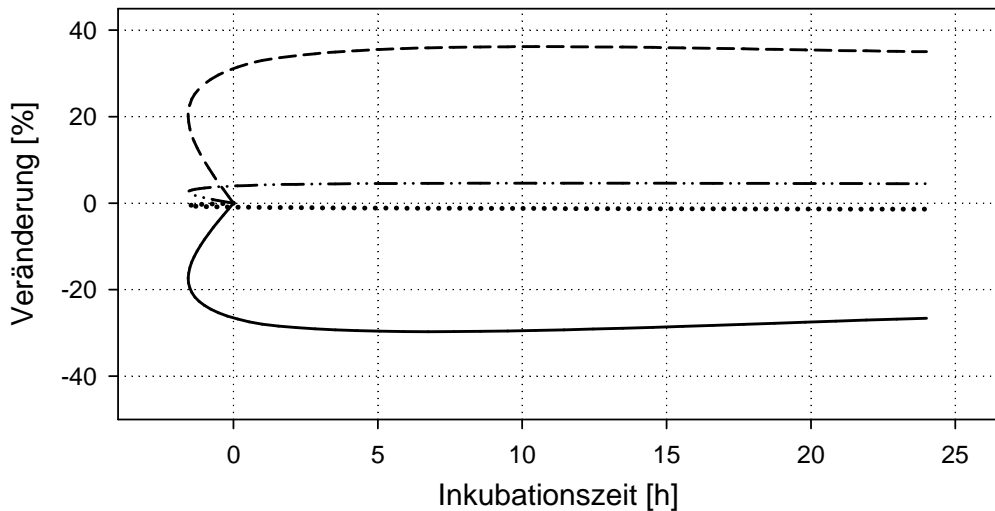
<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und  $1,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ , 24 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. A.5.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (····) und in Gesamtmilchprotein (---) durch Inkubation mit Laccase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiwei\ss (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiwei\ss und 0,02  $\mu\text{mol}$  Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (A), von der Chlorogensäurekonzentration (B), von der Enzymaktivität (C), von der Inkubationstemperatur (D) und vom pH-Wert (E)

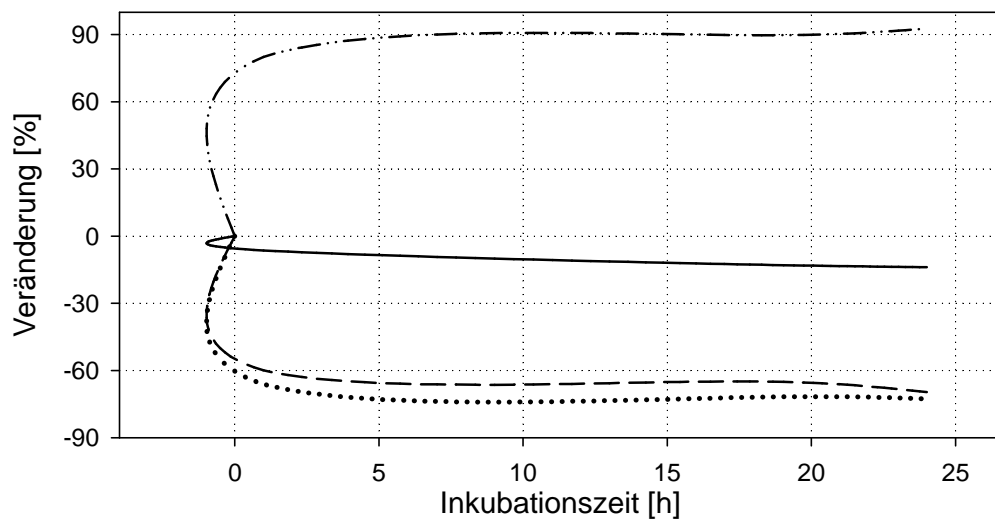


**Abb. A.6.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Molkenproteinisolat durch Inkubation mit Laccase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

$\beta$ -Lactoglobulin (—),  $\alpha$ -Lactalbumin (.....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu$ mol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

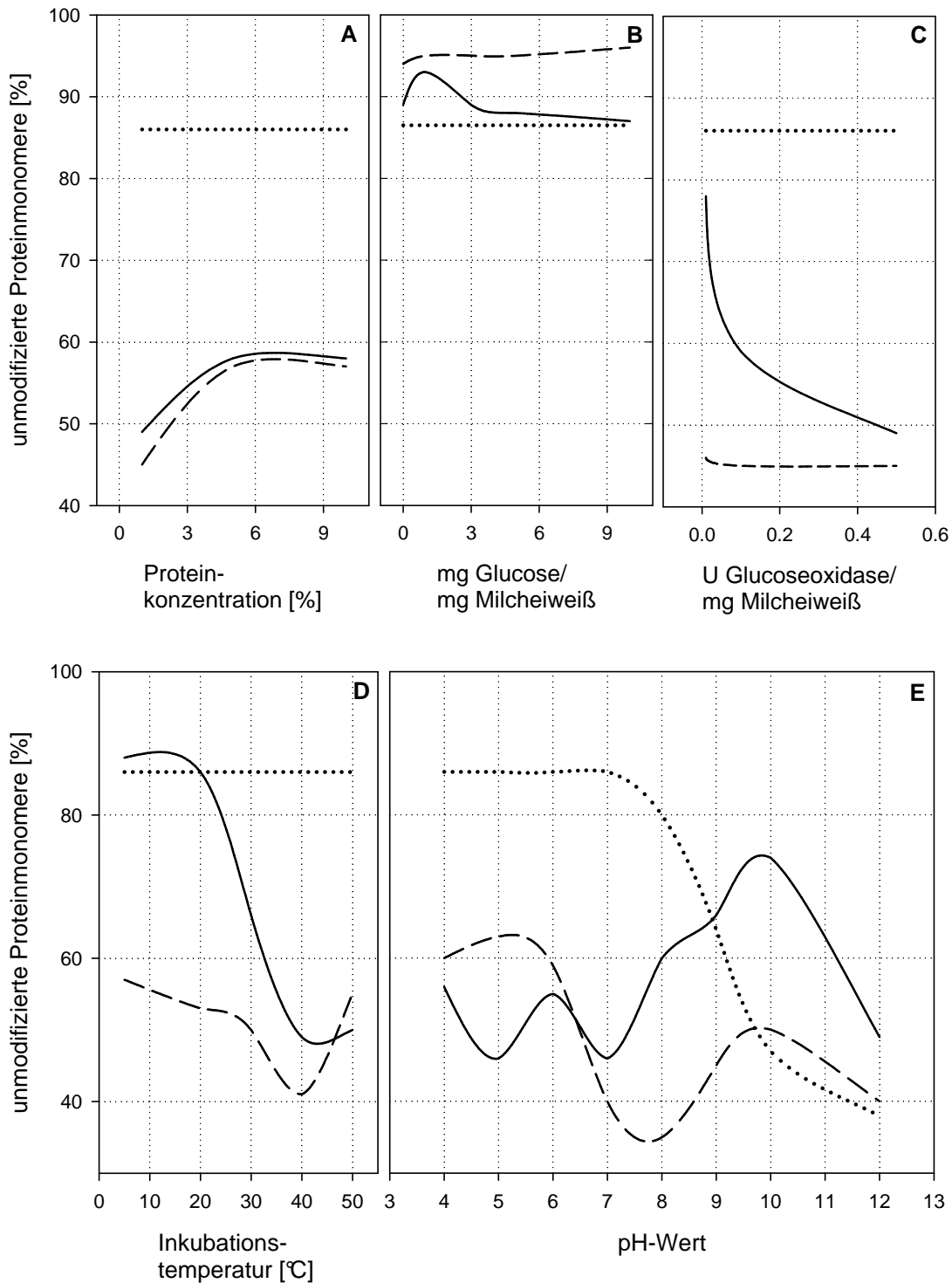


**Abb. A.7.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Laccase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Molkenproteinmonomere (—), Caseinmonomere (.....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

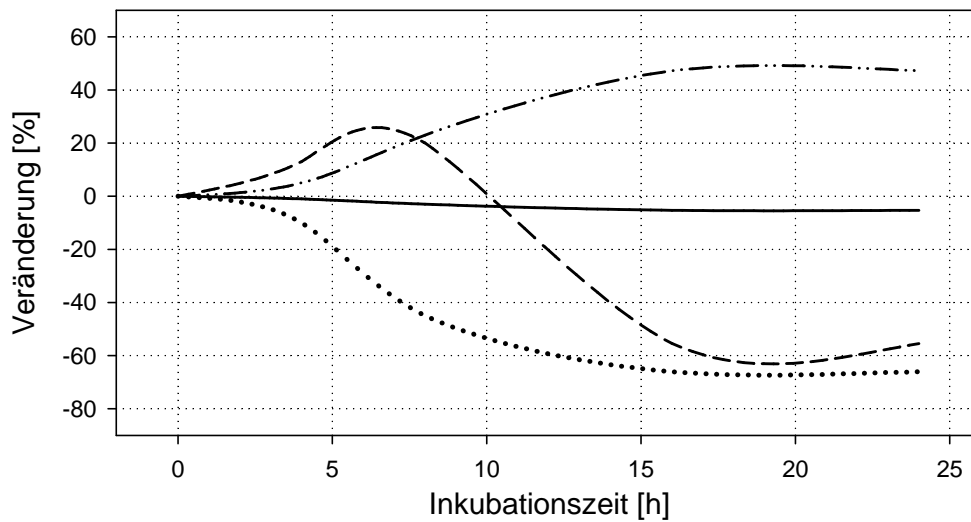
<sup>2)</sup> Inkubation von Gesamtmilcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu$ mol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. A.8.** Modifizierung von Proteinmonomeren<sup>1)</sup> in Natriumcaseinat (—), in Molkenproteinisolat (---) und in Gesamtmilchprotein (---) durch Inkubation mit Glucoseoxidase in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung, ausgehend von der Inkubation von Milcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (A), von der Glucosekonzentration (B), von der Enzymaktivität (C), von der Inkubationstemperatur (D) und vom pH-Wert (E)

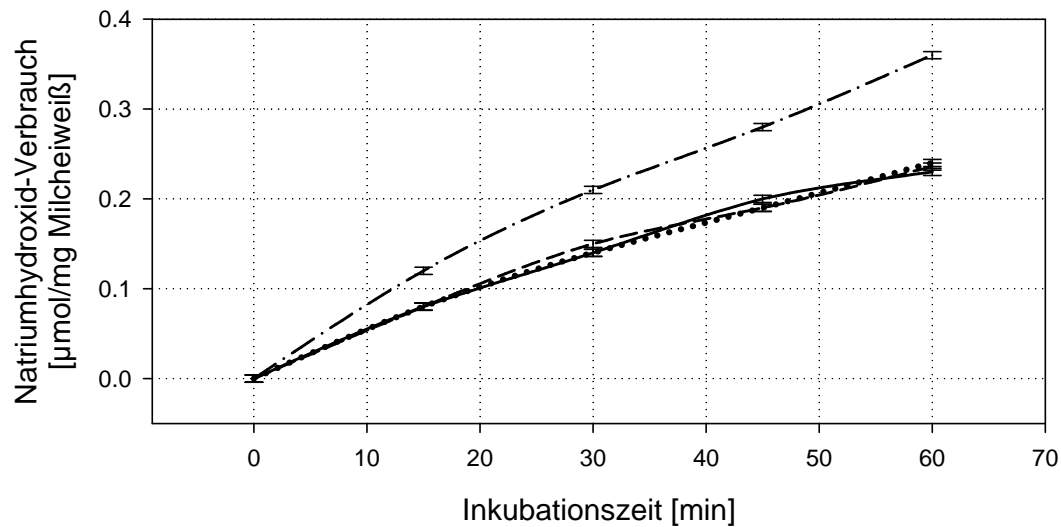


**Abb. A.9.** Veränderung der Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von Gesamtmilchprotein durch Inkubation mit Glucoseoxidase<sup>2)</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Molkenproteinmonomere (—), Caseinmonomere (....), Molmasse  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  g/mol (---), Molmasse  $> 2 \times 10^5$  g/mol (-.....)

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Gesamtmilcheiweiß (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. A.10.** Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse<sup>1)</sup> (pH-Stat) von Natriumcaseinat und von enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat

Natriumcaseinat (—), lactoperoxidasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>2)</sup> (---), laccasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>3)</sup> (•••), glucoseoxidasebehandeltes Natriumcaseinat<sup>4)</sup> (-.-.-)

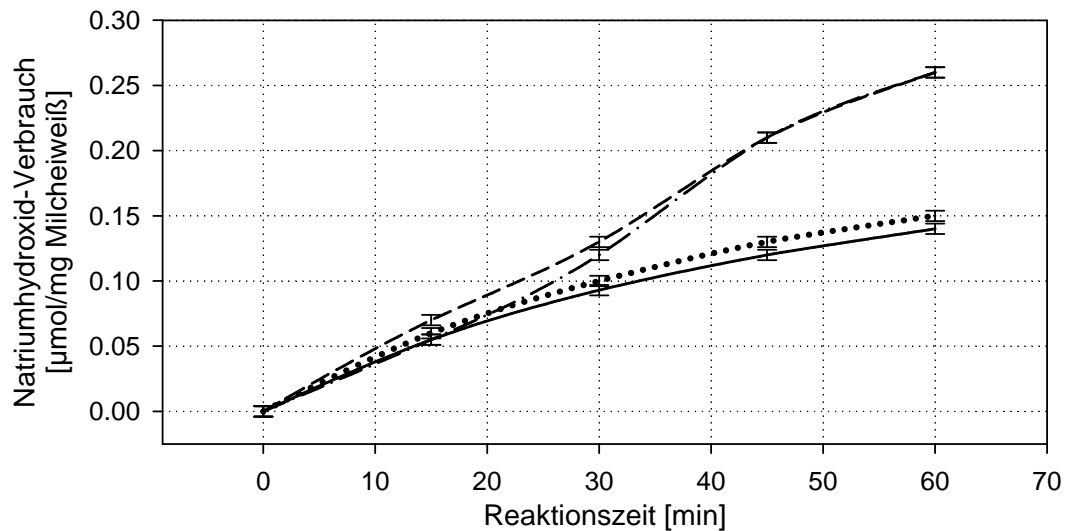
<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>3)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 16 h, 40°C, pH 6,8

<sup>4)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 6,8





**Abb. A.11.** Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse<sup>1)</sup> (pH-Stat) von Molkenproteinisolat und von enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat

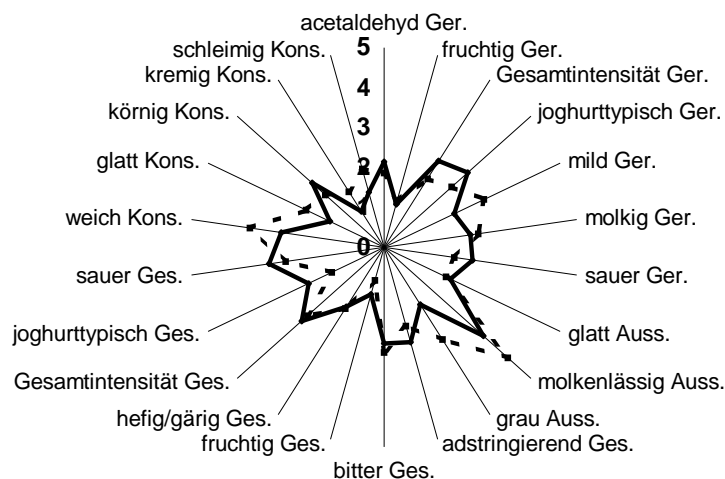
Molkenproteinisolat (—), lactoperoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (---), laccasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>3)</sup> (•••), glucoseoxidasebehandeltes Molkenproteinisolat<sup>4)</sup> (-.-.-)

<sup>1)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 18,0 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h, 50°C, pH 7,2

<sup>3)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 0,08 μmol Chlorogensäure, 1 h, 40°C, pH 7,2

<sup>4)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 40°C, pH 7,2

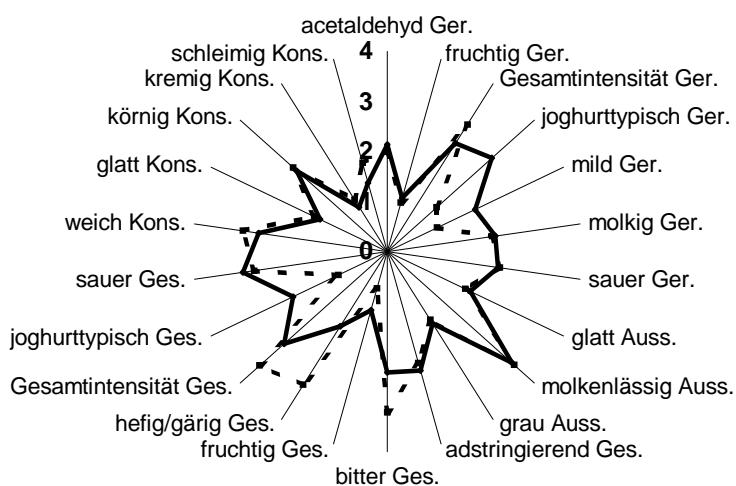


**Abb. A.12.** Sensorische Bewertung<sup>1)</sup> von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (—) und aus lactoperoxidasebehandelter Joghurtmilch<sup>2)</sup> (---)

Auss. = Aussehen, Ger. = Geruch, Ges. = Geschmack, Kons. = Konsistenz

<sup>1)</sup> Bewertung nach DIN 10967-1

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Lactoperoxidase, 8 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert

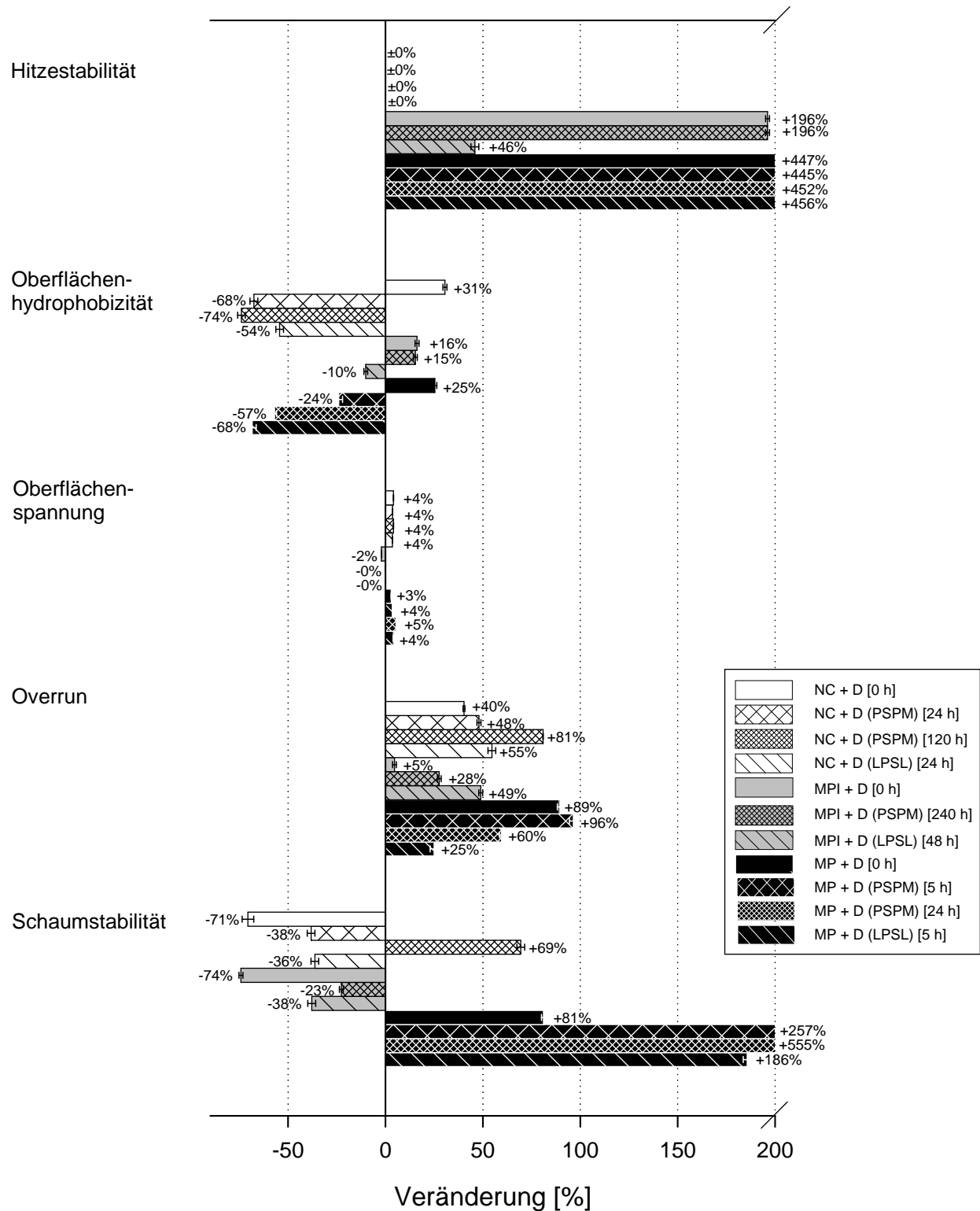


**Abb. A.13.** Sensorische Bewertung<sup>1)</sup> von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch (—) und aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch<sup>2)</sup> (---)

Auss. = Aussehen, Ger. = Geruch, Ges. = Geschmack, Kons. = Konsistenz

<sup>1)</sup> Bewertung nach DIN 10967-1

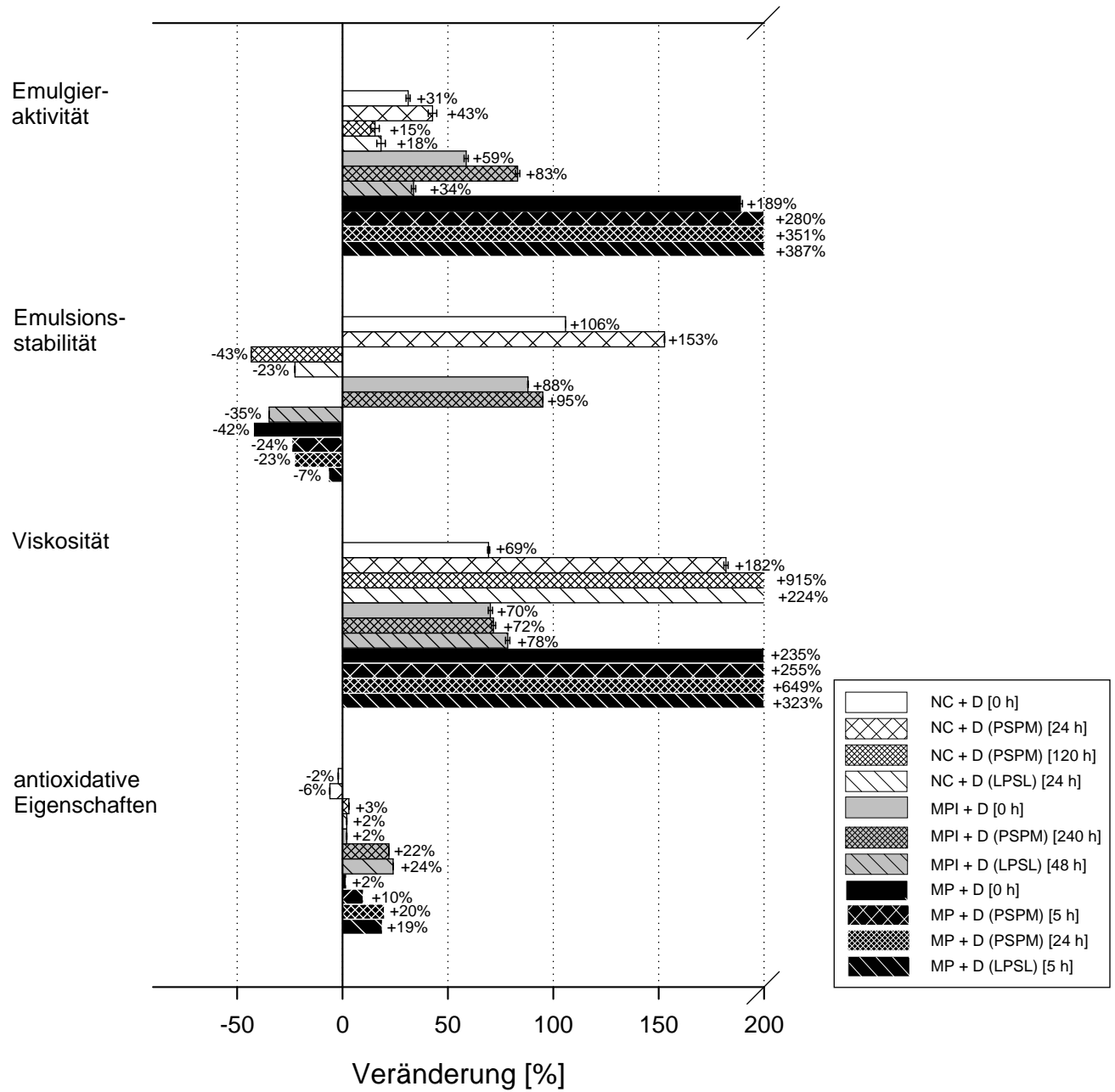
<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,05 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert



**Abb. A.14a.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Dextran [500.000 g/mol]

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D = Dextran [500.000 g/mol], PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

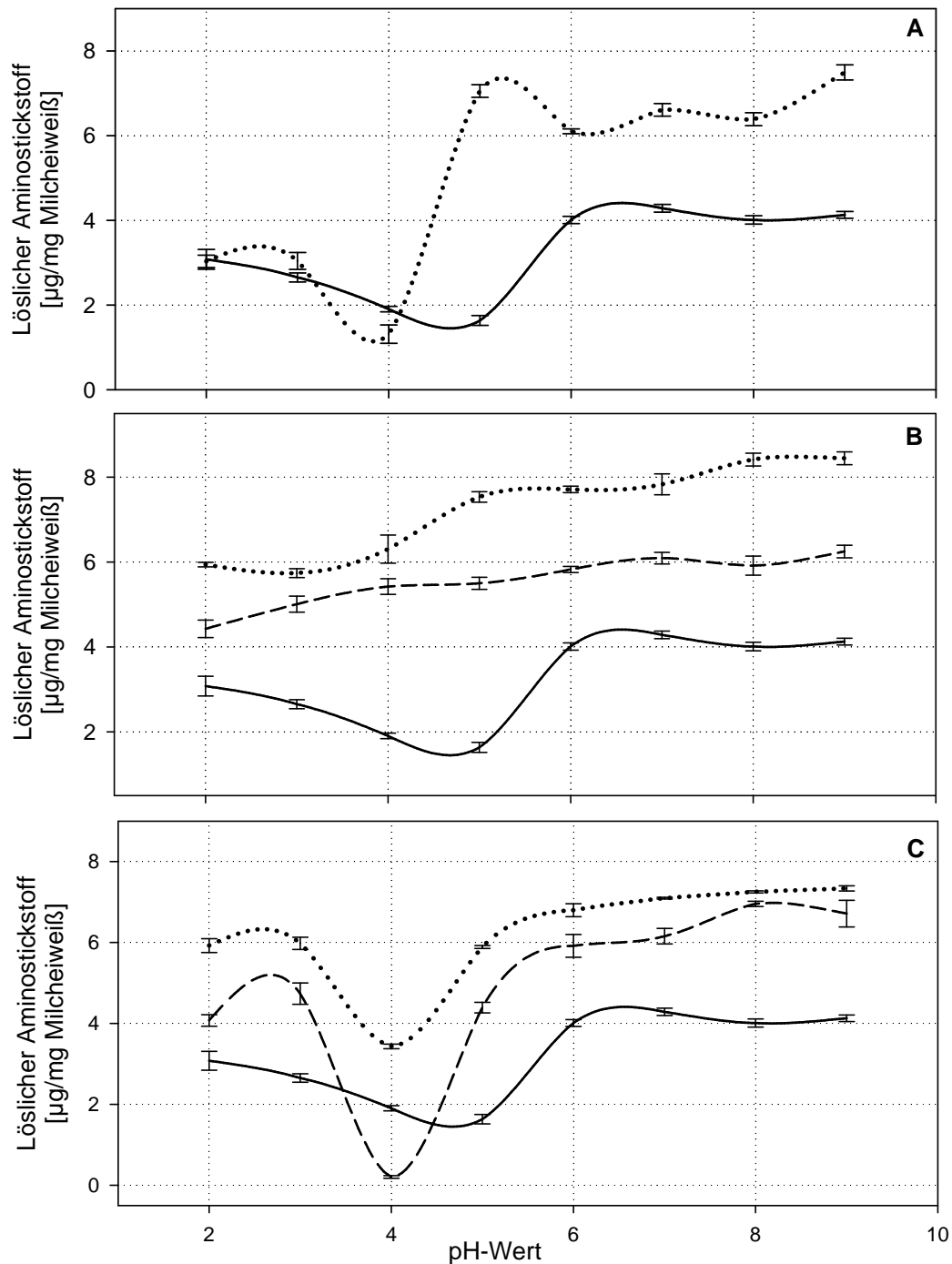
<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [500.000 g/mol] (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 240 h



**Abb. A.14b.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Milcheiweiß durch *Maillard*-Reaktion<sup>1)</sup> mit Dextran [500.000 g/mol]

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D = Dextran [500.000 g/mol], PSPM = Protein/Saccharid-Pulvermischung, LPSL = Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran [500.000 g/mol] (w/w = 1/2), 70°C, 65% r. F., 0 h - 240 h



**Abb. A.15.** Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Saccharid-Maillard-Produkten<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

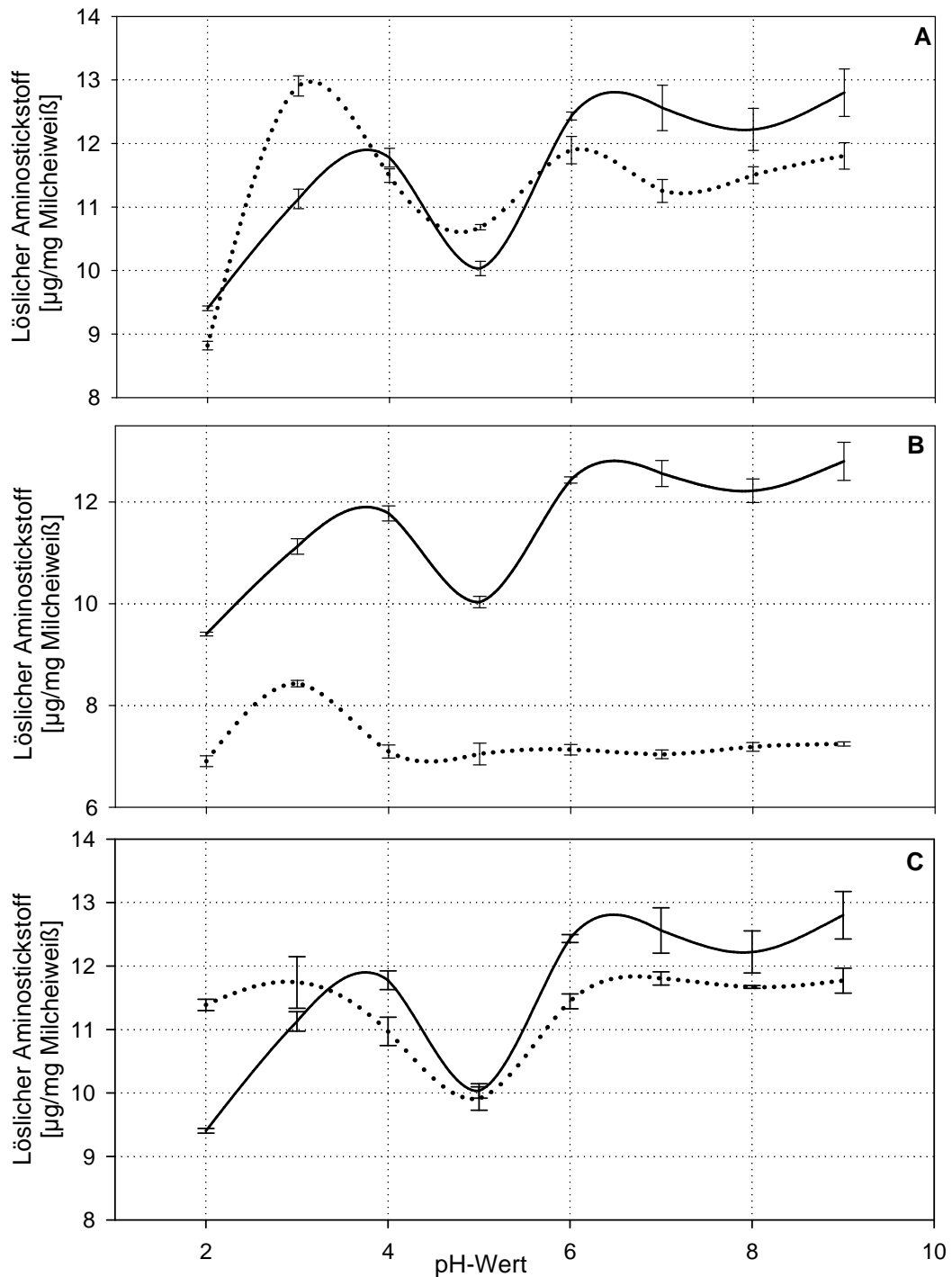
**A** = Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat (—) und von Natriumcaseinat/Lactose-Maillard-Produkten [24 h] (····)

**B** = Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat (—), von Natriumcaseinat/Pektin-Maillard-Produkten [1 h] (····) und von Natriumcaseinat/Pektin-Maillard-Produkten [4 h] (---)

**C** = Stickstofflöslichkeit von Natriumcaseinat (—), von Natriumcaseinat/Dextran-Maillard-Produkten [24 h] (····) und von Natriumcaseinat/Dextran-Maillard-Produkten [120 h] (---)

Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Natriumcaseinat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

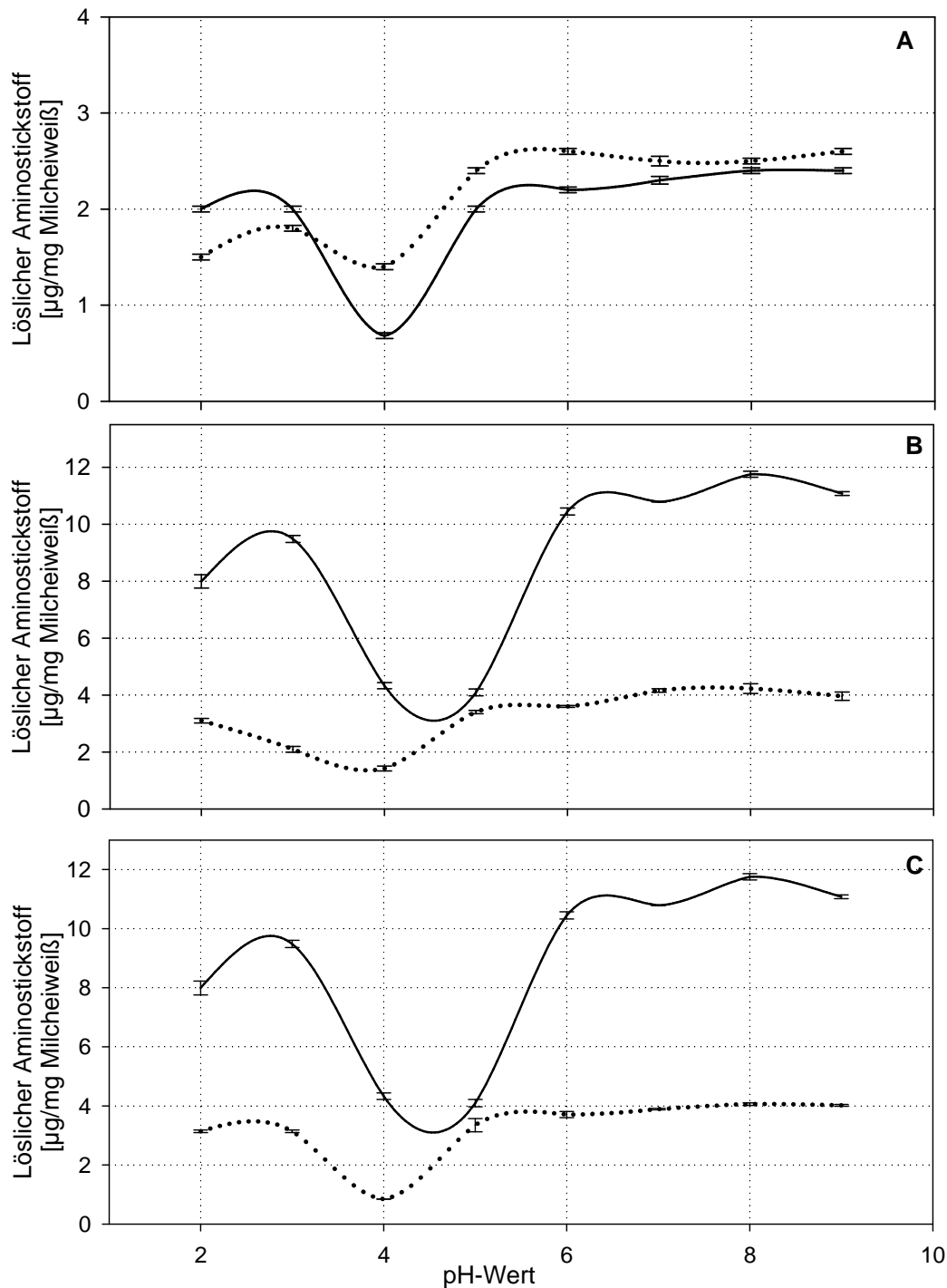


**Abb. A.16.** Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid-Maillard-Produkten<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

- A** = Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat (—) und von Molkenproteinisolat/Glucose-Maillard-Produkten [1 h] (....)  
**B** = Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat (—) und von Molkenproteinisolat/Pektin-Maillard-Produkten [5 h] (....)  
**C** = Stickstofflöslichkeit von Molkenproteinisolat (—) und von Molkenproteinisolat/Dextran-Maillard-Produkten [240 h] (....)

Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.



**Abb. A.17.** Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein und von Gesamtmilchprotein/Saccharid-Maillard-Produkten<sup>1)</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert

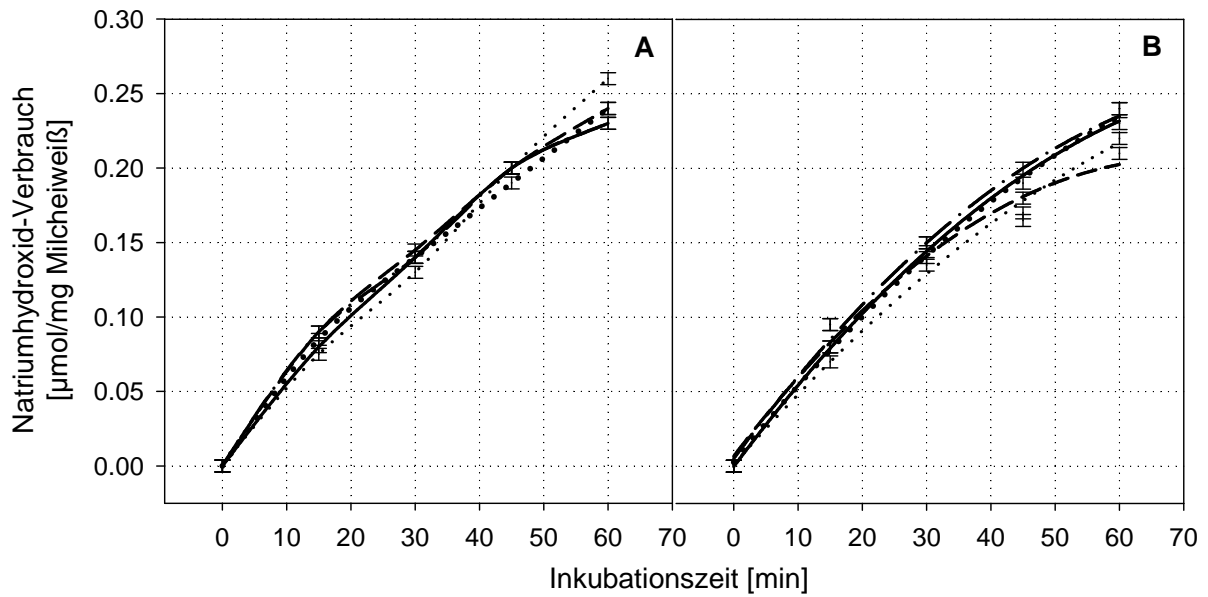
**A** = Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein (—) und von Maillard-Produkten von Gesamtmilchprotein [1 h] (····) in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver

**B** = Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein (—) und von Gesamtmilchprotein/Pektin-Maillard-Produkten [5 h] (····)

**C** = Stickstofflöslichkeit von Gesamtmilchprotein (—) und von Gesamtmilchprotein/Dextran-Maillard-Produkten [5 h] (····)

Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver oder Maillard-Reaktion von Gesamtmilchprotein mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.



**Abb. A.18.** Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse<sup>1)</sup> (pH-Stat) von Natriumcaseinat und von Natriumcaseinat/Saccharid-*Maillard*-Produkten<sup>2)</sup>

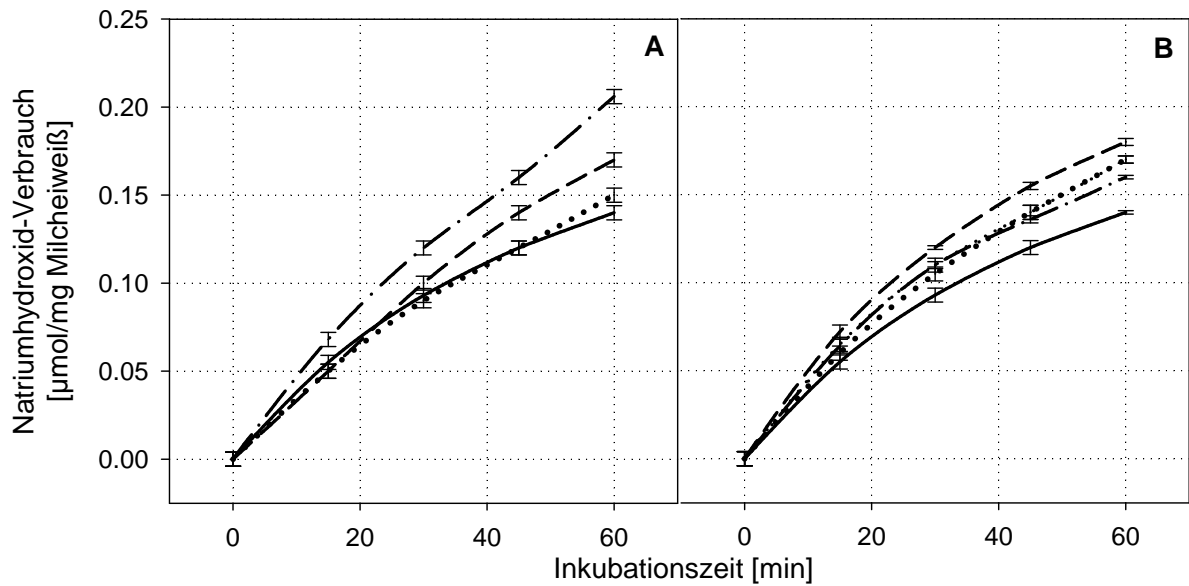
Natriumcaseinat (—), Natriumcaseinat/Glucose-*Maillard*-Produkte [1 h (**A**) oder 4 h (**B**)] (···), Natriumcaseinat/Lactose-*Maillard*-Produkte [24 h (**A**) oder 96 h (**B**)] (---), Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte [1 h (**A**) oder 4 h (**B**)] (-·-·-), Natriumcaseinat/Dextran-*Maillard*-Produkte [24 h (**A**) oder 120 h (**B**)] (···)

**A** = *Maillard*-Reaktion über kurze Erhitzungszeit, **B** = *Maillard*-Reaktion über lange Erhitzungszeit; Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Inkubation von Protein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.





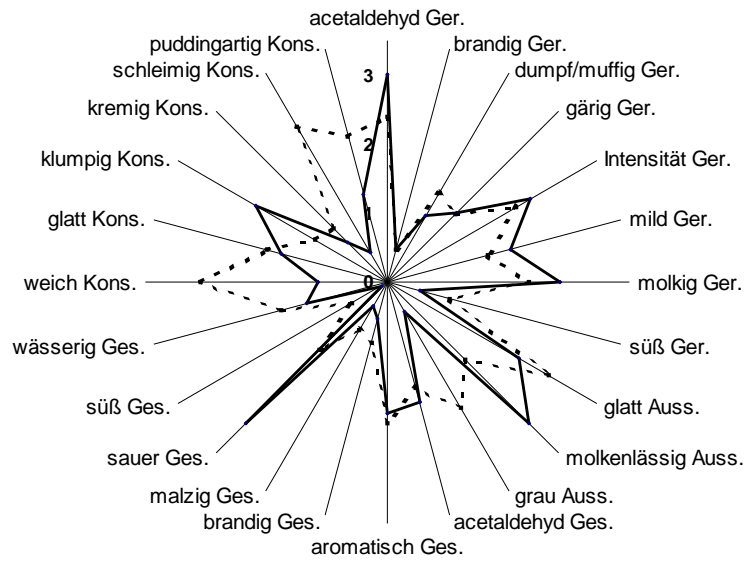
**Abb. A.19.** Verbrauch von Natriumhydroxid zur Hydrolyse<sup>1)</sup> (pH-Stat) von Molkenproteinisolat und von Molkenproteinisolat/Saccharid-*Maillard*-Produkten<sup>2)</sup>

Molkenproteinisolat (—), Molkenproteinisolat/Glucose-*Maillard*-Produkte [1 h (A) oder 4 h (B)] (---), Molkenproteinisolat/Lactose-*Maillard*-Produkte [24 h (A) oder 96 h (B)] (---), Molkenproteinisolat/Pektin-*Maillard*-Produkte [5 h (A) oder 24 h (B)] (---), Molkenproteinisolat/Dextran-*Maillard*-Produkte [240 h (B)] (●●●)

**A** = *Maillard*-Reaktion über kurze Erhitzungszeit, **B** = *Maillard*-Reaktion über lange Erhitzungszeit; Dextran = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> Inkubation von Protein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Pancreatin, E/S = 1/500, 60 min, 37°C, pH 7,8

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Molkenproteinisolat mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.



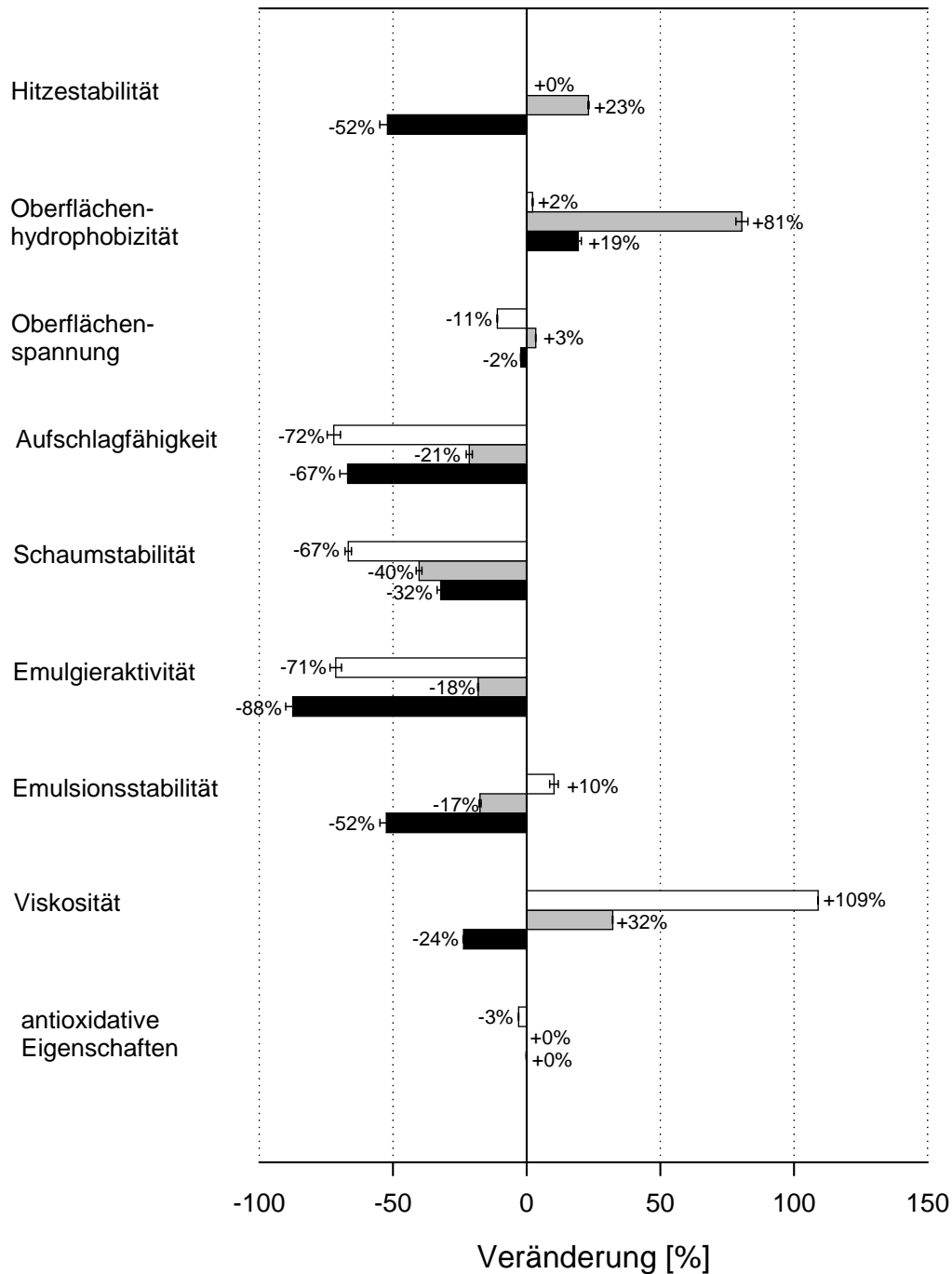
**Abb. A.20.** Sensorische Bewertung<sup>1)</sup> von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung<sup>2)</sup> durch Natriumcaseinat/Pektin-Mischung (—) oder durch Natriumcaseinat/Pektin-*Maillard*-Produkte<sup>3)</sup> (•••)

Auss. = Aussehen, Ger. = Geruch, Ges. = Geschmack, Kons. = Konsistenz

<sup>1)</sup> sensorische Bewertung nach DIN 10967-1

<sup>2)</sup> Trockenmasseerhöhung (w/w = 3%) von Joghurtmilch durch Natriumcaseinat/Pektin-Mischung (w/w = 1/2)

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Pektin (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 4 h

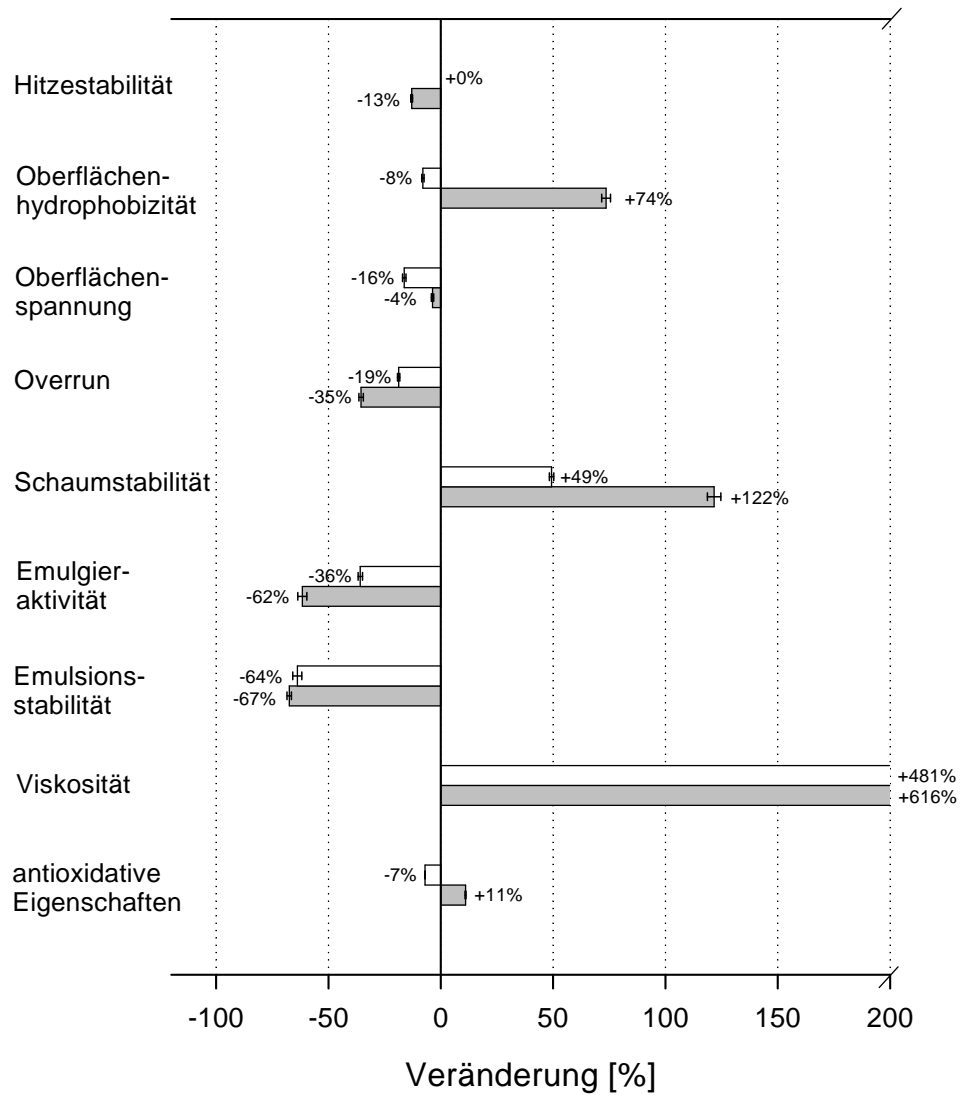


**Abb. A.21.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat<sup>1)</sup> (□), von Molkenproteinisolat<sup>2)</sup> (■) und von Gesamtmilchprotein<sup>3)</sup> (■) durch Inkubation mit Transglutaminase

<sup>1)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Transglutaminase, 0,05 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 6°C, pH 6,7

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Transglutaminase, 0,05 U/mg Milcheiweiß, 16 h, 6°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver (w/w = 5% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Transglutaminase, 0,05 U/mg Milcheiweiß, 4 h, 40°C, pH 7,0



**Abb. A.22.** Veränderung der techno-funktionellen Eigenschaften von Natriumcaseinat (□) und von Molkenproteinisolat (■) durch Erhitzung<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Erhitzung von Milcheiweißpulver bei 70°C, 65% r. F., 10 d

## 9.2. Zusätzliche Tabellen

**Tab. A.1.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Natriumcaseinat

	Monomerenfraktion [%]		
	$\alpha_S$ -Casein	$\beta$ -Casein	$\kappa$ -Casein
NC	44,0	31,1	13,9
NC + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	39,5	21,3	12,3
NC + PPO/CA <sup>3)</sup>	9,8	14,9	2,7
NC + GOX <sup>4)</sup>	13,6	4,7	3,5

NC = Natriumcaseinat, LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid, PPO/CA = Laccase/Chlorogensäure, GOX = Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu$ mol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>4)</sup> Inkubation von Natriumcaseinat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

**Tab. A.2.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Molkenproteinisolat

	Monomerenfraktion [%]	
	$\beta$ -Lactoglobulin	$\alpha$ -Lactalbumin
MPI	51,0	34,6
MPI + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	37,9	30,2
MPI + PPO/CA <sup>3)</sup>	24,4	33,2
MPI + GOX <sup>4)</sup>	51,2	33,8

MPI = Molkenproteinisolat, LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid, PPO/CA = Laccase/Chlorogensäure, GOX = Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02  $\mu$ mol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>4)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

**Tab. A.3.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in enzymatisch modifiziertem Gesamtmilchprotein

	Monomerenfraktion [%]	
	Caseinmonomere	Molkenproteinmonomere
MP	76,2	17,6
MP + LPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	54,4	13,2
MP + PPO/CA <sup>3)</sup>	3,5	3,7
MP + GOX <sup>4)</sup>	10,1	12,3

MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Lactoperoxidase/Wasserstoffperoxid, PPO/CA = Laccase/Chlorogensäure, GOX = Glucoseoxidase

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Lactoperoxidase, 47,5 U/mg Milcheiweiß und 1,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,02 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

<sup>4)</sup> Inkubation von Gesamtmilchprotein (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Glucoseoxidase<sup>mit geringer Catalaseaktivität</sup>, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 24 h, 40°C, pH 7,0

**Tab. A.4.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in unbehandeltem und in laccasebehandeltem Molkenproteinisolat in Abhängigkeit von der Chlorogensäurekonzentration

	Monomerenfraktion [%]	
	β-Lactoglobulin	α-Lactalbumin
MPI	51,0	34,6
MPI + PPO + 0,00 µmol CA/mg Milcheiweiß <sup>2)</sup>	50,8	34,5
MPI + PPO + 0,02 µmol CA/mg Milcheiweiß <sup>2)</sup>	24,4	33,2
MPI + PPO + 0,04 µmol CA/mg Milcheiweiß <sup>2)</sup>	24,0	8,6
MPI + PPO + 0,08 µmol CA/mg Milcheiweiß <sup>2)</sup>	14,3	3,0

MPI = Molkenproteinisolat, PPO = Laccase, CA = Chlorogensäure

<sup>1)</sup> ermittelt densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Inkubation von Molkenproteinisolat (w/w = 1% Protein in entmineralisiertem Wasser) mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,53 U/mg Milcheiweiß und 0,00 µmol - 0,08 µmol Chlorogensäure, 24 h, 40°C, pH 7,0

**Tab. A.5.** Techno-funktionelle Eigenschaften von unmodifiziertem Milcheiweiß

		<b>Techno-funktionelle Eigenschaften</b>			
		Mittelwert <sup>1)</sup>	±	SD	VK [%]
<b>Hitzestabilität</b> [min]	<b>NC</b>	>300,0	±	0,00	0,00
	<b>MPI</b>	127,5	±	2,84	2,23
	<b>MP</b>	49,0	±	1,11	2,27
<b>Oberflächenhydrophobizität</b> [µg SDS/500 µg Protein]	<b>NC</b>	2,65	±	0,05	1,89
	<b>MPI</b>	3,65	±	0,07	1,92
	<b>MP</b>	1,60	±	0,05	3,13
<b>Oberflächenspannung</b> [mN/m]	<b>NC</b>	49,03	±	0,13	0,27
	<b>MPI</b>	49,98	±	0,11	0,22
	<b>MP</b>	48,07	±	0,09	0,19
<b>Overrun</b> [%]	<b>NC</b>	202,7	±	2,5	1,23
	<b>MPI</b>	193,3	±	3,2	1,66
	<b>MP</b>	186,7	±	3,1	1,66
<b>Schaumstabilität</b> [min]	<b>NC</b>	144,0	±	1,0	0,69
	<b>MPI</b>	97,0	±	1,2	1,24
	<b>MP</b>	28,0	±	0,5	1,79
<b>Emulgieraktivität</b> [m <sup>2</sup> /g]	<b>NC</b>	364,7	±	2,7	0,74
	<b>MPI</b>	281,1	±	3,1	1,10
	<b>MP</b>	105,6	±	1,8	1,70
<b>Emulsionsstabilität</b> [m <sup>2</sup> /g]	<b>NC</b>	160,8	±	1,3	0,81
	<b>MPI</b>	114,9	±	2,8	2,44
	<b>MP</b>	26,7	±	0,5	1,87
<b>Viskosität</b> [mPa x s]	<b>NC</b>	4,21	±	0,01	0,24
	<b>MPI</b>	1,52	±	0,01	0,66
	<b>MP</b>	2,80	±	0,01	0,36
<b>Antioxidative Eigenschaften</b> [% Inaktivierung]	<b>NC</b>	16,1	±	0,3	1,86
	<b>MPI</b>	5,7	±	0,1	1,75
	<b>MP</b>	17,0	±	0,3	1,76

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver,  
SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

<sup>1)</sup> Stichprobenumfang n = 10

**Tab. A.6.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus laccasebehandelter Joghurtmilch

		Chemisch-physikalische Eigenschaften		
		MMJ <sup>1)</sup>	PPO-MMJ <sup>2)</sup>	PPO-MMJ <sup>3)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		158,0	135,0	140,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	33,6 ± 0,1	35,7 ± 0,2	32,3 ± 0,2
	8. Tag	42,9 ± 0,4	41,7 ± 0,2	40,0 ± 0,3
	15. Tag	44,5 ± 0,4	43,6 ± 0,2	42,2 ± 0,4
	29. Tag	45,3 ± 0,3	44,7 ± 0,3	44,6 ± 0,3
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,39	4,34	4,45
	8. Tag	4,17	4,23	4,23
	15. Tag	4,15	4,20	4,19
	29. Tag	4,12	4,18	4,17
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	29. Tag	3,1 ± 0,0	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,0
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	10,8 ± 0,2	10,4 ± 0,1	10,8 ± 0,3
	29. Tag	8,5 ± 0,3	8,5 ± 0,2	9,0 ± 0,2
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	166,4 ± 2,0	95,4 ± 6,0	164,9 ± 2,3
	8. Tag	168,3 ± 0,8	108,4 ± 0,5	162,6 ± 3,7
	15. Tag	189,6 ± 1,2	116,1 ± 0,5	177,3 ± 1,8
	29. Tag	191,6 ± 9,9	119,0 ± 4,1	184,6 ± 2,3
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	2. Tag	27,7 ± 0,5	16,9 ± 0,2	25,6 ± 0,2
	29. Tag	30,8 ± 0,1	15,4 ± 0,1	29,3 ± 0,2
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	48,3 ± 1,5	41,8 ± 1,3	43,3 ± 1,2
	8. Tag	44,8 ± 1,8	37,8 ± 2,8	42,1 ± 2,3
	15. Tag	31,9 ± 1,4	30,9 ± 2,1	32,4 ± 1,8
	29. Tag	34,7 ± 3,0	31,7 ± 4,7	34,0 ± 0,9

MMJ = Magermilchjoghurt, PPO-MMJ = Magermilchjoghurt aus laccasebehandelter Joghurtmilch

<sup>1)</sup> Inkubation von Joghurtmilch ohne Enzym, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 15 µmol Chlorogensäure, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>3)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Laccase<sup>ohne Tyrosinaseaktivität</sup>, 0,011 U/mg Milcheiweiß und 15 µmol phenolische Substanzen aus Grünteeextrakt, 2 h, 40°C, pH 7,0



**Tab. A.7.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus unbehandelter Joghurtmilch und aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch

		Chemisch-physikalische Eigenschaften	
		MMJ <sup>1)</sup>	GOX-MMJ <sup>2)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		147,0	107,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	37,6 ± 0,3	38,5 ± 0,0
	8. Tag	42,0 ± 0,3	45,1 ± 0,3
	16. Tag	43,1 ± 0,5	46,8 ± 0,3
	29. Tag	43,1 ± 0,2	49,3 ± 0,1
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,37	4,34
	8. Tag	4,16	4,08
	16. Tag	4,11	4,00
	29. Tag	4,10	3,99
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	3,4 ± 0,0	3,3 ± 0,1
	29. Tag	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	13,0 ± 0,2	11,6 ± 0,2
	29. Tag	10,1 ± 0,3	10,5 ± 0,4
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	136,4 ± 0,3	135,4 ± 1,2
	8. Tag	151,9 ± 5,8	135,1 ± 4,9
	16. Tag	155,8 ± 4,0	134,5 ± 4,0
	29. Tag	171,2 ± 4,1	138,3 ± 4,1
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	16. Tag	28,4 ± 0,5	25,0 ± 0,2
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	46,2 ± 0,2	40,4 ± 1,2
	8. Tag	45,7 ± 0,2	40,3 ± 0,1
	16. Tag	44,7 ± 0,9	43,2 ± 1,5
	29. Tag	39,3 ± 0,2	40,5 ± 0,2

MMJ = Magermilchjoghurt, GOX-MMJ = Magermilchjoghurt aus glucoseoxidasebehandelter Joghurtmilch

<sup>1)</sup> Inkubation von Joghurtmilch ohne Enzym, 2 h, 40°C, pH 7,0

<sup>2)</sup> Inkubation von Joghurtmilch mit Glucoseoxidase mit geringerer Catalaseaktivität, 0,5 U/mg Milcheiweiß, 2 h, 40°C, pH 7,0; Enzym nicht inaktiviert

**Tab. A.8.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Natriumcaseinat

	Monomerenfraktion [%]		
	$\alpha_S$ -Casein	$\beta$ -Casein	$\kappa$ -Casein
NC	44,0	31,1	13,9
NC + G [4 h]	27,9	19,0	9,5
NC + L [24 h]	15,3	24,1	9,4
NC + L [96 h]	0,0	2,9	0,3
NC + P [4 h]	23,9	16,1	7,0
NC + D40 [120 h]	2,1	5,2	5,0

NC = Natriumcaseinat, G = Glucose, L = Lactose, P = Pektin, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. A.9.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Molkenproteinisolat

	Monomerenfraktion [%]	
	$\beta$ -Lactoglobulin	$\alpha$ -Lactalbumin
MPI	51,0	34,6
MPI + G [4 h]	15,8	11,4
MPI + L [96 h]	11,3	4,2
MPI + P [24 h]	12,0	8,5
MPI + D40 [240 h]	46,9	31,7

MPI = Molkenproteinisolat, G = Glucose, L = Lactose, P = Pektin, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. A.10.** Monomerenfraktionen<sup>1)</sup> in *Maillard*-Produkten aus Gesamtmilchprotein

	Monomerenfraktion [%]	
	Caseinmonomere	Molkenproteinmonomere
MP <sub>mLH</sub>	72,5	18,2
MP <sub>mLH</sub> [4 h] <sup>2)</sup>	34,7	11,0
MP <sub>oLH</sub>	76,2	17,6
MP <sub>oLH</sub> [4 h] <sup>3)</sup>	37,1	3,8
MP <sub>oLH</sub> + P [24 h] <sup>4)</sup>	3,3	1,0
MP <sub>oLH</sub> + D40 [24 h] <sup>4)</sup>	3,5	0,3

MP<sub>mLH</sub> = Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, MP<sub>oLH</sub> = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, P = Pektin, D40 = Dextran [40.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in lactosehydrolysiertem Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

<sup>3)</sup> *Maillard*-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F.

<sup>4)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Saccharid (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. A.11.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von *Maillard*-Produkten<sup>2)</sup> aus Milcheiweiß und Dextran [500.000 g/mol]

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfaktionen [g/mol]		
	$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC + D500 [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC + D500 [120 h]	61,6	15,8	22,6
MPI + D500 [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI + D500 [240 h]	1,0	17,1	81,9
MP + D500 [0 h]	3,4	70,1	26,5
MP + D500 [240 h]	84,0	12,6	3,4

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver,  
D500 = Dextran [500.000 g/mol]

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran ( $w/w = 1/2$ ), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. A.12.** Molmassenverteilung<sup>1)</sup> von unbehandeltem und von erhitztem Milcheiweiß<sup>2)</sup>

	Reaktionsprodukte [%] in verschiedenen Molmassenfaktionen [g/mol]		
	$>2 \times 10^5$	$2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
NC [0 h]	19,0	56,8	24,2
NC [240 h]	21,3	59,6	19,1
MPI [0 h]	0,9	13,2	85,9
MPI [240 h]	2,0	19,0	79,0

NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat

<sup>1)</sup> ermittelt durch densitometrische PAGE-Auswertung; gemittelte Ergebnisse einer Doppelbestimmung

<sup>2)</sup> Erhitzung von Milcheiweißpulver bei 70°C, 65% r. F., 240 h

**Tab. A.13.** Gehalt an löslichem Aminostickstoff, an Sulfhydrylgruppen und an Hydroxymethylfurfural in *Maillard*-Produkten aus Milcheiweiß und Dextran [500.000 g/mol]

	Gehalt der Lösung an		
	löslichem Aminostickstoff [µg/mg Protein]	SH-Gruppen [µmol/g Protein]	HMF [nmol/g Pulver]
NC + D500 [0 h]	4,07 ± 0,01	0,33 ± 0,01	2,64 ± 0,05
NC + D500 [24 h] <sup>1)</sup>	8,59 ± 0,23	0,32 ± 0,02	4,48 ± 0,15
NC + D500 [120 h] <sup>1)</sup>	6,04 ± 0,11	0,32 ± 0,01	5,24 ± 0,11
NC + D500 [24 h] <sup>2)</sup>	8,51 ± 0,06	0,30 ± 0,03	12,10 ± 0,32
MPI + D500 [0 h]	12,24 ± 0,08	2,10 ± 0,03	0,00 ± 0,00
MPI + D500 [240 h] <sup>1)</sup>	11,56 ± 0,37	2,33 ± 0,04	4,40 ± 0,13
MPI + D500 [48 h] <sup>2)</sup>	12,16 ± 0,07	2,20 ± 0,03	17,29 ± 0,19
MP + D500 [0 h]	8,36 ± 0,26	0,40 ± 0,01	0,52 ± 0,02
MP + D500 [24 h] <sup>1)</sup>	3,91 ± 0,20	0,39 ± 0,02	1,08 ± 0,10
MP + D500 [120 h] <sup>1)</sup>	2,10 ± 0,48	0,38 ± 0,02	13,06 ± 0,29
MP + D500 [24 h] <sup>2)</sup>	4,19 ± 0,13	0,40 ± 0,01	17,21 ± 0,43

HMF = Hydroxymethylfurfural, NC = Natriumcaseinat, MPI = Molkenproteinisolat, MP = Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, D500 = Dextran [500.000 g/mol]

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F.

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Milcheiweiß mit Dextran (w/w = 1/2), Lyophilisat aus Protein/Saccharid-Lösung, 70°C, 65% r. F.

**Tab. A.14.** SDS-Bindung<sup>1)</sup> von Sacchariden

	SDS-Bindung		
	[µg SDS/500 µg Saccharid]		
Glucose	0,67	±	0,04
Lactose	1,56	±	0,12
Pektin	3,93	±	0,21
Dextran [40.000 g/mol]	2,25	±	0,40
Dextran [500.000 g/mol]	1,19	±	0,08

<sup>1)</sup> bestimmt nach Kato (1984) in Saccharidlösungen (w/v = 1,0 g Saccharid/l) (s. Kap. 3.2.4.2.)

**Tab. A.15.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Magermilchpulver

		Chemisch-physikalische Eigenschaften	
		J-MMP	J-MMP <sup>1)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		160,0	149,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	55,8 ± 0,3	54,3 ± 0,3
	8. Tag	63,3 ± 0,5	63,8 ± 0,2
	16. Tag	66,7 ± 0,5	65,0 ± 0,3
	29. Tag	68,8 ± 0,4	66,7 ± 0,4
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,48	4,47
	8. Tag	4,18	4,22
	16. Tag	4,14	4,18
	29. Tag	4,11	4,18
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,2
	29. Tag	4,6 ± 0,0	4,7 ± 0,1
<b>Galactose [%]</b>	2. Tag	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,0
	29. Tag	1,8 ± 0,0	1,5 ± 0,1
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	11,1 ± 0,1	12,0 ± 0,1
	29. Tag	9,2 ± 0,2	11,7 ± 0,2
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	396,7 ± 2,7	214,8 ± 2,7
	8. Tag	468,3 ± 8,2	229,3 ± 4,1
	16. Tag	501,1 ± 9,1	253,4 ± 3,2
	29. Tag	503,2 ± 9,3	261,2 ± 5,4
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	16. Tag	38,1 ± 0,24	27,9 ± 0,43
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	25,3 ± 1,7	22,0 ± 0,6
	8. Tag	24,3 ± 0,6	17,3 ± 0,4
	16. Tag	23,5 ± 0,5	15,6 ± 0,5
	29. Tag	23,2 ± 0,8	15,4 ± 1,5

J-MMP = Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung (w/w = 5%) durch Magermilchpulver

<sup>1)</sup> Maillard-Reaktion von Gesamtmilchprotein in Magermilchpulver, 70°C, 65% r. F., 4 h

**Tab. A.16.** Chemisch-physikalische Eigenschaften von Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung durch Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischungen

		Chemisch-physikalische Eigenschaften		
		J-NCL	J-NCL <sup>1)</sup>	J-NCL <sup>2)</sup>
<b>Fermentationszeit [min]</b>		173,0	166,0	143,0
<b>Säuregrad [°SH]</b>	2. Tag	44,9 ± 0,1	43,8 ± 0,2	43,3 ± 0,1
	8. Tag	52,0 ± 0,2	51,5 ± 0,1	50,8 ± 0,3
	29. Tag	52,2 ± 0,2	51,6 ± 0,3	51,5 ± 0,2
<b>pH-Wert</b>	2. Tag	4,33	4,31	4,33
	8. Tag	4,20	4,22	4,22
	29. Tag	4,16	4,17	4,19
<b>Lactose [%]</b>	2. Tag	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,0
	29. Tag	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,1
<b>Acetaldehyd [mg/kg]</b>	2. Tag	11,2 ± 0,1	11,0 ± 0,1	11,1 ± 0,1
	29. Tag	10,0 ± 0,2	10,7 ± 0,1	10,6 ± 0,2
<b>Gelstärke [mN/cm<sup>2</sup>]</b>	2. Tag	528,2 ± 3,4	533,7 ± 2,5	542,7 ± 3,3
	8. Tag	534,5 ± 4,1	539,9 ± 3,1	548,1 ± 2,7
	29. Tag	546,3 ± 4,8	560,5 ± 3,9	568,3 ± 5,1
<b>Viskosität [mPa x s]</b>	16. Tag	37,2 ± 0,2	40,2 ± 0,4	41,0 ± 0,3
<b>Molkenlässigkeit [%]</b>	2. Tag	25,3 ± 0,5	25,6 ± 0,5	24,1 ± 0,6
	8. Tag	21,5 ± 0,3	18,1 ± 0,2	21,0 ± 0,2
	29. Tag	21,3 ± 0,5	18,0 ± 0,3	20,8 ± 0,4

J-NCL = Joghurt aus Joghurtmilch mit Trockenmasseerhöhung (w/w = 3%) durch Natriumcaseinat/Lactose-Pulvermischung

<sup>1)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 4 h

<sup>2)</sup> *Maillard*-Reaktion von Natriumcaseinat mit Lactose (w/w = 1/2), Protein/Saccharid-Pulvermischung, 70°C, 65% r. F., 96 h

### 9.3. Veröffentlichung

Hiller, B, Lorenzen, PC. Effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1140-1144, **2008**.

*Received 5 April 2007; received in revised form 25 June 2007; accepted 9 July 2007*



# Effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins

Beate Hiller, Peter-Christian Lorenzen\*

*Institute of Dairy Chemistry and Technology, Federal Research Centre for Nutrition and Food, Location Kiel, Hermann-Weigmann-Straße 1, D-24103 Kiel, Germany*

Received 5 April 2007; received in revised form 25 June 2007; accepted 9 July 2007

## Abstract

The effect of borate, phosphate and tris buffer on the extent of enzymatic oligomerisation of sodium caseinate and whey protein isolate is described. The study revealed that buffer systems enhance the enzymatic oligomerisation of milk protein monomers by lactoperoxidase, lipoxygenase and  $\beta$ -galactosidase. Compared to water, higher amounts of protein polymers ( $>2 \times 10^6$  g/mol) using borate buffer and higher amounts of protein oligomers ( $2 \times 10^4$ – $2 \times 10^6$  g/mol) using phosphate or tris buffer were observed. Oligomerisation effects, which were originally attributed to the catalytic activity of enzymes, were shown to be in part the result of a complex interaction between buffer, protein and enzyme systems.

© 2007 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Enzymatic oligomerisation; Sodium caseinate; Whey protein isolate; Buffer systems

## 1. Introduction

Modifying techno-functional, sensory and tropho-functional properties of proteins by means of enzymatic oligomerisation probably belongs to the most innovative processes in food-enzyme technology in recent years. For example, transglutaminase can perform reactions like cross-linking, acyl-transfer and deamidation, whereas the polymer-forming intermolecular cross-linking seems to be the most interesting reaction regarding food processing. As a result of intermolecular cross-linking of milk proteins, polymers with maximum sizes of  $10^6$ – $10^7$  g/mol are obtained (Jaros, Partschefeld, Henle, & Rohm, 2006; Lorenzen, 2007; Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004).

Besides transglutaminase, enzyme systems like peroxidase (Aeschbach, Amado, & Neukom, 1976; Færgemand, Otte, & Qvist, 1998; Matheis & Whitaker, 1987; Stahmann, Spencer, & Honold, 1977), laccase and monoamine oxidase (Færgemand et al., 1998) as well as tyrosinase (Thalmann,

2003) have been applied. With these enzymes oligomerisation takes place by oxidation of aromatic and sulphur-containing amino acid residues and spontaneous isopeptide bonding of the oxidised protein groups (Færgemand et al., 1998; Matheis & Whitaker, 1987; Thalmann, 2003).

Enzymatic oligomerisation of proteins on laboratory scale is usually carried out in aqueous buffer systems. For applications of oxidases, buffer systems like sodium tetraborate decahydrate (Aeschbach et al., 1976), potassium phosphate (Aune & Thomas, 1977; Oudgenoeg et al., 2001; Shotaro, 2002), tris (Færgemand et al., 1998; Stahmann et al., 1977), succinate (Fonteh, Grandison, & Lewis, 2005; Mattinen et al., 2005) and sodium phosphate (Lantto, Puolanne, Kalkkinen, Buchert, & Autio, 2005; Thalmann, 2003) have been used. As enzymes and substrates are proteins, their three-dimensional structure and the catalytic activity of the oxidases depend on the buffer-mediated pH value and ionic strength. However, the effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins has not been reported yet. Therefore, the present study describes the effect of different buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins.

\*Corresponding author. Tel.: +49 4316092264; fax: +49 4316092300.  
E-mail address: [peter-christian.lorenzen@bfel.de](mailto:peter-christian.lorenzen@bfel.de) (P.-C. Lorenzen).



## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Sodium caseinate was a donation of Fonterra New Zealand's Dairy Company (Rellingen, Germany). Whey protein isolate was purchased from MILEI GmbH (Stuttgart, Germany). Analytical grade sodium tetraborate decahydrate, sodium hydrogen phosphate, tris amino methane and further chemicals used were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) from bovine milk (enzyme activity: 950 U/mg) was donated by DMV International (Veghel, Netherlands). Lipoxygenase (EC 1.12.11.12) from soy bean (enzyme activity: 11.2 U/mg) was obtained from Fluka (Buchs, Germany).  $\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23) from *Kluyveromyces lactis* (enzyme activity: 3000 LAU/ml) was a gift of Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark). Demineralised water was prepared with the Ultra Clear Water System (Barsbuettel, Germany).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Enzymatic oligomerisation of milk proteins

Sodium caseinate and whey protein isolate (w/w = 1% protein) were dissolved in demineralised water (pH 7), 0.2 mol/l sodium tetraborate decahydrate buffer (pH 9), 20 mmol/l sodium hydrogen phosphate buffer (pH 7) or 75 mmol/l tris buffer (pH 7). Enzymatic oligomerisation reactions were carried out for 24 h at 40 °C. Lactoperoxidase was applied in an amount of 47.5 U/mg milk protein together with 1.8  $\mu$ mol hydrogen peroxide. Lipoxygenase was applied in an amount of 0.56 U/mg milk protein together with 1.8  $\mu$ mol hydrogen peroxide.  $\beta$ -Galactosidase was applied in an amount of 6.0 U/mg milk protein.

#### 2.2.2. Characterisation of molar mass distribution by size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography was performed using a FPLC 2000 System (Pharmacia, Sweden) with a Superdex 200 10/300 GL column (Tricorn, No. 17517401) (buffer: 0.1 mol/l tris, 0.15 mol/l NaCl, 8 mol/l urea, pH 8.0, flow rate: 0.3 ml/min). The buffer was filtered through 0.2  $\mu$ m filters and degassed under vacuum. Samples were diluted with buffer to a final concentration of 10 mg protein/ml. After membrane filtration (0.2  $\mu$ m), 25  $\mu$ l were injected and eluted at room temperature. The absorbance of the eluate was monitored at  $\lambda = 280$  nm. Gel Filtration Calibration Kits Nos. 170441201 and 17044101 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) were used as standards.

After calibration with the gel filtration standards, the molar mass distribution of proteins and reaction products was assessed by dividing the peak area of the FPLC-chromatograms into four fractions: (a)  $>2 \times 10^6$  g/mol, (b)  $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$  g/mol, (c)  $2 \times 10^4$ – $2 \times 10^5$  g/mol and (d)  $<2 \times 10^4$  g/mol (see Fig. 1). The amount of each molar mass fraction was defined as the relation between the

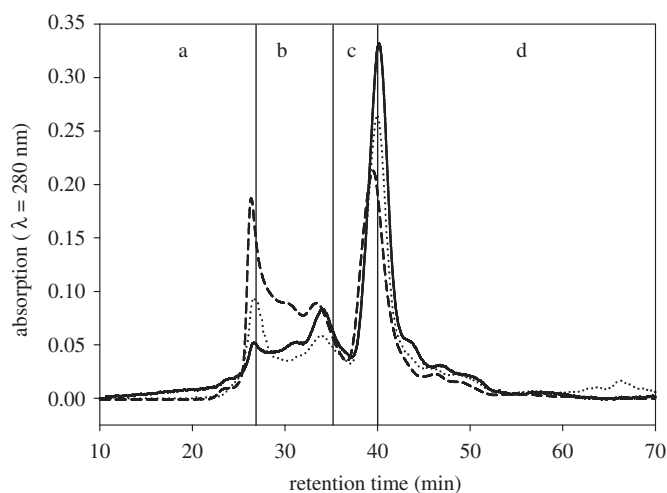


Fig. 1. Size exclusion chromatograms of sodium caseinate (—) and its reaction products prepared by lactoperoxidase (47.5 U/mg sodium caseinate and 1.8  $\mu$ mol hydrogen peroxide, 40 °C, 24 h) in demineralised water (···) or in borate buffer (---); area a =  $>2 \times 10^6$  g/mol, area b =  $2 \times 10^5$  to  $2 \times 10^6$  g/mol, area c =  $2 \times 10^4$  to  $2 \times 10^5$  g/mol, area d =  $<2 \times 10^4$  g/mol.

area of the fraction and the sum of the peak areas of the chromatogram expressed in percent (%). The coefficient of variation in the present studies was between 0.1% and 1.0%.

## 3. Results and discussion

The molar mass distribution of the reaction products prepared from sodium caseinate and whey protein isolate by lactoperoxidase in demineralised water (pH 7) or different buffer systems is given in Table 1. It can be seen that the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins is influenced by the buffer system applied. Using borate buffer instead of water, a sodium caseinate incubation with lactoperoxidase leads to a distinctly higher quantity of polymers with a molar mass  $>2 \times 10^6$  g/mol and in the range of  $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$  g/mol. This is also diagrammed in Fig. 1. Lactoperoxidase treatment of sodium caseinate using phosphate buffer and tris buffer, however, leads to a decrease of the fraction of polymers (molar mass  $>2 \times 10^6$  g/mol), while an increased portion of protein  $<2 \times 10^4$  g/mol was detected. Regarding lactoperoxidase-treated whey protein isolate it can be seen from Table 1 that an enhanced portion of oligomers with a molar mass between  $2 \times 10^4$  and  $2 \times 10^5$  g/mol is generated if borate, phosphate and tris buffer are used. The fraction of whey protein monomers (molar mass  $<2 \times 10^4$  g/mol) is distinctly lowered. Using borate buffer instead of water, an incubation of whey protein with lactoperoxidase leads to a slightly higher quantity of polymers with molar masses  $>2 \times 10^6$  g/mol.

Table 2 reveals that the incubation of sodium caseinate with lipoxygenase also leads to a significantly higher extent of polymers with a molar mass  $>2 \times 10^6$  g/mol and in the

Table 1

Molar mass distribution of the reaction products of sodium caseinate (SC) and whey protein isolate (WPI) prepared by lactoperoxidase (LPO) in demineralised water, borate buffer, phosphate buffer or tris buffer

Protein	Enzyme	Buffer	Reaction products (%) in different molar mass ranges (g/mol)			
			$>2 \times 10^6$	$2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$	$2 \times 10^4$ – $2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
SC	–	Water	16.9	12.4	22.7	48.0
SC	LPO <sup>a</sup>	Water	18.9	11.4	27.1	42.6
SC	LPO <sup>a</sup>	Borate	25.3	28.1	24.5	22.1
SC	LPO <sup>a</sup>	Phosphate	4.7	19.2	19.5	56.6
SC	LPO <sup>a</sup>	Tris	4.0	27.1	19.6	49.3
WPI	–	Water	6.7	3.6	5.1	84.6
WPI	LPO <sup>a</sup>	Water	6.5	12.4	10.9	70.2
WPI	LPO <sup>a</sup>	Borate	9.0	10.9	18.3	61.8
WPI	LPO <sup>a</sup>	Phosphate	5.3	9.8	20.4	64.5
WPI	LPO <sup>a</sup>	Tris	1.0	9.8	32.4	56.8

<sup>a</sup>47.5 U/mg milk protein and 1.8 μmol hydrogen peroxide, 40 °C, 24 h.

Table 2

Molar mass distribution of the reaction products of sodium caseinate (SC) and whey protein isolate (WPI), prepared by lipoxygenase (LOX) and β-galactosidase (GAL) in demineralised water or borate buffer

Protein	Enzyme	Buffer	Reaction products (%) in different molar mass ranges (g/mol)			
			$>2 \times 10^6$	$2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$	$2 \times 10^4$ – $2 \times 10^5$	$<2 \times 10^4$
SC	LOX <sup>a</sup>	Water	18.7	12.2	26.7	42.4
SC	LOX <sup>a</sup>	Borate	41.2	27.0	10.4	21.4
SC	GAL <sup>b</sup>	Water	13.4	8.6	5.9	72.1
SC	GAL <sup>b</sup>	Borate	13.1	20.8	15.6	50.5
WPI	LOX <sup>a</sup>	Water	7.5	11.9	9.7	70.9
WPI	LOX <sup>a</sup>	Borate	7.6	10.9	19.6	61.9
WPI	GAL <sup>b</sup>	Water	11.2	4.3	4.2	80.3
WPI	GAL <sup>b</sup>	Borate	37.7	14.5	11.5	36.4

<sup>a</sup>0.56 U/mg milk protein and 1.8 μmol hydrogen peroxide, 40 °C, 24 h.

<sup>b</sup>6.0 U/mg milk protein, 40 °C, 24 h.

range of  $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$  g/mol, if borate buffer is used instead of water. Using β-galactosidase in borate buffer leads to increased amounts of oligomers with a molar mass between  $2 \times 10^4$  and  $2 \times 10^6$  g/mol, but not of polymers ( $>2 \times 10^6$  g/mol).

Regarding whey proteins as substrate, the situation is vice versa. In borate buffer lipoxygenase produces more whey protein oligomers of  $2 \times 10^4$ – $2 \times 10^5$  g/mol than in water. With β-galactosidase in borate buffer distinctly higher amounts of polymers with molar masses  $>2 \times 10^6$  g/mol and in the range of  $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$  g/mol are generated. This can also be seen in Fig. 2.

The results show that the extent of enzymatic oligomerisation depends on whether buffer systems or water are applied. Oligomerisation reactions, attributed solely to the catalytic activity of enzymes, may at least in part be due to the buffer system applied. This matter of fact may partly explain different results of the extent of enzymatic oligomerisation using the same substrate proteins as reported in literature. For example, Færgemand et al. (1998) achieved a lower extent of protein oligomerisation

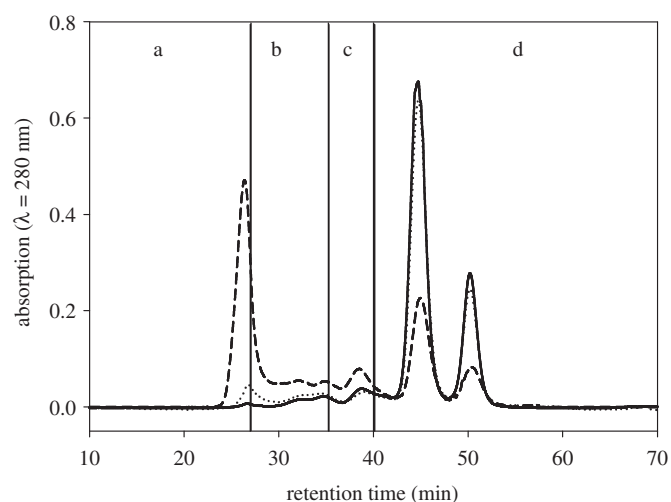


Fig. 2. Size exclusion chromatograms of whey protein isolate (—) and its reaction products prepared by β-galactosidase (6.0 U/mg whey protein isolate, 40 °C, 24 h) in demineralised water (···) or in borate buffer (---); area a =  $>2 \times 10^6$  g/mol, area b =  $2 \times 10^5$  to  $2 \times 10^6$  g/mol, area c =  $2 \times 10^4$  to  $2 \times 10^5$  g/mol, area d =  $<2 \times 10^4$  g/mol.

by laccase using tris buffer than Shotaro (2002) did using potassium phosphate buffer. Using different buffer systems also resulted in different techno-functional properties of the reaction products. Thus, Færgemand et al. (1998) found only a slight increase in viscosity of whey protein solutions after laccase treatment, while Shotaro (2002) reported about highly viscous and gelling protein solutions using the same enzyme system. Similarly, Aeschbach et al. (1976) described higher extents of dityrosine formation and protein cross-linking using peroxidase in borate buffer than Færgemand et al. (1998) did using tris buffer. Fonteh et al. (2005) observed a higher lactoperoxidase activity in phosphate buffer compared to succinate or citrate buffer.

Enhanced enzymatic oligomerisation of proteins in borate buffer may partly be due to reactions like protein unfolding, disulphide bond formation, hydrogen abstraction, addition and condensation as a result of the alkaline pH used during incubation (Asquith & Otterburn, 1977; Færgemand et al., 1998; Finley & Friedman, 1977; Friedman, 1973; Mehrens & Reimerdes, 1991). Working near the isoelectric point of lactoperoxidase (pH 9.6) in borate buffer (pH 9) may also alter the enzyme specificity. However, that the enhanced enzymatic protein oligomerisation in borate buffer is not just due its pH value was shown in previous investigations of borate buffer systems with different pH values. It was observed that the formation of sodium caseinate polymers  $>2 \times 10^6$  g/mol by lactoperoxidase in borate buffer increased by 8.4% at pH 9 (Table 1), by 7.9% at pH 8 and by 6.5% at pH 7.

Besides the oligomerisation of proteins by enzymes in buffer systems, we also observed a distinct protein oligomerisation in buffer systems without enzyme addition as displayed for sodium caseinate in borate buffer in relation to demineralised water (Fig. 3, areas a and b). Parker and Bearn (1963), Noguchi (1960), Kossmann,

Fainer, and Boyer (1964) and Taler, Navon, and Becker (1998) support these findings as they report about the formation of complexes between borate buffer and proteins. A polymerisation of haemoglobin molecules in phosphate buffer without enzyme addition was described by Chen, Ballas, Hantgan, and Kim-Shapiro (2004). Furthermore, Bell and Wetzel (1995) and Huang, Chen, and Ho (2001) outlined the ability of phosphate buffer ions to act as bifunctional catalysts. Bifunctional catalysts like hydrogen phosphate were described to perform protein oligomerisation reactions (Singh, 1991) through their ability to donate and to accept protons.

#### 4. Conclusion

The study revealed that higher extents of enzymatic oligomerisation/polymerisation of proteins are obtained when buffer systems are used instead of water. Oligomerisation effects, which were reported to be due to the catalytic activity of enzymes, were shown to be (in part) the result of a complex interaction of buffer, protein and enzyme system. The observed effects, also opening possibilities of controlled molar mass-adjustment, have to be considered in the development and upgrading of techno-functional ingredients from laboratory to industrial scale in the field of food-enzyme technology.

#### References

- Aeschbach, R., Amado, R., & Neukom, H. (1976). Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochimica Biophysica Acta*, 439, 292–301.
- Asquith, R. S., & Otterburn, S. (1977). Cystein-alkali reactions in relation to protein crosslinking. In M. Friedman (Ed.), *Protein crosslinking—Nutritional and medical consequences*. New York, London: Plenum Press.
- Aune, T. M., & Thomas, E. L. (1977). Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Biochemistry*, 17(6), 1005–1010.
- Bell, L. N., & Wetzel, C. R. (1995). Aspartame degradation in solutions as impacted by buffer type and concentration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2608–2612.
- Chen, K., Ballas, S. K., Hantgan, R. R., & Kim-Shapiro, D. B. (2004). Aggregation of normal and sickle hemoglobin in high concentration phosphate buffer. *Biophysical Journal*, 87, 4113–4121.
- Færgemand, M., Otte, J., & Qvist, B. (1998). Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(4), 1326–1333.
- Finley, J. W., & Friedman, M. (1977). New amino acid derivatives formed by alkaline treatment of proteins. In M. Friedman (Ed.), *Protein crosslinking—Nutritional and medical consequences*. New York, London: Plenum Press.
- Fonteh, F. A., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2005). Factors affecting lactoperoxidase activity. *International Journal of Dairy Technology*, 58(4), 233–236.
- Friedman, M. (1973). *The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins*. Oxford, NY: Pergamon Press.
- Huang, T.-C., Chen, M.-H., & Ho, T.-C. (2001). Effect of phosphate on the stability of pyridoxal in the presence of lysine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(3), 1559–1563.

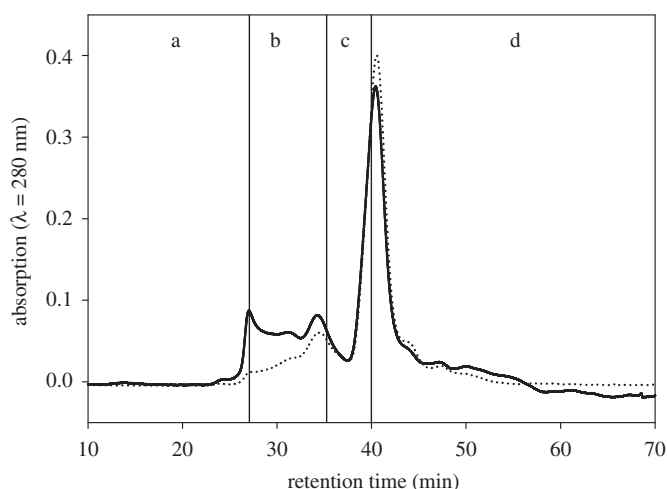


Fig. 3. Size exclusion chromatograms of sodium caseinate in borate buffer (—) or in demineralised water (···) without enzyme addition (40 °C, 24 h); area a =  $>2 \times 10^6$  g/mol, area b =  $2 \times 10^5$  to  $2 \times 10^6$  g/mol, area c =  $2 \times 10^4$  to  $2 \times 10^5$  g/mol, area d =  $<2 \times 10^4$  g/mol.

- Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113–155.
- Kossmann, R. J., Fainer, D. C., & Boyer, S. H. (1964). A study of myoglobin in disease with comments concerning the myoglobin minor components. *Cold Spring Harbour Symposium of Quantative Biology*, 29, 375–385.
- Lantto, R., Puolanne, E., Kalkkinen, N., Buchert, J., & Autio, K. (2005). Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: Effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(23), 9231–9237.
- Lorenzen, P. C. (2007). Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. *Food Research International*, 40(6), 700–708.
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1987). A review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 309–327.
- Mattinen, M.-L., Kruus, K., Buchert, J., Nielsen, J. H., Andersen, H. J., & Steffensen, C. L. (2005). Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptide. *FEBS Journal*, 272, 3640–3650.
- Mehrens, H.-A., & Reimerdes, E. H. (1991). Definition der milchproteine. In GDCh (Ed.), *Milchproteine*. Hamburg: Behr's Verlag.
- Noguchi, H. (1960). Interactions of serum albumin and synthetic polyelectrolytes in various buffer systems. *Journal of Physical Chemistry*, 64(1), 185–187.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S. R., Boeriu, C. G., Gruppen, H., Helsing, M., et al. (2001). Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(5), 2503–2510.
- Parker, W. C., & Bearn, A. G. (1963). Boric acid-induced heterogeneity of conalbumin by starch-gel electrophoresis. *Nature*, 199, 1184–1186.
- Shotaro, Y. (2002). Method for crosslinking proteins by using enzyme. Patent of the European Patent Office. Patent no. US 2002009770. <<http://ep.espacenet.com>>.
- Singh, H. (1991). Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 196–200.
- Stahmann, M. A., Spencer, A. K., & Honold, G. R. (1977). Cross-linking of proteins in vitro by peroxidase. *Biopolymers*, 16, 1307–1318.
- Taler, G., Navon, G., & Becker, O. M. (1998). The interaction of borate ions with cytochrome c surface sites. A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 75(5), 2461–2468.
- Thalman, C. R. (2003). *Tyrosinase-induzierte Quervernetzung von Proteinen*. Ph.D. thesis, University of Bremen. Herdecke: GCA-Verlag.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447–454.



Kiel, 12.12.2007

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Hilfe enzymatischer und chemisch-physikalischer Verfahren sowie Beurteilung der techno-funktionellen und in-vitro tropho-funktionellen Eigenschaften“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich die Arbeit noch keinem anderen Fachbereich beziehungsweise noch keiner anderen Fakultät vorgelegt habe.

Beate Hiller.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name	Hiller
Vorname	Beate
Geburtsdatum	28.11.1981
Geburtsort	Neu-Kaliß
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulausbildung

---

Sept. 1988 - Jul. 1992	Peter-Joseph-Lenné Grundschule Ludwigslust
Sept. 1992 - Jul. 2000	Goethe-Gymnasium Ludwigslust

## Studium

---

Okt. 2000 - Sept. 2003	Studium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Abschluss Bachelor of Science oec. troph.
Okt. 2003 - Jul. 2005	Studium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Abschluss Master of Science oec. troph.
Aug. 2005 - Mrz. 2008	Promotionsstudium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Erarbeitung der Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel; Abschluss Dr. oec. troph.

## Berufstätigkeit

---

Nov. 2004 - Jul. 2005	Volontärin im Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel
Sept. 2005 - Mai 2006	Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel
Jun. 2006 - Dez. 2007	Volontärin im Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel
Jan. 2008 - Mrz. 2008	Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Max Rubner-Institut, Standort Kiel

## **Veröffentlichungen**

Hiller, B, Lorenzen, PC. Surface hydrophobicity of physicochemically and enzymatically treated milk proteins in relation to techno-functional properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 461-468, **2007**.

Hiller, B, Lorenzen, PC. Effect of buffer systems on the extent of enzymatic oligomerisation of milk proteins. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1140-1144, **2008**.

Hiller, B, Lorenzen, PC. Enzymatische Oligomerisierung von Milcheiweiß mit Phenol-substanzen aus Pflanzenextrakten. Posterbeitrag zum Symposium Funktionelle Lebensmittel, Kiel, 28./29. Juni **2007**.