

Charakterisierung und Gewinnung von Oligosacchariden

als potentiell funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Katja Zerge

geboren am 06.02.1986 in Frankenberg / Sachsen

eingereicht am

Die Dissertation wurde in der Zeit von April 2010 bis Januar 2014 an der Professur für
Lebensmittelchemie angefertigt.

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT:

Originalbeiträge:

Zerge, K., Clawin-Rädecker, I., Frenzel, M., Lorenzen, P.-Chr. „Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose – A comparison of β -galactosidases from *K. lactis*, *A. oryzae*, *A. aculeatus* and *B. circulans* by HPAEC with regard to different process parameters” (wissenschaftliches Paper), *in Planung*

Clawin-Rädecker, I., **Zerge, K.**, Lorenzen, P.-Chr., Meisel, H., Henle, T. „Characterization of milk oligosaccharides from different mammals” (wissenschaftliches Paper), *in Planung*

Zerge, K., Lorenzen, P. Chr., Clawin-Rädecker, I. und Meisel, H. (2013). „Anreicherung von Galaktooligosacchariden mittels Nanofiltration” *Lebensmittelchemie* 5: S119

Poster und Vorträge:

Altmann, K., Clawin-Rädecker, I., **Zerge, K.**, Hofmann, W., (2013) „Efficiency of different NF-membranes for the enrichment of milk oligosaccharides” (Poster). Milchkonferenz der Gesellschaft für Milchwissenschaft (GfM), Hohenheim, *in Planung*

Zerge, K., Clawin-Rädecker, I., Heller, K. J., Lorenzen, P.-Chr. (2013) „Bifidogene Wirkung aufgereinigter Galactooligosaccharide als mögliche funktionelle Inhaltsstoffe in Lebensmitteln” (Poster). 6. Symposium Funktionelle Lebensmittel, Kiel

Altmann, K., **Zerge, K.**, Hofmann, W., Lorenzen, P.-Chr. (2013) „Anreicherung von Milcholigosacchariden aus Kuhmilch mit Hilfe der Nanofiltration” (Poster). 6. Symposium Funktionelle Lebensmittel, Kiel

Zerge, K., Clawin-Rädecker, I., Heller, K. J., Lorenzen, P.-Chr. (2013) „Bifidogene Wirkung aufgereinigter Galactooligosaccharide als mögliche funktionelle Inhaltsstoffe in Lebensmitteln” (Poster). 50. Wiss. Kongress der DGE, Bonn

Clawin-Rädecker, I., **Zerge, K.**, Altmann, K., Hofmann, W., Lorenzen, P.-Chr. (2013) „Milchoriginäre Oligosaccharide als funktionelle Inhaltsstoffe” (Vortrag). 63. öffentliche Hochschultagung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel

Zerge, K., Lorenzen, P. Chr., Clawin-Rädecker, I., Meisel, H. (2012) „Anreicherung von Galaktooligosacchariden mittels Nanofiltration” (Poster). Lebensmittelchemikertag, Münster

Zerge, K., Lorenzen, P. Chr., Clawin-Rädecker, I., Meisel, H. (2012) „Identification and quantification of milk oligosaccharides” (Poster). 2nd Kiel Food Science Symposium, Kiel

- Zerge, K.**, Lorenzen, P. Chr., Clawin-Rädecker, I. (2012) „Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose - comparison of different β -galactosidases from *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus circulans*” (Vortrag). 2nd Kiel Food Science Symposium, Kiel
- Zerge, K.**, Frenzel, M., Kläser, K., Günther, P. F., Clawin-Rädecker, I., Lorenzen, P.-Chr. (2012) „Gewinnung von Galactooligosacchariden” (Vortrag). 62. öffentliche Hochschultagung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel
- Frenzel, M., **Zerge, K.**, Clawin-Rädecker, I., Lorenzen, P. Chr. (2011) „Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit β -Galactosidase aus *Aspergillus aculeatus* (Pectinex® Ultra SP-L)” (Poster). 5. Symposium Funktionelle Lebensmittel, Kiel
- Zerge, K.**, Lorenzen, P.-Chr., Clawin-Rädecker, I. (2011) „Enzymatische Synthese von Galakto-Oligosacchariden aus Lactose - Vergleich verschiedener β -Galactosidasen aus *K. lactis*, *A. oryzae* und *B. circulans*” (Poster). 5. Symposium Funktionelle Lebensmittel, Kiel
- Zerge, K.** (2011) „Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose – Comparison of different β -galactosidases from *K. lactis*, *A. oryzae* and *B. circulans*” (Vortrag). Milchkonferenz der Gesellschaft für Milchwissenschaft (GfM), Bern
- Zerge, K.**, Lorenzen, P.-Chr., Clawin-Rädecker, I., Meisel, H. (2011) „Identification and Quantification of milk oligosaccharides” (Poster). Milchkonferenz der Gesellschaft für Milchwissenschaft (GfM), Bern
- Clawin-Rädecker, I., **Zerge, K.** (2011) „Characterization of milk oligosaccharides from different mammals” (Vortrag). IDF International Symposium on sheep, goat and other non-cow milk, Athen
- Zerge, K.**, Lorenzen, P. Chr., Clawin-Rädecker, I. (2011) „Charakterisierung von Milcholigosacchariden verschiedener Tierarten” (Poster). 48. Wiss. Kongress der DGE, Potsdam

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IX

Abbildungsverzeichnis XVI

Tabellenverzeichnis XXIX

1 Einleitung und Zielstellung..... 1

2 Theoretischer Teil..... 3

2.1 Charakterisierung des Untersuchungsmaterials Milch..... 3

2.1.1 Definitionen..... 3

2.1.2 Eigenschaften und Zusammensetzung von Milch..... 3

2.1.3 Wertgebende Inhaltsstoffe der Milch 5

2.1.3.1 Kohlenhydrate5

2.1.3.2 Milchproteine.....6

2.1.3.3 Minore Inhaltsstoffe.....7

2.1.3.3.1 Salze.....7

2.1.3.3.2 Vitamine.....7

2.2 Oligosaccharide..... 8

2.2.1 Definition von Oligosacchariden..... 8

2.2.2 Einteilung der Oligosaccharide 8

2.2.2.1 Galacto-Oligosaccharide.....8

2.2.2.1.1 Struktur von Galacto-Oligosacchariden8

2.2.2.1.2 Vorkommen und Gehalte von Galacto-Oligosacchariden..... 10

2.2.2.1.3 Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden 10

2.2.2.1.4 Anwendung von Galacto-Oligosacchariden..... 11

2.2.2.2 Milcheigene Oligosaccharide 12

2.2.2.2.1 Struktur von milcheigenen Oligosacchariden 12

2.2.2.2.2 Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden 15

2.2.2.2.3 Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden 17

2.2.2.3 Weitere Oligosaccharide..... 19

2.2.2.3.1 Fructo-Oligosaccharide / Inulin 19

2.2.2.3.2 Malto-, Isomalto-, Gentio- und Xylo-Oligosaccharide 20

2.3	Milch als funktionelles Lebensmittel	21
2.4	Analytische Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden.....	22
2.4.1	Probenvorbereitung	22
2.4.1.1	Festphasenextraktion an Aktivkohle.....	23
2.4.1.2	Größenausschlusschromatographie.....	24
2.4.2	Analytische Messmethoden.....	25
2.4.2.1	HPAEC-PAD/IT-MS.....	25
2.4.2.1.1	Hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie (HPAEC).....	26
2.4.2.1.2	Pulsierende amperometrische Detektion (PAD)	30
2.4.2.1.3	Massenspektrometrische Analyse (MS).....	32
2.4.2.2	Weitere Analysensysteme.....	34
2.4.3	Validierung von Messmethoden.....	37
2.5	Enzymatische Synthese der Galacto-Oligosaccharide.....	37
2.5.1	Lactosehydrolyse und Transgalactosylierung	38
2.5.2	Einflussfaktoren auf die enzymatische GOS-Synthese	40
2.5.2.1	Einfluss des Ausgangslactosegehalts auf die enzymatische GOS-Synthese.....	40
2.5.2.2	Einfluss der Enzymquelle auf die enzymatische GOS-Synthese	40
2.5.2.3	Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die enzymatische GOS-Synthese.....	41
2.5.2.4	Einfluss der Enzymkonzentration auf die enzymatische GOS-Synthese.....	41
2.5.2.5	Einfluss des Monosaccharidgehalts auf die enzymatische GOS-Synthese	42
2.5.2.6	Einfluss des Salzgehalts auf die enzymatische GOS-Synthese.....	42
2.5.2.7	Weitere Einflussfaktoren auf die enzymatische GOS-Synthese	42
2.6	Aufreinigung von Oligosacchariden	43
2.6.1	Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration.....	44
2.6.1.1	Definitionen und Einteilung der Nanofiltration	44
2.6.1.2	Dead-End-Filtration.....	45
2.6.1.3	Cross-Flow-Filtration	46
2.6.1.3.1	Einflussfaktoren auf die Cross-Flow-Filtration.....	48
	Einfluss des Drucks auf die Cross-Flow-Filtration	48
	Einfluss der Temperatur auf die Cross-Flow-Filtration	49
	Einfluss der Ausgangszuckerkonzentration auf die Cross-Flow-Filtration	49
	Einfluss des Volumenstroms auf die Cross-Flow-Filtration	49
2.6.1.3.2	Erfolge der Cross-Flow-Nanofiltration.....	50
2.6.2	Aufreinigung der Oligosaccharide mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle	51

3	Material und Methoden	52
3.1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	52
3.1.1	Verwendete Chemikalien	52
3.1.2	Verwendete Materialien	59
3.1.3	Verwendete Geräte	63
3.2	Probenübersicht.....	69
3.3	Allgemeine Analysenmethoden	72
3.3.1	Tüpfeltest.....	72
3.3.2	Dünnschichtchromatographie zur Zuckerdetektion	72
3.3.3	Enzymatische Lactosebestimmung	72
3.4	Photometrische Testsysteme.....	73
3.4.1	Resorcinol-Schwefelsäure-Test zur photometrischen Bestimmung der neutralen Zucker.....	73
3.4.2	Photometrische Tests zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen.....	73
3.4.2.1	Probenvorbereitung.....	73
3.4.2.2	Perjodat-Resorcinol-Test zur photometrischen Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker	74
3.4.2.3	Resorcinol-Salzsäure-Test zur photometrischen Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker	74
3.5	Identifizierung und Quantifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS	75
3.5.1	Probenaufarbeitung	75
3.5.1.1	Fettabtrennung	75
3.5.1.2	Proteinabtrennung.....	75
3.5.1.2.1	Proteinfällung mit Ethanol	75
3.5.1.2.2	Proteinfällung mit einem Chloroform-Ethanol-Gemisch.....	75
3.5.1.2.3	Proteinfällung mit Säure	76
3.5.1.2.4	Proteinabtrennung durch Membranfiltration im Labormaßstab.....	76
3.5.1.2.5	Proteinabtrennung durch eine Technikum-Ultrafiltrationsanlage.....	76
3.5.1.3	Lactoseabtrennung.....	76
3.5.1.3.1	Größenausschlusschromatographie mit Sephadex® G25 zur Lactoseabtrennung	76
3.5.1.3.2	Größenausschlusschromatographie mit BioGel® zur Lactoseabtrennung	77

3.5.1.3.3	Festphasenextraktion an Aktivkohle zur Lactoseabtrennung.....	77
3.5.2	Detektion der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS.....	77
3.6	Enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β-Galactosidasen	81
3.6.1	Herstellung von lactosereichem Ultrafiltrations-Magermilchpermeat.....	81
3.6.2	Enzymatische Reaktion mit β -Galactosidase	82
3.7	Aufreinigung von Oligosacchariden	82
3.7.1	Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration.....	82
3.7.1.1	Vorversuche zur Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben im Dead-End-Modus	82
3.7.1.2	Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™	83
3.7.1.2.1	Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™.....	83
3.7.1.2.2	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™.....	86
3.7.1.3	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Technikumsmaßstab mit der Anlage Pilot System Modell SW40.....	87
3.7.1.4	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im großtechnischem Maßstab mit der Anlage Membranfiltrationsanlage	89
3.7.2	Aufreinigung der Oligosaccharide durch präparative Chromatographie an Aktivkohle	90
3.8	Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung	91
3.9	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	92
4	Auswertung und Diskussion	94
4.1	Entwicklung von Methoden zur Analytik von Oligosacchariden... 94	
4.1.1	Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden	94
4.1.1.1	Fett- und Proteinabtrennung	94
4.1.1.2	Lactoseabtrennung.....	96
4.1.1.2.1	Größenausschlusschromatographie mit dem Material Sephadex®G25 zur Lactoseabtrennung.....	96
4.1.1.2.2	Größenausschlusschromatographie mit dem Material BioGel® zur Lactoseabtrennung	103
4.1.1.2.3	Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE) zur Lactoseabtrennung.....	108

4.1.1.2.4	Vergleich der verschiedenen Methoden zur Lactoseabtrennung.....	117
4.1.1.3	Identifizierung und Quantifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS....	119
4.1.1.3.1	HPAEC-PAD	119
4.1.1.3.2	LC/MS	122
4.1.1.4	Validierung der entwickelten Methoden.....	125
4.1.1.4.1	Validierung der HPAEC/PAD	125
4.1.1.4.2	Validierung der Milchprobenaufarbeitung (Entfettung, Proteinabtrennung und Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE)	128
4.1.1.4.3	Validierung der Carrez-Fällung	129
4.1.2	Entwicklung von Schnellmethoden zur Analyse von milcheigenen Oligosacchariden	131
4.1.2.1	Photometrischer Test zur Bestimmung der neutralen Zuckerverbindungen (Resorcinol-Schwefelsäure-Test).....	131
4.1.2.2	Photometrische Tests zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen (Perjodat-Resorcinol-Test und Resorcinol-Salzsäure-Test)	134
4.2	Identifizierung und Quantifizierung von milcheigenen Oligosacchariden in Milchproben verschiedener Nutztierarten und in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie	141
4.2.1	Milcheigene Oligosaccharide in Milchproben verschiedener Nutztierarten	141
4.2.1.1	Identifizierung der MOS in Milchproben verschiedener Nutztierarten	142
4.2.1.2	Quantifizierung der MOS in Milchproben verschiedener Nutztierarten.....	154
4.2.1.3	Verhältnis von MOS zu Lactose in Milchproben verschiedener Nutztierarten	157
4.2.1.4	Einflussfaktoren auf die MOS-Konzentration in Milchproben verschiedener Nutztierarten.....	158
4.2.2	Milcheigene Oligosaccharide in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie	159
4.2.2.1	Identifizierung und Quantifizierung der MOS in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie	159
4.2.2.2	Verhältnis von MOS zu Lactose in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie.....	163
4.3	Enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β-Galactosidasen	165
4.3.1	Einflussfaktoren auf die GOS-Synthese.....	167
4.3.1.1	Einfluss des pH-Wertes auf die GOS-Synthese	167
4.3.1.2	Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese	169

4.3.1.3	Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses auf die GOS-Synthese	171
4.3.1.4	Vergleich der Enzympräparationen verschiedener Hersteller auf die GOS-Synthese	173
4.3.1.5	Einfluss der vorherigen Wärmebehandlung des Enzympräparats auf die GOS-Synthese ..	174
4.3.1.6	Einfluss des gleichzeitigen Einsatzes von zwei Enzymen auf die GOS-Synthese.....	175
4.3.1.7	Vergleich der GOS-Synthesen mit β -Galactosidasen verschiedener Enzymherkünfte.....	177
4.3.2	Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels Massenspektrometrie	183
4.3.3	Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels NMR.....	185
4.3.4	Reaktion der milcheigenen Oligosaccharide mit β -Galactosidasen	188
4.4	Aufreinigung von Oligosacchariden	190
4.4.1	Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration.....	190
4.4.1.1	Vorversuche der Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben im Dead-End- und Cross-Flow-Modus.....	191
4.4.1.2	Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™	192
4.4.1.2.1	Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™.....	192
4.4.1.2.2	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™.....	200
4.4.1.3	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Technikumsmaßstab mit der Anlage Pilot System Modell SW40	207
4.4.1.4	Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im großtechnischem Maßstab mit der Membranfiltrationsanlage	213
4.4.2	Aufreinigung der Oligosaccharide durch präparative Chromatographie an Aktivkohle	223
4.4.2.1	Methodenentwicklung zur Aufreinigung der Oligosaccharide mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle	223
4.4.2.2	Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle	228
4.4.2.3	Aufreinigung von MOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle.....	231
4.4.3	Vergleich der Methoden zur Aufreinigung von Oligosacchariden (Nanofiltration vs. präparativer Chromatographie an Aktivkohle).....	234
4.5	Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung von Oligosacchariden.....	237

4.6	Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Milchprodukts im Labormaßstab	244
5	Zusammenfassung und Ausblick	246
6	Anhang.....	251
6.1	Anhang zum theoretischem Teil	251
6.1.1	Literaturübersicht über Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden.....	251
6.1.2	Literaturübersicht über Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden	256
6.1.3	Literaturübersicht über Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden	320
6.1.4	Formeln zur Berechnung der Messpräzision, Methodenpräzision und Wiederholbarkeit zur Validierung von Messmethoden.....	328
6.1.5	Literaturübersicht über die enzymatische GOS-Synthese.....	329
6.2	Anhang zum Teil „Material und Methoden“	331
6.2.1	Pipettierschema und Berechnungsformeln für die enzymatische Lactosebestimmung.....	331
6.2.1.1	Pipettierschema für die enzymatische Lactosebestimmung.....	331
6.2.1.2	Berechnungsformeln für die enzymatischen Lactosebestimmung.....	332
6.2.2	Formeln zur Berechnung der quantifizierten Zucker mittels photometrische Testsysteme	332
6.2.2.1	Formeln zur Berechnung der neutrale Zucker nach Resorcinol-Schwefelsäure-Test.....	332
6.2.2.2	Formeln zur Berechnung der sialinsäurehaltigen Zucker mittels Perjodat-Resorcinol-Test.....	333
6.2.2.3	Formeln zur Berechnung der sialinsäurehaltigen Zucker mittels Resorcinol-Salzsäure-Test.....	334
6.2.3	Berechnungsgrundlagen zur GOS-Analyse für die enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β -Galactosidasen	335
6.2.4	Formel zur Ausbeuteberechnung der Nanofiltrationsversuche sowie Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare.....	336
6.2.4.1	Formel zur Ausbeuteberechnung der Nanofiltrationsversuche.....	336
6.2.4.2	Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare	337

6.3	Anhang zum Teil „Auswertung und Diskussion“	338
6.3.1	Anhang zum Abschnitt „Fett- und Proteinabtrennung von Milchproben“ (Kapitel 4.1.1.1)	338
6.3.2	Anhang zum Abschnitt „Größenausschlusschromatographie mit dem Material Sephadex®G25 zur Lactoseabtrennung“ (Kapitel 4.1.1.2.1).....	339
6.3.3	Anhang zum Abschnitt „HPAEC-PAD“ (Kapitel 4.1.1.3.1)	340
6.3.4	Anhang zum Abschnitt „Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels NMR“ (Kapitel 4.3.3)	342
6.3.5	Anhang zum Abschnitt „Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™“ (Kapitel 4.4.1.2.1)	346
6.3.6	Anhang zum Abschnitt „Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle“ (Kapitel 4.4.2.2).....	347
7	Literatur	348
	Versicherung	362
	Danksagung	363

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
A	Extinktion
Å	Ångström
A.	<i>Aspergillus</i>
2-AA	2-Aminobenzoessäure
2-AB	2-Aminobenzamid
Abb.	Abbildung
ALU	Acid lactase unit
2-AMAC	2-Aminoacridon
APTS	9-Aminopyren-1,4,6-trisulfonat
AU	arbitrary unit
B.	<i>Bacillus</i>
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BAP	2-Amino(6-amidobiotinyl)pyridin
BG	Bestimmungsgrenze
BMO	Bovine milcheigene Oligosaccharide
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration (Stoffmenge pro Volumen)
C	Coulomb
C.	<i>Clostridium</i>
ca.	circa
CE	Capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)

Abkürzung	Bedeutung
CID	Collision-induced dissociation
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DGL	Digalactosyllactose
DP	Grad der Polymerisation
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EC	Enzyme classification
ED	Elektrochemischer Detektor
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
E/S-Verhältnis	Enzym/Substrat-Verhältnis
ESI	Electrospray Ionisation
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
eV	Elektronenvolt
FL	Fucosyllactose
Fuc	Fuctose
FOS	Fructo-Oligosaccharid
g	Gramm
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosaminsäure
GC	Gaschromatographie

Abkürzung	Bedeutung
GCC-SPE	Graphitized carbon cartridge solid phase extraction (Festphasenextraktion an Aktivkohle)
GL	Galactosyllactose
GLC	Gas liquid chromatography
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosaminsäure
GOS	Galacto-Oligosaccharid
h	Stunde
Hex	Hexose
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
HM	Humanmilch
HMOS	Humanmilch-Oligosaccharid
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
incl.	inklusive
I	Anzahl der Isomere
i. d.	in der
IL	Interleukin
IT	Ionenfalle
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kilo (Tausend)
<i>K.</i>	<i>Kluyveromyces</i>
konz.	konzentriert
l	Liter

Abkürzung	Bedeutung
IgA	Immunglobulin A
Lac	Lactose
Lactu	Lactulose
LAU	Lactase activity unit
LC/MS	liquid chromatography/mass spectroscopy
LiCl	Lithiumchlorid
LIF	Laser induced fluorescence
LMH	Liter pro Membranfläche und Stunde
LNH	Lacto-N-hexaose
LNnH / LNneoH	Lacto-N-neo-hexaose
LNT	Lacto-N-triose
LNnT	Lacto-N-neo-triose
M	mol/l
max.	maximal
Mel	Melezitose
mind.	mindestens
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MOS	Milcheigenes Oligosaccharid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular Weight Cut Off
m/z-Verhältnis	Masse/Ladungs-Verhältnis
n	Anzahl der Parallelbestimmungen

Abkürzung	Bedeutung
NAc	N-Acetyl-Rest
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
n. d.	nicht detektierbar
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NF	Nanofiltration
NLU	Neutral lactase unit
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NMWCO	Nominal Molecular Weight Cut Off
NP	Normal phase
NPN	Nichtproteinstickstoff
Nr.	Nummer
NWG	Nachweisgrenze
oD	Optische Dichte
OS	Oligosaccharid
PAD	gepulster amperometrischer Detektion
PES	Polyethersulfon
Q	Quadrupol
RI	Brechungsindex
pp	postpartum
RP	Reverse phase

Abkürzung	Bedeutung
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
RZB	Relative Zentrifugenbeschleunigung
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SCF	Scientific Committee on Food (wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der EU-Kommission)
SCFA	Short chain fatty acids (kurzkettige Fettsäuren)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGL	Sialylgalactosyllactose
SL	Sialyllactose
SPE	Solid phase extraction
ssp.	subspecies
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TFC	Thin film composite
TGL	Trigalactosyllactose
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TM	Trockenmasse
TMP	Transmembrandruck
TOF	time of flight
TPY	Trypton

Abkürzung	Bedeutung
U	Unit
u. a.	unter anderen
UF	Ultrafiltration
UHT	Ultrahocherhitzung
UTM	Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
v	Volumenanteil
V	Volt
V	Vereinigung
v. a.	vor allem
VarK	Variationskoeffizient
vs.	versus
w	Gewichtsanteil
WDF	Wiederfindung
z. A.	zur Analyse
z. B.	zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Strukturformel des Disaccharides Lactose (β -Anomer).....	5
Abb. 2-2: Struktur von 3'-, 4'- und 6'-Galactosyllactose.....	9
Abb. 2-3: Strukturen der möglichen Monomere von MOS.....	13
Abb. 2-4: Strukturformel von FOS und Inulin	19
Abb. 2-5: Strukturformel von Maltose, Isomaltose, Gentiobiose und Xylose als Ausgangsstoff für Malto-, Isomalto-, Isomaltulose-, Gentio- und Xylo-Oligosaccharide	20
Abb. 2-6: Prinzip der Abtrennung von Salzen und Monosacchariden von Oligosacchariden mittels GCC-SPE nach Packer et al. [1998].....	23
Abb. 2-7: Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie nach Gey [2008].....	24
Abb. 2-8: Schematische Darstellung der hochauflösenden Anionenaustauscherchromatographie mit pulsierender amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Massenspektroskopie mit Hilfe einer Ionenfalle (IT-MS) und Elektrospray-Interface (ESI) zur Quantifizierung der Oligosaccharide.....	25
Abb. 2-9: Schematische Darstellung der stationären Phase der Säule CarboPac PA100 zur Trennung von Kohlenhydraten nach Scherz and Bonn [1998].....	28
Abb. 2-10: Verhaltensweisen einiger OS/Monomere in Bezug auf die Retentionszeitveränderung im Verlauf der chromatographischen Trennung nach Weiß [2001].....	29
Abb. 2-11: Oxidation der Glucose mit Hilfe von Arbeits- und Referenzelektrode bei der pulsierenden amperometrischen Detektion nach Weiß [2001]	31
Abb. 2-12: Prinzipielle Vorgänge bei einem ESI-Interface nach Gey [2008].....	33
Abb. 2-13: Reaktionsmechanismus der β -Galactosidaseaktivität auf Kohlenhydrate (R_1 = Aglykan-Rest des Galactosid-Substrat, R_2 = nucleophile Galactosyl-Rezeptor) nach Gosling et al. [2010].....	39
Abb. 2-14: Einteilung der verschiedenen Filtrationsprozesse nach Partikelgröße [Koch Membrane Systems, 2011].....	44
Abb. 2-15: Prinzip der Dead-End-Nanofiltration [Koch Membrane System, 2011].....	45
Abb. 2-16: Aufbau einer Dead-End-Filtrationseinheit [Goulas et al., 2003]	46
Abb. 2-17: Prinzip der Cross-Flow-Nanofiltration [Koch Membrane System, 2011]	46
Abb. 2-18: Aufbau einer Cross-Flow-Nanofiltrationseinheit mit Flachmembranen [Kolfshoten et al., 2011].....	47

Abb. 3-1: Nanofiltrationsanlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare GmbH	84
Abb. 4-1: Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden zur Proteinabtrennung bei einer Kuhmilchprobe (Probenaufarbeitung mittels GCC-SPE, Analyse durch HPAEC, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, n = 3).....	95
Abb. 4-2: Chromatographischer Verlauf der Standards Lactose (5 %), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, 0,1 %), Melezitose (0,1 %) und dem enzymatisch hergestellten GOS-Sirup GOS90 (5 %) während der Größenausschlusschromatographie mit Sephadex®G25 (0,25 ml/min für 180 min) zur Lactoseabtrennung (Fraktionen à 4 min, V = Vereinigung)	97
Abb. 4-3: HPAEC-Chromatogramme der Vereinigungen V2 bis VL3 des nach Sephadex® getrennten GOS90-Sirups sowie des unbehandelten GOS90-Sirups (75 % Trockenmasse).....	98
Abb. 4-4: Sephadex®-Chromatogramme (links) und HPAEC-Chromatogramme (rechts) von der Vereinigung V2-5 des 30min-Laufs (rot) und 180min-Laufs (schwarz) von Humanmilch (entfettet und weitgehend proteinfrei).....	100
Abb. 4-5: HPAEC-Chromatogram einer Kuhmilch (schwarz, Proteinabtrennung durch 5kDa-Ultrafiltration, Lactoseabtrennung durch Sephadex® (30min-Lauf)-Größenausschlusschromatographie, Analytik der Fraktion V2-5) sowie eines OS-Standard-Mixes (rot).....	101
Abb. 4-6: BioGel®-Chromatogramme von GOS90 der Firma Friesland Campina Domo EMEA mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten des Eluats.....	103
Abb. 4-7: BioGel®-Chromatogramme einer 20%igen Lactoselösung, einer 5%igen GOS90-Lösung sowie einer Mischung aus beiden Substanzen (5 % GOS90 + 5 % Lactose).....	105
Abb. 4-8: Zucker-DC der nach BioGel®-Aufreinigung (zur Lactose-abtrennung) gewonnenen Fraktionen einer 5%igen GOS90-Lösung	105
Abb. 4-9: HPAEC-Chromatogramme der Vereinigungen V1 bis V8 des nach BioGel® aufgereinigten 5%igen GOS90-Sirups (schwarz) sowie des nicht aufgereinigten GOS90-Sirups (rot)	105
Abb. 4-10: BioGel®-Chromatogramm (links) einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilchprobe sowie den eingeteilten Fraktionen entsprechende HPAEC-Chromatogramme (rechts) inklusive eines OS-Standard-Mixes.....	107

- Abb. 4-11: Tüpfeltests zum Überprüfen der Anwesenheit von Proteinen (links) und Zuckern (rechts) in den verschiedenen Eluaten der GCC-SPE (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina auf die GCC-SPE: 100 µl, Eluation: 3 ml Wasser (E1a), 3,3 ml Wasser (E1b), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4)) 108
- Abb. 4-12: Links: Tüpfeltests zum Nachweis von Proteinen (oben) und Zucker (unten), rechts: Zucker-DC der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Humanmilch (5) sowie mit GOS aufgestockte (ca. 1 g auf 100 ml Milch), entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch (6), Aufgabevolumina: je 100 µl, Eluation: 20 ml Wasser (E1), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4))..... 110
- Abb. 4-13: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Humanmilch (5) sowie mit GOS aufgestockte (ca. 1 g auf 100 ml Milch), entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch (6), Aufgabevolumina: je 100 µl, Eluation: 20 ml Wasser (E1), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4)) 111
- Abb. 4-14: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 µl, Eluation: 4 ml Wasser (E1), 4 ml 2 % Ethanol (E2), 4 ml 4 % Ethanol (E3), 4 ml 50 % Ethanol (E4) und 4 ml 50 % Ethanol mit HCOOH (pH 2) (E5))..... 113
- Abb. 4-15: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen 4 und 5 nach Acetonitril- oder Ethanol-Eluation (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 µl)..... 116
- Abb. 4-16: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE bzw. Sephadex[®] erhaltenen Fraktionen (A4+5-Fraktion der GCC-SPE, V2-5-Fraktion der Sephadex[®], Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, GCC-SPE-Eluation: Acetonitril, Sephadex[®] Eluation: Wasser)..... 117
- Abb. 4-17: Gradient M10 für die HPAEC-Trennung der Kohlenhydrate (A: 10 mM Natriumhydroxid, B: 100 mM Natriumhydroxid, C: 100 mM Natriumhydroxid + 1000 mM Natriumacetat, D: 100 mM Natriumhydroxid + 50 mM Natriumacetat) 121

- Abb. 4-18: Chromatographische Trennung (HPAEC-PAD) des 6er Standard-Mixes (bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), OS-Mixes (bestehend aus 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH, LNH, 6'-SL und 3'-SL) sowie des GOS90-Sirups mit Hilfe des Gradienten M10 121
- Abb. 4-19: HPAEC-Chromatogramm des OS-Mixes (bestehend aus 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH, LNH, 6'-SL und 3'-SL) sowie entsprechenden MS²-Spektren der einzelnen Analyten (gemessen als Li-Addukte) 124
- Abb. 4-20: Photometrischer Wellenlängenscan eines Lactosestandards nach Reaktion im Resorcinol-Schwefelsäure-Test (A = Extinktion, nm = Einheit der Wellenlänge) 131
- Abb. 4-21: Kalibriergerade des Resorcinol-Schwefelsäure-Tests mit Lactose-Monohydrat 132
- Abb. 4-22: Photometrischer Wellenlängenscan eines N-Acetylneuraminsäurestandards nach Reaktion im Perjodat-Resorcinol-Tests (A = Extinktion) 136
- Abb. 4-23: Kalibriergerade des Perjodat-Resorcinol-Tests mit N-Acetylneuraminsäure als reine Standardlösung (ohne Ionenaustauscher) und nach Aufreinigung des Standards mit Hilfe des Ionenaustauschers (4,5 % Lactose-Monohydrat als Matrix) 137
- Abb. 4-24: N-Acetylneuraminsäure-Kalibriergerade des Perjodat-Resorcinol-Tests in verschiedenen Matrizen (Matrizen: UF-Permeat = entfettete und weitgehende proteinfreie Kuhmilch, hydrolysiertes UF-Permeat = mit β -Galactosidase hydrolysiertes UF-Permeat (Lactoseabbau), NF-Retentat = Retentat der Nanofiltration von hydrolysiertem UF-Permeat, NF-Permeat = Permeat der Nanofiltration von hydrolysiertem UF-Permeat) 138
- Abb. 4-25: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Kuhmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden) 143

- Abb. 4-26: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Stutenmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)..... 145
- Abb. 4-27: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Ziegenmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)..... 147
- Abb. 4-28: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Schafsmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)..... 148
- Abb. 4-29: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Kamelmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)..... 150
- Abb. 4-30: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Humanmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende LC/MS-Daten der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)..... 151
- Abb. 4-31: HPAEC-Chromatogramme diverser Milchproben (Probenvorbereitung: Entfettung, Proteinabtrennung durch Ultrafiltration, Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE, Analytik: HPAEC-PAD/IT-MS)..... 153
- Abb. 4-32: HPAEC-Chromatogramme der verschiedenen Produktströme von UTM (Analytik der MOS: HPAEC-PAD/IT-MS, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Probenaufarbeitung: (wenn nötig) Entfettung, Proteinentfernung durch Ultrafiltration und Aufreinigung mittels GCC-SPE (n = 2), Analytik von Lactose und Galactose durch UTM)..... 162

- Abb. 4-33: Zeitlicher Verlauf (links) von Glucose, Lactose und den synthetisierten Tri-, Tetra- und Pentasacchariden einer enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösung mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* sowie HPAEC-Chromatogramm (rechts, zum Reaktionszeitpunkt $t = 5$ h) (pH 4, E/S-Verhältnis = 12 U/g, $T = 40$ °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung, Identifizierung der Analyten mittels LC/MS) 166
- Abb. 4-34: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) und Lactosehydrolyse mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei pH 4 und pH 7 ($n = 2$, $T = 40$ °C, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung) 168
- Abb. 4-35: Synthese der Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C, 50 °C und 60 °C (pH = 7,0, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose; Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 170
- Abb. 4-36: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* („Tolerase“) bei 6 U/g, 12 U/g und 24 U/g (pH = 4,5, $T = 40$ °C, 40 % Ausgangslactose; Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 171
- Abb. 4-37: Synthese der Haupt-Trisaccharide (Summe der Trisaccharide bei 23,6 min und bei 33,3 min) mit Hilfe der β -Galactosidasen aus *B. circulans*, *A. oryzae* und *K. lactis* ($T = 40$ °C, E/S-Verhältnis: je eingesetztem Enzym 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 175

- Abb. 4-38: Synthese der Trisaccharide bei 23,6 min und bei 33,3 min sowie deren Summe während der GOS-Herstellung mit den β -Galactosidasen aus *B. circulans* und *A. oryzae* (Zusatz nach 5 Stunden bzw. 0 Stunden) [T = 40 °C, E/S-Verhältnis: je eingesetztem Enzym 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung] 176
- Abb. 4-39: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (pH 4,5, „Tolerase“) oder *B. circulans* (pH 4) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat). Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung) 178
- Abb. 4-40: Zucker-DC der mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (t = 5 h, pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (t = 4 h, pH 4,5, „Tolerase“) und *B. circulans* (t = 5 h, pH 4) enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C; 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 179
- Abb. 4-41: HPAEC-Chromatogramme der synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (t = 5 h, pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (t = 4 h, pH 4,5, „Tolerase“) oder *B. circulans* (t = 5 h, pH 4) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 183
- Abb. 4-42: Struktur der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 nach Analyse mittels ^1H NMR, ^{13}C NMR und GLC-MS 187
- Abb. 4-43: Gehalte der Oligosaccharide GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL im UF-Magermilchpermeat und mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. *B. circulans* behandeltem UF-Magermilchpermeat (t = 3 h, pH 6,6, 300 U/g, T = 40 °C, keine weitere Aufzuckerung des Substrates), Probenaufarbeitung: GCC-SPE (n = 2)..... 188

- Abb. 4-44: Wiederfindungen (WDF) von Glucose, Lactose, Tri-, Tetra- und Pentasaccharid im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: 5 % Vivinal®GOS, Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, n = 1) 193
- Abb. 4-45: Flux (Permeatleistung) in LMH (Liter pro Membranfläche und Stunde) und Permeatvolumen in ml der Membranen SR100 und MPF34 während der Nanofiltration (Ausgangssubstanz: 5 % Vivinal®GOS, Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, n = 1) 194
- Abb. 4-46: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (5%iger Vivinal®GOS-Sirup) und der Nanofiltrationsretentate der verschiedenen Membranen (Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min) 195
- Abb. 4-47: Gehalte und Wiederfindungen von Glucose, Lactose, Tri-, Tetra- und Pentasaccharid (Berechnung der Gehalte an Tri- bis Pentasaccharid mittels externer Lactosekalibrierung) in den mit der Membran SR100 (ca. 400 Da, Thin Film Composite Polyamid) behandelten Proben (Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, Analytik: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung, n = 1) 197
- Abb. 4-48: Wiederfindungen von Glucose, Lactose, drei Disacchariden und 6'-GL im Nanofiltrationsretentat (Membran: SR100, Ausgangssubstanz: 5%ige GOS-Probe, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h), Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4,0 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, n = 2) 199

- Abb. 4-49: Wiederfindung von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: UF-Magermilchpermeat, Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Waschfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung) 201
- Abb. 4-50: Flux in LMH (Liter pro Membranfläche und Stunde) und Permeatvolumen in ml der Membranen SR100, GE, DL und MPF36 während der Nanofiltration (Ausgangssubstanz: UF-Magermilchpermeat, Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Waschfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min) 203
- Abb. 4-51: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (UF-Magermilchpermeat) und das durch die diversen Membranen aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Waschfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Probenaufarbeitung für HPAEC-PAD: GCC-SPE (n = 2) (Anmerkung: Lactosepeak bei 21,0 min entspricht nicht dem tatsächlichen Lactosegehalt, sondern nur dem Rest-Lactosegehalt, der mittels GCC-SPE nicht abgetrennt werden konnte))..... 204
- Abb. 4-52: Gehalte und Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL in den mit der Membran GE (ca. 500 Da, Composite) behandelten Proben (Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, Analytik der OS: HPAEC-PAD nach GCC-SPE-Aufreinigung, Analytik der Lac: enzymatische Bestimmung) 206

- Abb. 4-53: Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat verschiedener Membranen (Ausgangssubstanz: konzentriertes Molkenpermeat, Durchführung: reine Filtration ohne Diafiltration, Maßstab: Technikum, Anlage: Pilot System Modell SW40, Feed-Druck: 15 bar bzw. 30 bar, Temperatur: 10 °C - 15 °C, Feed: 500 l/h, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung)..... 209
- Abb. 4-54: Gehalte und Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL in den mit der Membran Hydracore 10 (ca. 600 Da, PES) behandelten Proben (Ausgangssubstanz: konzentriertes Molkenpermeat, Durchführung: reine Filtration ohne Diafiltration, Maßstab: Technikum, Anlage: Pilot System Modell SW40, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung, *Werte durch Differenzrechnung aus Ausgangsmaterial und Permeat bestimmt)..... 212
- Abb. 4-55: Wiederfindungen von Galactose, Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat), Durchführung: Waschen um ca. Faktor 7 und Aufkonzentrierung um ca. Faktor 5, Maßstab: großtechnischer Maßstab, Anlage: Membranfiltrationsanlage, Druck: 10 bar bzw. 20 bar, Temperatur: ca. 40 °C, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Gal und Lac: enzymatische Bestimmung) 214
- Abb. 4-56: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat) und das durch verschiedene Membranen bei 10 oder 20 bar aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Waschen um ca. Faktor 7 und Aufkonzentrierung um ca. Faktor 5, Maßstab: großtechnischer Maßstab, Anlage: Membranfiltrationsanlage, Temperatur: ca. 40 °C, Probenaufarbeitung für HPAEC-PAD: GCC-SPE (n = 2))..... 215

- Abb. 4-57: Gehalte und Wiederfindungen (in Bezug auf die Ausgangsprobe, Ausnahme: Lactose-WDF auf Rohmilch bezogen) von Lactose, Galactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL sowie sialinsäurehaltigen Zucker in den mit der Membran SR50/SR2 (200 Da - 300 Da, Thin Film Composite) behandelten Proben (großtechnischer Maßstab, Druck: 10 bar (links) bzw. 20 bar (rechts), Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Gal und Lac: enzymatische Bestimmung, Analytik der sialinsäurehaltigen Zucker: Perjodat-Resorcinol-Test)..... 217
- Abb. 4-58: Zucker-DC der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigte, MOS-haltige Probe (Probe: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat), der MOS-Standards 3'-SL und 6'-SL, des Vivinal[®]GOS-Sirups und der Kohlenhydratstandards Lactose, Glucose und Melezitose 221
- Abb. 4-59: Aktivkohle-Chromatogramm der mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* (12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h) hergestellten, aufgearbeiteten, GOS-haltigen Lösung (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Gradient: siehe Tab. 4-15)..... 225
- Abb. 4-60: Zucker-DC der mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* (12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h) hergestellten, GOS-haltigen Lösung nach Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (Aktivkohle: 90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Zucker-DC: Detektion mit Orcinol, Kieselgelplatte)..... 226
- Abb. 4-61: Wiederfindungen von Galactose, Glucose, Lactose und GOS (berechnet mit externen Lactosekalibrierung, bestehend aus allen Analyten außer Glucose, Galactose und Lactose) nach Aktivkohle-Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (Reaktionsbedingungen: 12 U/g, 40 °C, pH 4 - 7, 4 h - 5 h je nach eingesetztem Enzym) 228
- Abb. 4-62: HPAEC-Chromatogramme der mittels Aktivkohle aufgereinigten GOS-Lösungen (GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (Hersteller: Novozymes A/S bzw. Nutritional Products GmbH (DSM) bzw. Chr. Hansen A/S, 12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h), GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* (12 U/g, 40 °C, pH 4,5, 4 h), GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* (Hersteller: Chr. Hansen A/S, 12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h), Vivinal[®]GOS) sowie Wasser..... 230

- Abb. 4-63: Tüpfeltests zum Nachweis von Proteinen (links) und Kohlenhydraten (rechts) in den verschiedenen Eluaten nach Aktivkohle-Aufreinigung einer MOS-haltigen Probe (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Probe: der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigten MOS (Name: M37, Ausgangssubstrat: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat) 232
- Abb. 4-64: Zucker-DC der verschiedenen Eluate nach Aktivkohle-Aufreinigung einer MOS-haltigen Probe (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min. Probe: der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigten MOS (Ausgangssubstrat: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat, DC: Detektion mit Orcinol, Kieselgelplatte) 232
- Abb. 4-65: HPAEC-Chromatogramme der mit β -Galactosidase aus *K. lactis* (12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h) hergestellten, GOS-haltigen Lösung (Ausgangsprobe) sowie nach Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min) und Aufreinigung mittels Nanofiltration (Membran SR100 (ca. 400 Da, TFC polyamid), Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min) 235
- Abb. 4-66: Ergebnisse der Untersuchung für die orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung (n = 3) mit aufgereinigten, GOS-Proben (O10 bis O17) sowie 5%ige Standardsubstanzen (Glucose, Lactose und Lactulose) (F 011 A3 und F 024 A1 = Stämme von *Bifidobacterium longum*, Bifidogenitätsmessung durch Ermittlung der optischen Dichte bei 620 nm vor und nach Inkubation (24 h) des Mediums) 240
- Abb. 6-1: HPAEC-Chromatogramme der verschiedener Aufarbeitungsmethoden zur Proteinabtrennung bei einer Kuhmilchprobe (Probenaufarbeitung mittels GCC-SPE) 338
- Abb. 6-2: SDS-PAGE-Gel von dem Sigma-Marker S8445-1VL (links) und einer Kuh-Rohmilchprobe nach Entfettung und Proteinentfernung mittels einer Technikums-Ultrafiltrationsanlage (rechts)..... 339

- Abb. 6-3: Vergleich verschiedener HPAEC-PAD-Gradienten durch die Darstellung des jeweiligen Gradientenprogramms (A: 10 mM Natriumhydroxid, B: 100 mM Natriumhydroxid, C: 100 mM Natriumhydroxid + 1000 mM Natriumacetat, D: 100 mM Natriumhydroxid + 50 mM Natriumacetat), der chromatographischen Trennung des 6er Standard-Mixes (bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose) sowie der chromatographischen Trennung des GOS90-Sirups (Inhaltsstoffe des Sirups siehe Abb. 4-3)..... 340
- Abb. 6-4: Struktur der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 nach Analyse mittels ^1H NMR, ^{13}C NMR und GLC-MS (GOS1: hergestellt durch β -Galactosidase aus *K. lactis*, GOS2: hergestellt durch β -Galactosidase aus *B. circulans*, GOS1-1: Peak Nr. 6 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 23,6 min; GOS2-1: Peak Nr. 8 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 33,3 min; GOS2-2: Peak Nr. 10 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 35,9 min; GOS2-3: Peak Nr. 11 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 37,7 min) 342
- Abb. 6-5: ^1H NMR-Spektrum (700 MHz) der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 (Analyse mit D_2O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4) 343
- Abb. 6-6: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (enzymatisch hergestellte, GOS-haltige Lösung mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* bei 40 °C, 12 U/g, pH 7, 5 h) und das durch die Membran SR100 aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Diafiltration mit einem Waschfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4,0 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min)..... 346

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Zusammensetzung der Milch verschiedener Tierarten (Quelle: Souci et al., [1991] und Souci et al., [2008])	4
Tab. 2-2: Anteile der verschiedenen Bestandteile an Caseinen und Molkenproteinen am Gesamt-Milchprotein [Töpel, 1991].....	7
Tab. 2-3: Name, Abkürzung, Struktur, Molmasse und chemische Beschaffenheit einiger ausgewählter MOS, welche mit Hilfe von kommerziellen Standards mittels HPAEC-PAD/IT-MS quantifiziert werden können	14
Tab. 3-1: Verwendete Chemikalien	52
Tab. 3-2: Verwendete Materialien	59
Tab. 3-3: Verwendete Geräte	63
Tab. 3-4: Milchproben verschiedener Nutztierarten	69
Tab. 3-5: Proben der Produktströme der milch- und molkeverarbeitenden Industrie	71
Tab. 3-6: Verwendete Parameter für das HPAEC-System	78
Tab. 3-7: Verwendete Parameter für das LC/MS-System	79
Tab. 3-8: Trennprogramm zur Bestimmung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS.....	81
Tab. 3-9: Verwendete Membranen für die Vorversuche zur Nanofiltration.....	83
Tab. 3-10: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche mit der Anlage ÄKTAcrossflow™ mit GOS-haltigen Proben im Labormaßstab	85
Tab. 3-11: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche mit der Anlage ÄKTAcrossflow™ mit MOS-haltigen Milchproben im Labormaßstab	86
Tab. 3-12: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche von MOS-haltigen Proben mit der Anlage Pilot System Modell SW40 von MMS Membrane Systems.....	88
Tab. 3-13: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche von MOS-haltigen Proben mit der Membranfiltrationsanlage von UFI-TEC Institut für Membrantechnologie GmbH.....	89
Tab. 3-14: Trennprogramm für die Aufreinigung von GOS mit Hilfe einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (Eluent A: Wasser, Eluent B: Ethanol, Eluent C: 50 % Ethanol mit 2,5 % HCOOH)	91

- Tab. 4-1: Reproduzierbarkeit (n = 3) einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilchprobe (Lactoseabtrennung durch Sephadex[®] (30min-Lauf)-Größenausschlusschromatographie, Analytik der Fraktion V2-5), Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Analyse durch HPAEC 102
- Tab. 4-2: Ermittlung der Reproduzierbarkeit (n = 2 für Ethanol, n = 5 für Acetonitril) und Wiederfindung nach Standardaddition (n = 4 für Ethanol, n = 3 für Acetonitril) der nach GCC-SPE-Aufarbeitung (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 µl), sowie Ermittlung der Wiederfindung von reinen OS-Mix (n = 3 für Ethanol und Acetonitril) mit dem Eluationssystem Acetonitril und dem Eluationssystem Ethanol, Analyse durch HPAEC-PAD, Quantifizierung mittels externer OS-Standards 114
- Tab. 4-3: Analysenwerte für die Mess-/Methodenpräzision sowie Wiederholbarkeit der Zuckerstandards nach der Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“ zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC, n = 10 für Messpräzision, n = 6 für Methodenpräzision, je 10 mg/l)..... 126
- Tab. 4-4: Linearität der Zuckerstandards nach der Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“ zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC, Fünf-Punkt-Kalibrierung)..... 127
- Tab. 4-5: Nachweis (NWG)- und Bestimmungsgrenze (BG) der Zuckerstandards nach DIN 32645 zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC)..... 127
- Tab. 4-6: Analysenwerte für die Mess-/Methodenpräzisionen sowie Wiederholbarkeiten der Zuckeranalyten einer entfetteten, weitgehend proteinfreien, OS-aufgereinigten zur Validierung der Milchprobenaufarbeitung (mittels GCC-SPE) Kuhmilch nach Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Analytik mittels HPAEC, n = 10 für Messpräzision, n = 6 für Methodenpräzision) 128
- Tab. 4-7: Analysenwerte für die Methodenpräzision der Zuckeranalyten einer enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösung zur Validierung der Carrez-Fällung (chromatographische Reihenfolge, β -Galactosidase aus *K. lactis*, Lactozym, T = 40 °C, pH 7, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose), Quantifizierung mittels externer OS-Standards oder Auswertung anhand der Peakflächen im HPAEC-Chromatogramm, Analytik mittels HPAEC, n = 6 130

- Tab. 4-8: Lactosekonzentration verschiedener Nutztierarten nach Bestimmung mittels Resorcinol-Schwefelsäure-Test (n = 4) oder HPAEC-PAD (n = 3, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)..... 133
- Tab. 4-9: MOS-Gehalte im UF-Magermilchpermeat verschiedener Nutztierarten (Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE, Analytik: HPAEC-PAD/IT-MS, Lactosegehalte nach Souci et al. [2008], Verhältnis MOS zu Lactose mit den mittels Standardsubstanzen quantifizierbaren MOS)..... 155
- Tab. 4-10: Gehalte der MOS 3'-SL, 6'-SL und GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie der Kohlenhydrate Lactose und Galactose in Proben der Produktströme von UTM (Analytik der MOS: HPAEC-PAD/IT-MS, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Probenaufarbeitung: (wenn nötig) Entfettung, Proteinentfernung durch Ultrafiltration und Aufreinigung mittels GCC-SPE (n = 2), Analytik von Lactose und Galactose durch UTM) 160
- Tab. 4-11: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* („Lactozym“) bei 6 U/g, 12 U/g und 24 U/g (40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung) 172
- Tab. 4-12: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit der β -Galactosidase aus *A. oryzae* oder *K. lactis* verschiedener Hersteller (40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung) 173
- Tab. 4-13: Optimale Ausbeute des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit den β -Galactosidasen aus *K. lactis* (pH 7,0, „Lactozym“), *A. oryzae* (pH 4,5, „Tolerase“) und *B. circulans* (pH 4,0) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Berechnung der GOS-Konzentration [g/100ml] aus der Differenz zwischen dem Ausgangslactosegehalt und der Summe aus Glucose-, Galactose- und Lactosekonzentration, in Klammern: GOS-Konzentration nach Abzug der Disaccharide, Analyse: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung) 181
- Tab. 4-14: HPAEC-Retentionszeit, Molekulargewicht (gemessen und theoretisch) sowie vermutete Substanz der einzelnen Analyten aus Abb. 4-41 der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen..... 184

Tab. 4-15: Trennprogramm für die Aufreinigung von OS mit Hilfe einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (Eluent A: Wasser, Eluent B: Ethanol, Eluent C: 50 % Ethanol mit 2,5 % HCOOH)	224
Tab. 4-16: Enzymatisch hergestellte und mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle aufgereinigte, GOS-haltige Proben, die für die orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung zur Verfügung stehen (DGL = Digalactosyllactose = Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, TGL = Trigalactosyllactose = Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc)	238
Tab. 6-1: Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden (Vivinal [®] GOS = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma FrieslandCampina Domo EMEA, Purime [™] GOS = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma GTC Nutrition, Oligomate 55P [®] = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., DP = Grad der Polymerisation der GOS-Substanz, SCFA = short chain fatty acid = kurzkettige Fettsäuren)....	251
Tab. 6-2: Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden (m/z = Molmasse; I = Anzahl der bisher detektierten, möglichen Isomere, pp = postpartum, Q = Quadrupol)	256
Tab. 6-3: Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden (HMOS = Humanmilch-Oligosaccharide, BMO = bovine, milcheigene Oligosaccharide, DP = Grad der Polymerisierung)	320
Tab. 6-4: Literaturübersicht zur enzymatischen Bildung von Galacto-Oligosacchariden..	329
Tab. 6-5: Pipettierschema für die enzymatische Lactosebestimmung.....	331
Tab. 6-6: Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow [™] von GE Healthcare	337
Tab. 6-7: Daten zur Herstellung der Vereinigungen nach dem 30min- bzw. 180min-Lauf der Sephadex [®] -Größenausschlusschromatographie	339
Tab. 6-8: ¹ H NMR und ¹³ C NMR des Trisaccharids GOS1-1 (Analyse mit D ₂ O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_H 2.225; δ_C 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)	344
Tab. 6-9: ¹ H NMR und ¹³ C NMR des Trisaccharids GOS2-1 (Analyse mit D ₂ O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_H 2.225; δ_C 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)	344
Tab. 6-10: ¹ H NMR und ¹³ C NMR des Tetrasaccharids GOS2-2 (Analyse mit D ₂ O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_H 2.225; δ_C 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)	345

Tab. 6-11: ^1H NMR und ^{13}C NMR des Pentasaccharids GOS2-3 (Analyse mit D_2O bei $27\text{ }^\circ\text{C}$, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)	345
Tab. 6-12: Gehalte, Anteil am Gesamtzucker und Wiederfindung (im Vergleich zur Ausgangssubstanz) von Galactose, Glucose, Lactose und GOS (berechnet mit der externen Lactosekalibrierung, bestehend aus Di- bis Pentasacchariden) nach Aktivkohle-Aufreinigung (siehe 4.4.2.1) der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> : 12 U/g, $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7, 5 h; GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> : 12 U/g, $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 4,5, 4 h; GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>B. circulans</i> : 12 U/g, $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 4, 5 h).....	347

1 Einleitung und Zielstellung

Oligosaccharide (OS) sind Kohlenhydrate, denen eine bifidogene Wirkung [Gibson et al., 2004], stimulierende Effekte auf das Immunsystem sowie Schutz gegen bakterielle und virale Infektionen [[Kunz and Rudloff, 2006] und [Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001]] zugeschrieben werden. Die gesundheitsfördernde Wirkung von Humanmilch wird zu einem wesentlichen Teil den hohen Gehalten an Oligosacchariden zugeschrieben. Die Humanmilch weist im Gegensatz zur Milch der meisten bisher untersuchten Säugetiere einen hohen Anteil an komplexen Oligosacchariden auf [[Martinez-Ferez et al., 2006] und [Kunz and Rudloff, 2006]]. Humanmilch ist allerdings nicht in größeren Mengen verfügbar und steht daher nicht für die Herstellung Oligosaccharid-angereicherter Lebensmittel zur Verfügung. Bisher ist v. a. Säuglingsnahrung mit Zusatz der als bifidogen anerkannten Galacto-Oligosacchariden (GOS) und Fructo-Oligosacchariden (FOS) erhältlich [Gibson et al., 2004]. Die Mischung aus GOS und FOS entspricht jedoch nur im geringen Maß der Zusammensetzung der Oligosaccharide in Humanmilch, wird aber mangels besserer Alternativen als Ersatz genutzt. Die Entwicklung neuer humanmilchähnlicher, funktioneller, bioaktiver Lebensmittel (z. B. Trinkmilch oder Joghurt), die Oligosaccharide mit einer möglichen Gesundheitswirkung („Health Claim“) enthalten, ist daher von besonderem Interesse.

Ziel dieser Arbeit ist es, geeignete Verfahren zu entwickeln, um - unter Ausnutzung der Transferaseaktivität von β -Galactosidase - komplexe Galacto-Oligosaccharide aus Lactose zu synthetisieren und nicht-proteingebundene, komplexe milcheigene Oligosaccharide (MOS) aus Kuhmilch aufzureinigen und zu charakterisieren. Eine Aufreinigung ist notwendig, da Oligosaccharide in Kuhmilch nur als Minorkomponente mit einem Lactose-MOS-Verhältnis von ca. 1000:1 vorliegen. Inwieweit Variationen in der Milch verschiedener Tierarten Möglichkeiten zur züchterischen Beeinflussung des Gehaltes an erwünschten Oligosacchariden bieten, ist bislang kaum untersucht worden. Bisher ist nur wenig über die Struktur-Wirkungs-Beziehung von Oligosacchariden in Bezug auf deren gesundheitsfördernde Eigenschaften bekannt. Daher erfolgt im Rahmen dieser Arbeit eine chemisch-analytische Charakterisierung der gewonnenen, für die Bewertung der physiologischen Wirksamkeit relevanten Oligosaccharide.

Diese Arbeit befasst sich mit folgenden Herausforderungen:

- Entwicklung von Methoden zur Analytik (Identifizierung und Quantifizierung) von Oligosacchariden inklusive photometrischer Schnellmethoden (Kapitel 4.1)
- Identifizierung und Quantifizierung von milcheigenen Oligosacchariden in Milchproben verschiedener Nutztierarten und in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie (Kapitel 4.2)
- Enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β -Galactosidasen (Kapitel 4.3)
- Aufreinigung von Oligosaccharide (Kapitel 4.4)
- Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung von Oligosacchariden (Kapitel 4.5)
- Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Milchprodukts im Labormaßstab (Kapitel 4.6)

Die enzymatische Synthese der GOS und die Aufreinigung der Oligosaccharide erfolgen dabei so, dass eine spätere großtechnische Umsetzung und damit verbundene Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels durchgeführt werden kann.

2 Theoretischer Teil

2.1 Charakterisierung des Untersuchungsmaterials Milch

2.1.1 Definitionen

Laut Milch- und Margarinegesetz §2 versteht man unter Milch „[...] das durch ein- oder mehrmaliges Melken gewonnene Erzeugnis der normalen Eutersekretion von zur Milcherzeugung gehaltenen Tierarten [...]“. Milch verschiedener Tierarten werden durch das Hinzufügen der entsprechenden Tierart gekennzeichnet (z. B. Ziegenmilch oder Schafsmilch) und unterliegt denselben Qualitätsanforderungen wie Kuhmilch [Spreer, 2011]. Da Milch die erste und einzige Nahrung eines Säuglings ist, muss diese mit allen notwendigen Nährstoffen ausgestattet sein [Töpel, 1991].

Laut EG-Verordnung Nr. 1162/2006 Abschnitt IX versteht man unter Kolostrum „[...] das bis zu 3 bis 5 Tagen nach einer Geburt aus den Milchdrüsen milchgebender Tiere abgesonderte Sekret, das reich an Antikörpern und Mineralstoffen ist und der Erzeugung von Rohmilch vorausgeht [...]“. Das Kolostrum darf bis einschließlich des sechsten Tages nach der Geburt nicht als Rohmilch deklariert werden [Spreer, 2011].

2.1.2 Eigenschaften und Zusammensetzung von Milch

„[...] Milch ist eine weiße bis gelblich-weiße undurchsichtige Flüssigkeit, deren Farbe durch die Lichtstreuung und –absorption an Fetttröpfchen und Proteinmizellen bedingt ist. [...] Die Farbe rührt vom Carotin der Fettphase (v. a. bei der Weidefütterung) und vom Riboflavin der wässrigen Phase her [...]“ [Belitz et al., 2008]. Im Allgemeinen wird Milch als typisch, rein, vollmundig und leicht süß im Geschmack sowie ebenso typisch und rein im Geruch beschrieben. Die Konsistenz weist Merkmale wie homogen, ohne Klümpchen und Flockenbildung auf [Spreer, 2011]. Der pH-Wert von frischer Milch liegt bei ca. 6,5 bis 6,75 und der Gefrierpunkt bei -0,53 °C bis -0,55 °C. Mit Hilfe des Gefrierpunktes können Verwässerungen der Milch nachgewiesen werden [Belitz et al., 2008].

Milch liegt als ein polydisperses System vor, in dem die „[...] einzelnen Bestandteile in verschiedenen großen Teilchen und unterschiedlichen Verteilungsgraden (Dispersionsgraden) im Wasser vorkommen [...]“. Dabei kann die Fettphase und die wässrige Phase durch Zentrifugation voneinander getrennt werden [Spreer, 2011].

Die Zusammensetzung der Milch (siehe Tab. 2-1) variiert je nach Tierart [Töpel, 1991]. Faktoren wie Rasse, individuelle Besonderheit der Kuh, Fütterung, Haltung, Gesundheitszustand, Laktationszeit und Alter des Säugetieres spielen ebenso eine große Rolle [Spreer, 2011].

Tab. 2-1: Zusammensetzung der Milch verschiedener Tierarten (Quelle: Souci et al., [1991] und Souci et al., [2008])

Herkunft der Milch	Protein [g/100g]	Lactose [g/100g]	Fett [g/100g]	Mineralstoffe [g/100g]	Wasser [g/100g]
Mensch	1,1	7,0	4,0	0,2	87,5
Kuh	3,3	4,7	3,8	0,7	87,2
Schaf	5,3	4,6	6,3	0,9	82,7
Ziege	3,7	4,2	3,9	0,8	86,6
Pferd	2,2	6,2	1,5	0,4	87,7
Kamel	5,1	4,8	4,1	0,6	85,4

Humanmilch hebt sich stark von Kuh-, Schafs-, Ziegen-, Pferde- und Kamelmilch ab. Insbesondere der Proteingehalt ist deutlich geringer und der Lactosegehalt wesentlich höher. Pferdemilch ist der Humanmilch am ähnlichsten, u. a. hinsichtlich des Proteingehalts (1,1 g/100g vs. 2,2 g/100g) und des Lactosegehalts (7,0 g/100g vs. 6,2 g/100g), weist jedoch einen deutlich geringeren Fettgehalt auf (4,0 g/100g vs. 1,5 g/100g). Der Proteingehalt von Kuh-, Schafs-, Ziegen- und Kamelmilch liegt zwischen 3,3 g/100g und 5,3 g/100g, der Lactosegehalt zwischen 4,2 g/100g und 4,8 g/100g. Der Wassergehalt der untersuchten Tiermilchproben liegt deutlich über 80 %.

Milch ist eine wichtige Quelle zur Deckung des menschlichen Bedarfs an Eiweiß, Calcium, Phosphor (Mineralstoffe) sowie Vitamin B₂ [Töpel, 1991]. Außerdem sind reichlich Kohlenhydrate sowie minore Anteile an Oligosacchariden enthalten.

2.1.3 Wertgebende Inhaltsstoffe der Milch

2.1.3.1 Kohlenhydrate

Nach Matissek and Steiner [2006] „[...] handelt es sich bei den Kohlenhydraten um Polyhydroxycarbonyl-Verbindungen sowie einige davon abgeleitete, strukturelle ähnliche Stoffe [...]“. Die Einteilung der Kohlenhydrate erfolgt in Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide [Matissek and Steiner, 2006]. Das wichtigste Kohlenhydrat der Milch ist das Disaccharid Lactose mit einer Summenformel von $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot x H_2O$. Lactose ist aus den beiden Monosacchariden Galactose und Glucose aufgebaut, welche β -glycosidisch am C1 der Galactose und C4 der Glucose verknüpft sind [Spreer, 2011]. Daraus ergibt sich der IUPAC-Name D-Galactopyranosyl- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucofuranose (siehe Abb. 2-1).

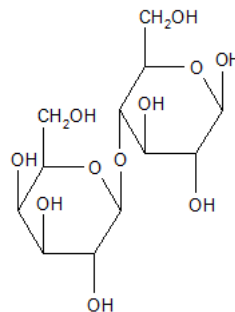


Abb. 2-1: Strukturformel des Disaccharides Lactose (β -Anomer)

Lactose ist ein weißer Feststoff mit geringer Süßkraft und schlechter Löslichkeit in Wasser [Spreer, 2011]. Durch Anwärmen der gesättigten Lactose-Lösung kann die Löslichkeit jedoch deutlich verbessert werden. Die Löslichkeit hängt von der Verteilung der anomeren Konfiguration, d. h. der α - oder β -Form der Lactose ab [Belitz et al., 2008]. Durch das Enzym Lactase (= β -Galactosidase, EC 3.2.1.23) kann Lactose enzymatisch in seine Monomere hydrolysiert werden [Töpel, 1991]. Lactose ist v. a. in Milchprodukten an der Maillard-Reaktion zur Verfärbung bzw. Geschmacks- und Geruchsveränderung des Lebensmittels beteiligt. Die Maillard-Reaktion (nichtenzymatische Bräunung) ist eine Reaktion zwischen freien Aminogruppen der Proteine und reduzierenden Zuckern unter Wärmeeinwirkung, wobei in der Milch überwiegend Lactose und die freie Aminosäure Lysin reagieren [Töpel, 1991].

Kohlenhydrate sind auf Grund der großen Anzahl an Hydroxylgruppen stark hydrophil. Dadurch sind diese wasserlöslich, teilweise löslich in niedermolekularen Alkoholen wie

Ethanol und unlöslich in Hydrocarbonen, Chloralkanen und Ethern [Scherz and Bonn, 1998]. Außerdem sind Kohlenhydrate nicht UV-aktiv [Matissek and Steiner, 2006], was für die Analytik entscheidend ist (siehe Kapitel 2.4).

Weitere wichtige Kohlenhydrate der Milch sind die Oligosaccharide, die im Kapitel 2.2 definiert und charakterisiert werden.

2.1.3.2 Milchproteine

Milchproteine sind keine homogene Stoffklasse. Viel mehr können diese in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich wesentlich in ihren Eigenschaften unterscheiden: Caseine und Molkenproteine (Serumproteine).

Caseine sind im schwach sauren Bereich unlöslich und fallen bei pH 4,6 (20 °C) in der Milch aus. Diese Eigenschaft wird v. a. bei der Käseherstellung genutzt [Belitz et al., 2008]. In der Milch liegen Caseine als Micellen vor, wobei die Größe der Micellen von der Calciumkonzentration abhängig ist. Mit ansteigender Calciumkonzentration kommt es zu einer Vergrößerung der Caseinmicelle. Die Casein-Fraktion kann nochmals in α_{S1} -, β -, κ - und γ -Casein mit jeweils unterschiedlichen Anteilen (siehe Tab. 2-2) unterteilen werden [Töpel, 1991].

Die bei pH 4,6 und 20 °C in der Lösung verbleibenden Proteine werden als Molkenproteine bezeichnet. Die Hauptbestandteile der Molkenproteine (siehe Tab. 2-2) sind Immunoglobuline, Rinderserumalbumin, β -Lactoglobulin, α -Lactalbumine und Proteosen-Pepton-Fractionen. Die wenig säureempfindlichen Molkenproteine können mit erhöhter Temperatur ausgefällt werden [Belitz et al., 2008]. Dabei wird die Disulfidbrückenbindung des Cystins, das im Molkenprotein zu einem höheren Anteil vertreten ist als im Casein, gespalten. Es entsteht Schwefelwasserstoff und verursacht Kochgeschmack [Töpel, 1991].

Tab. 2-2: Anteile der verschiedenen Bestandteile an Caseinen und Molkenproteinen am Gesamt-Milchprotein [Töpel, 1991]

Milchproteine			
Caseine (78 % - 85 %)		Molkenproteine (15 % - 22 %)	
α S1-Casein	35 % - 45 %	β -Lactoglobulin	7 % - 12 %
β -Casein	25 % - 35 %	Proteosen-Pepton-Fraktionen	2 % - 6 %
κ -Casein	8 % - 15 %	α -Lactalbumine	2 % - 5 %
γ -Casein	3 % - 7 %	Immunoglobuline	1,9 % - 3,3 %
		Rinderserumalbumin	0,7 % - 1,3 %

In geringem Umfang können Milchproteine z. T. glycosyliert werden, wodurch sogenannte Glycoproteine in Milch detektierbar sind.

2.1.3.3 Minore Inhaltsstoffe

2.1.3.3.1 Salze

Milchsätze, insbesondere Calcium und Phosphor, sind für die menschliche Ernährung sehr wertvoll, da diese beim Aufbau der Knochen des Skelettsystems und der Zähne von großer Bedeutung sind. Ein weiterer wichtiger Mineralstoff ist Kalium, der bei Mangelernährung zur Beeinträchtigung der Herzfunktion führen kann. Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Citrat und Hydrogencarbonat wirken in der Milch als Puffersystem und verhindern eine zu schnelle pH-Wert-Änderung [Töpel, 1991].

2.1.3.3.2 Vitamine

Die lebensnotwendigen Vitamine A, C, D, E und einige Vitamin B-Varianten sind in der Milch vertreten. Dabei schwankt deren Gehalt auf Grund verschiedener Faktoren wie der Art der Fütterung und dem Gesundheitszustand des Tieres. Der tägliche Vitaminbedarf kann jedoch nicht einzig durch die Milchzufuhr gedeckt werden. Die gelbliche Farbe der Molke wird durch das Vitamin B₂ (Riboflavin) hervorgerufen [Töpel, 1991]. Ein Großteil der

Vitamine sind temperatur- und lichtempfindlich, was jedoch nicht für Riboflavin zutrifft [Spreer, 2011].

2.2 Oligosaccharide

2.2.1 Definition von Oligosacchariden

Oligosaccharide sind „[...] Kohlenhydrate aus < 10 Kohlenhydratbausteinen, die formal aus Monosacchariden unter Wasserabspaltung (...) zu Vollacetalen polymerisieren. [...]“ [Belitz et al., 2008]. Mono- und Disaccharide wie Lactose oder Lactulose werden häufig nicht zu den Oligosacchariden gezählt, wohingegen längerkettige Saccharide mit mehr als zehn Monomeren wiederum zu dieser Stoffklasse gehören [McSweeney and Fox, 2009]. Strukturähnliche Stoffe mit diversen Substituenten, wie z. B. N-Acetylglucosaminsäure, zählen ebenso zu den Oligosacchariden.

2.2.2 Einteilung der Oligosaccharide

Durch die strukturelle Vielfalt der Oligosaccharide ist eine Einteilung in Untergruppen sehr schwierig. Auf der einen Seite kann nach der Herkunft der Oligosaccharide differenziert werden, wie z. B. milcheigene Oligosaccharide, andererseits nach deren chemischer Beschaffenheit. Dabei kann v. a. zwischen sauren und neutralen Oligosacchariden unterschieden werden. Allerdings vermischen sich diese Gruppen untereinander, da milcheigene Oligosaccharide sowohl saure als auch neutrale Oligosaccharide aufweisen.

In dieser Arbeit wird besonderer Wert auf die milcheigenen Oligosaccharide sowie die neutralen, synthetisierten Oligosaccharide – speziell Galacto-Oligosaccharide – gelegt. Daher werden nachfolgend speziell die GOS und die MOS näher charakterisiert.

2.2.2.1 Galacto-Oligosaccharide

2.2.2.1.1 Struktur von Galacto-Oligosacchariden

Galacto-Oligosaccharide sind Oligosaccharide, die aus mehreren Galactose-Monomeren und einem terminalen Glucoserest bestehen. Dabei sind diverse β -glycosidische Verknüpfungen und Kettenlängen möglich, woraus sich eine Vielzahl von Strukturen ergibt [McSweeney and Fox, 2009]. Der Galactoserest kann dabei an vier verschiedenen Positionen an die Glucose

binden (C2, C3, C4 und C6), so dass vier mögliche Isomere entstehen können. Des Weiteren sind zwei anomere Konfigurationen (α - oder β -Form) der Galactoseeinheit möglich, womit sich die Anzahl der Isomere auf 8 erhöht. Der Galactoserest kann außerdem entweder in Form einer Furanose oder einer Pyranose vorliegen. So beträgt die Anzahl der Isomere insgesamt 16. Daraus wird ersichtlich, dass eine Vielfalt von GOS existent ist, da auch die anderen Monomere einer Substanz diese Möglichkeiten der Isomerenbildung besitzen [McSweeney and Fox, 2009].

Die allgemeine Formel für GOS lautet $\text{Gal}_n\text{-Glc}$, wobei n typischerweise von 1 bis 5 reicht [[Gosling et al., 2010] und [Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001]]. Eines in der Lebensmittelindustrie bedeutendsten Galacto-Oligosaccharide ist die 6'-Galactosyllactose (6'-GL), die zwischen den Galactose-Einheiten β -(1 \rightarrow 6) und zum terminalen Glucoserest hin β -(1 \rightarrow 4) glycosidisch verknüpft ist (siehe Abb. 2-2).

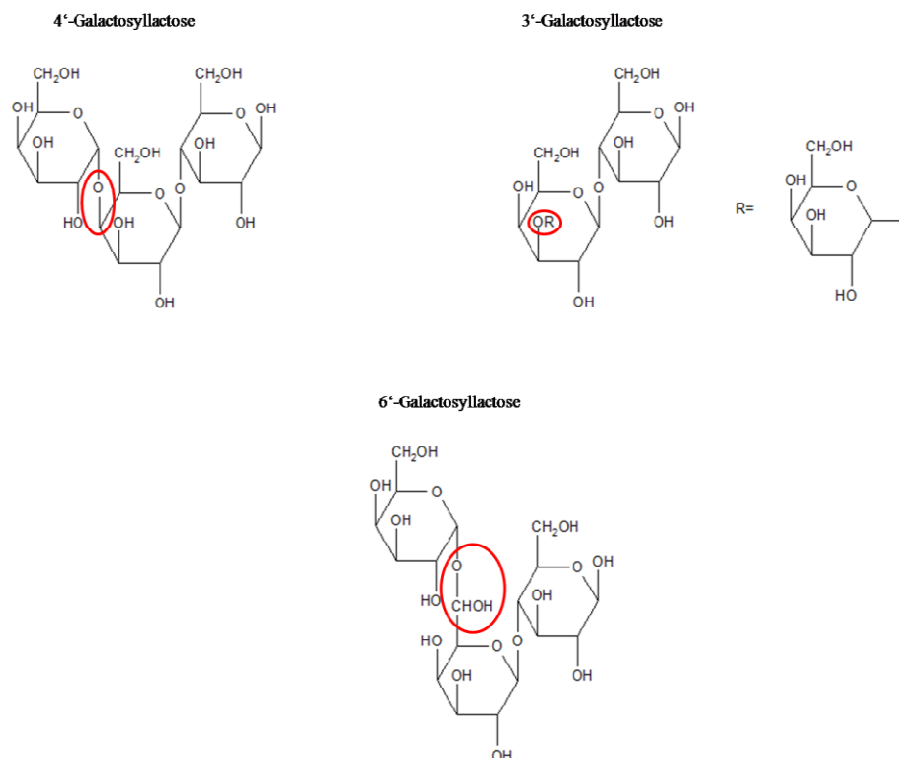


Abb. 2-2: Struktur von 3'-, 4'- und 6'-Galactosyllactose

Ebenso sind β -(1 \rightarrow 4) und β -(1 \rightarrow 3)-Verknüpfungen der Galactose-Einheiten untereinander möglich, wobei 4'-Galactosyllactose (4'-GL) und 3'-Galactosyllactose (3'-GL) entstehen (siehe Abb. 2-2).

2.2.2.1.2 Vorkommen und Gehalte von Galacto-Oligosacchariden

GOS kommen nativ in Human- und Kuhmilch [Gänzle, 2012] sowie in fermentierten Milchprodukten, Brot, Marmelade, Süßwaren und Getränken vor [Splechna et al., 2007]. Die GOS-Gehalte liegen in Rohmilch im Spurenbereich [Gänzle, 2012]. Traditionelle Joghurts weisen GOS-Gehalte von 0,22 % bis 0,25 % auf. Mit Mikroorganismen behandelte Milchprodukte besitzen dabei einen leicht erhöhten GOS-Gehalt (mit *Bifidobakterien* behandelte kommerzieller Joghurt: 0,36 % - 0,58 %, mit *Lactobacillus casei* behandelte Trink-Joghurt: 0,29 % - 0,44 % GOS), wobei die GOS-Substanzen 6'-Galactobiose (Gal- β -(1 \rightarrow 6)-Gal), 6'-Galactosyllactose (Gal- β -(1 \rightarrow 6)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc), 3'-Galactosyllactose (Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc) und 3-Galactosylglucose (Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Glc) detektiert werden konnten. Dabei bleiben die GOS-Gehalte während einer 21-tägigen Lagerung bei 4 °C unverändert [Martinez-Villaluenga et al., 2008]. Erhöhte GOS-Gehalte konnten auch in lactosefreien Milchprodukten nachgewiesen werden (lactosefreie UHT-Milch: 9,5 g/100ml - 43,5 g/100ml, lactosefreie UHT-Trinkmilch: 6,0 g/100ml - 22,6 g/100ml) [Ruiz-Matute et al., 2012]. GOS werden u. a. in Holland, Australien und Japan industriell hergestellt und als funktioneller Lebensmittelbestandteil v. a. in der Säuglings- und Kindernahrung eingesetzt [McSweeney and Fox, 2009].

2.2.2.1.3 Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden

Galacto-Oligosaccharide sind gut wasserlöslich [Belitz et al., 2008] und farblos [McSweeney and Fox, 2009]. Außerdem sind sie hitze- und basenstabil, jedoch leicht hydrolysierbar durch Säure [McSweeney and Fox, 2009]. Die GOS sind bis zum Dickdarm unverdaulich und werden erst im Bereich des Intestinaltrakts abgebaut [[Belitz et al., 2008] und [McSweeney and Fox, 2009]], wodurch sich die potentiell prebiotische bzw. bifidogene Wirkung (Definition siehe Kapitel 2.3) der GOS ergibt. Eine Literaturübersicht zur potentiell prebiotischen Wirkung der GOS ist im Anhang (siehe Tab. 6-1) dargestellt. Aus dieser Literaturübersicht lässt sich erkennen, dass GOS v. a. das Wachstum von *Bifidobakterien* und *Lactobazillen* fördern. Das gleichzeitig verringerte oder stagnierende Wachstum von *Bacteroiden*, *E. coli* und *Clostridien* wird in der Literatur zum Teil sehr kontrovers diskutiert. Durch die so beeinflusste Mikroflora des Darmes kommt es zur vermehrten Bildung von SCFA (short chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren) und zur damit verbundenen Absenkung des pH-Wertes im Darm. Diese prebiotischen Effekte von GOS sind dosisabhängig und weisen eine große stammspezifische und substratspezifische Wirksamkeit auf. So können

GOS mit unterschiedlichen glycosidischen Verknüpfungen und Kettenlängen die untersuchten Mikroorganismen auf verschiedene Art und Weise beeinflussen. Ein einheitliches Bild ist dabei nicht zu erkennen, wodurch Ergebnisse von einer GOS-Substanz mit einem Bakterienstamm nicht auf andere GOS bzw. Mikroorganismen übertragen werden können [[Saad et al., 2013] und [Gonzalez-Rodriguez et al., 2013]]. Relevante Nebenwirkungen für die Allgemeinbevölkerung sind nicht bekannt, weshalb der Einsatz von GOS als Probiotika als unbedenklich gilt [Bischoff and Kochling, 2012].

Den GOS werden potentiell antiinflammatorische Wirkungen zugewiesen. Dieser Effekt ist in der Literatur jedoch sehr umstritten, da bisher nur sehr wenige Daten von GOS als Einzelsubstanzen bekannt sind. Bis dato wurden v. a. Mischungen aus GOS und FOS (Fructo-Oligosaccharide), wie sie in der Säuglingsnahrung eingesetzt werden, untersucht. Ein Vergleich der diversen veröffentlichten Ergebnisse gestaltet sich schwierig, da verschiedene Marker und Testsysteme eingesetzt wurden. Die Literaturdaten, welche GOS als Einzelsubstanz untersucht haben, sind in Tabelle 6-1 im Anhang dargestellt. Aus der Tabelle wird deutlich, dass die Schwere von Dickdarmerkrankungen möglicherweise durch vorherige GOS-Gabe rückläufig ist, wodurch sich der medizinische Status des Patienten verbessert. Durch die GOS-Aufnahme scheint die Produktion von diversen Interleukinen wie IL6, IL8 oder IL15 gesteigert worden zu sein. Eine eindeutige Aussage zur antiinflammatorischen Wirkung der GOS ist dabei nicht möglich, da zu wenige Daten vorliegen und v. a. bisher wenige Humanstudien mit reiner GOS-Substanz durchgeführt wurden.

Den GOS-Substanzen werden eine antikariogene Wirkung, eine Reduktion von toxischen Metaboliten, eine wahrscheinliche Reduktion von Darmkrebs, das Vorbeugen von Allergien, eine ansteigende Mineralabsorption (und die damit verbundene verbesserte Knochenmineralisierung) und eine Inhibierung von Pathogenen zugeschrieben [[Macfarlane et al., 2008], [Bischoff and Kochling, 2012] und [McSweeney and Fox, 2009]]. Dies deutet neben dem potentiell prebiotischen und dem potentiell antiinflammatorischen Effekt der GOS auf einen potentiell immunmodulierenden Effekt hin.

2.2.2.1.4 Anwendung von Galacto-Oligosacchariden

Das Hauptanwendungsgebiet der GOS liegt in der Säuglingsnahrung. Es bestehen große Unterschiede hinsichtlich der Infektionshäufigkeiten (v. a. des Gastro-Intestinal-Traktes und der Atemwege) von Säuglingen, abhängig von deren Nahrung. Gestillte Säuglinge zeigen eine

deutlich geringere Häufigkeit und Schwere von Infektionen im Vergleich zu nichtgestillten Säuglingen. Durch die Zugabe von GOS-FOS-Mischungen zur Säuglingsnahrung bei nichtgestillten Säuglingen konnte die Häufigkeit und Schwere von Infektionskrankheiten verringert werden. Mit dieser GOS-FOS-Mischung wird der „Gold Standard“ der Ernährung von Säugling (das Stillen) imitiert. Die Sublimation von Humanmilcholigosacchariden ist jedoch schwierig, da durch die GOS-FOS-Mischungen die Vielfalt, Variabilität, Komplexität und Polymorphie nur im geringen Maße nachgeahmt werden können [Scientific Committee on Food (SCF), 2003]. Laut SCF [2001, 2003] ist ein Zusatz von 0,8 g/100ml einer GOS-FOS-Mischung (GOS:FOS = 9:1) in Säuglingsnahrung und Folgenahrung gesundheitlich unbedenklich. Positive Effekte werden dabei bereits ab einer Dosis von 0,6 g/100ml erreicht [SCF, 2001]. Nach McSweeney and Fox [2009] liegt die effektive Dosis der GOS-Zufuhr bei 10 g/Tag - 20 g/Tag. Bei der Zugabe von nicht verdaubaren Kohlenhydraten (wie GOS und FOS) müssen nach SCF [2003] potentiell Ernährungs- und physiologische Effekte nachweisbar sein. Da bisher nur wenig über einen Zusammenhang zwischen Mikroflora, bestehend v. a. aus Bifidobakterien, und Gesundheit des Neugeborenen bekannt ist, kann die gesundheitsfördernde Wirkung der GOS noch nicht bestätigt werden. Dazu sind mehr Informationen über Sicherheit und Eignung der GOS nötig. Laut European Food Safety Authority (EFSA) [2011] können auch die Health Claims „Reduction of gastro-intestinal Discomfort“ und „Decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganismen“ für GOS nicht erfüllt werden, da kein Zusammenhang zwischen der Wirkung der GOS und dem Claim nachweisbar ist. Dies ist u. a. auf das Fehlen von Humanstudien zurückzuführen.

Neben dem Einsatz in der Säuglingsnahrung werden GOS auch in der Getränke- und Süßspeisenindustrie eingesetzt, um Viskosität, Emulsionsfähigkeit, Gelbildung, Gefrierpunkt und Farbe des Lebensmittels zu modifizieren [Saad et al., 2013].

2.2.2.2 Milcheigene Oligosaccharide

2.2.2.2.1 *Struktur von milcheigenen Oligosacchariden*

Die milcheigenen Oligosaccharide basieren bis auf wenige Ausnahmen auf dem Disaccharid Lactose als Kernstruktur, das am reduzierenden Ende durch unterschiedlichste spezifische Monosaccharide verlängert ist. Die Monomere der MOS (siehe Abb. 2-3) sind v. a. Glucose (Glc), Galactose (Gal), Fucose (Fuc), N-Acetylglucosaminsäure (GlcNAc),

N-Acetylgalactosaminsäure (GalNAc), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac).

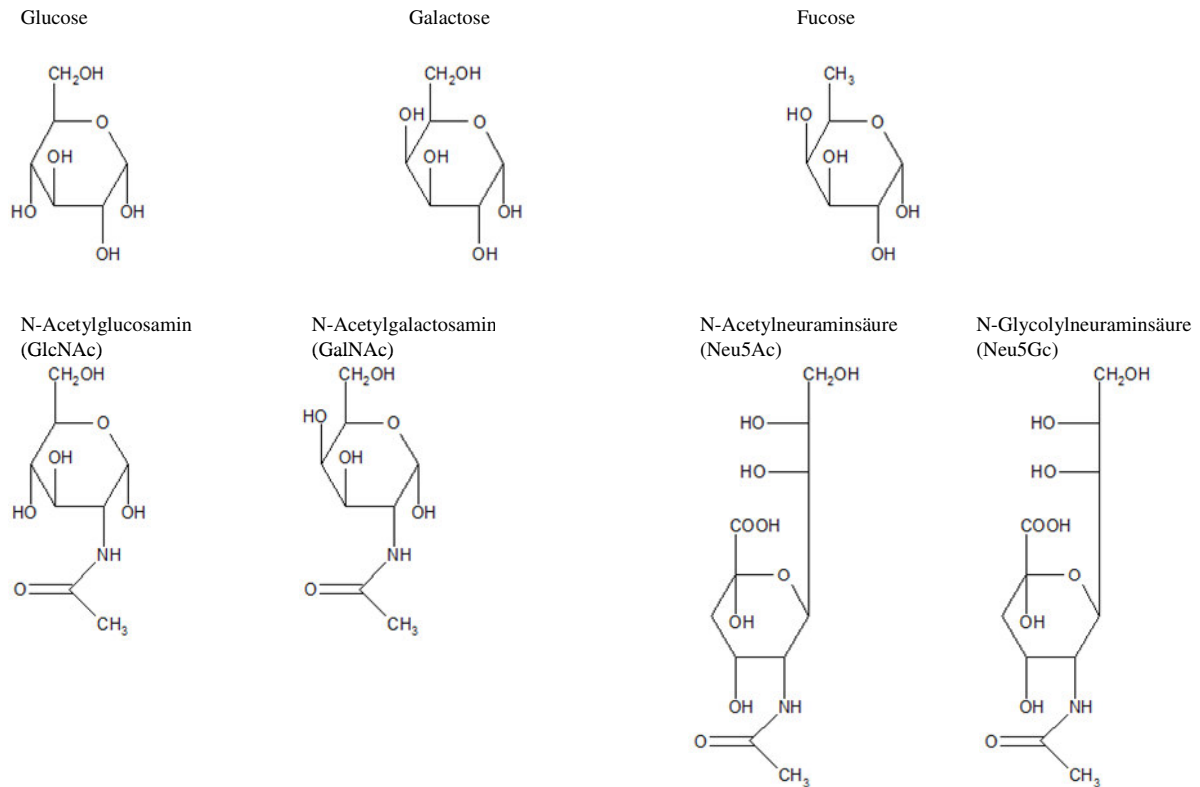


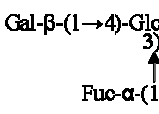
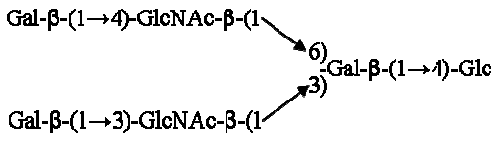
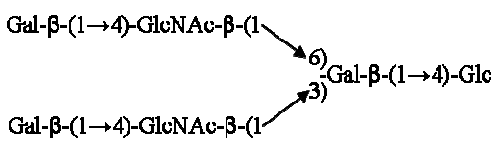
Abb. 2-3: Strukturen der möglichen Monomere von MOS

Durch Kombination dieser Monomere in verschiedener Reihenfolge, Kettenlänge und Verknüpfung mit dem Disaccharid Lactose wurden bisher über 200 MOS detektiert [[Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001], [Kunz and Rudloff, 2006], [Mehra and Kelly, 2006] und [Donovan 2009]].

Einfache MOS entstehen dabei durch die glycosidische Verknüpfung von Lactose mit nur einem Monomer wie z. B. N-Acetylneuraminsäure oder Fucose. Dabei entstehen die Verbindungen Sialyllactose und Fucosyllactose, welche sich wiederum durch verschiedene Verknüpfungen unterscheiden. Für diese Arbeit sind die MOS 3'-Sialyllactose (3'SL, Neu5Ac- α -(2 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc), 6'-Sialyllactose (6'SL, Neu5Ac- α -(2 \rightarrow 6)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc), 2'-Fucosyllactose (2'-FL, Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc) und 3-Fucosyllactose (3-FL, Fuc- α -(1 \rightarrow 3)-[Gal- β -(1 \rightarrow 4)]-Glc) von besonderer Bedeutung (siehe Tab. 2-3). Diese sind als Standardsubstanzen kommerziell erhältlich und somit eine Quantifizierung in den unterschiedlichen Tiermilchproben möglich.

Die komplexen MOS werden unterteilt in Oligosaccharide, die neben dem Lactosekern noch Typ-I-Einheiten (Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc) oder Typ-II-Einheiten (Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc) als Grundsubstanz aufweisen. Dabei überwiegt Typ-I in Humanmilch und Typ-II in Milch anderer Tierarten [McSweeney and Fox, 2009]. Durch kommerziell erhältliche Standardsubstanzen gewinnen v. a. Lacto-N-hexaose (LNH, Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc- β -(1 \rightarrow 3)-[Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc- β -(1 \rightarrow 6)]-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc) und Lacto-N-neo-hexaose (LNnH, Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc- β -(1 \rightarrow 3)-[Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc- β -(1 \rightarrow 6)]-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc) und GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc für diese Arbeit an Bedeutung (siehe Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Name, Abkürzung, Struktur, Molmasse und chemische Beschaffenheit einiger ausgewählter MOS, welche mit Hilfe von kommerziellen Standards mittels HPAEC-PAD/IT-MS quantifiziert werden können

Milcheigene Oligosaccharide				
Name	Abkürzung	Struktur	Molmasse [g/mol]	Chemische Beschaffenheit
3'-Sialyllactose	3'-SL	Neu5Ac- α -(2 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	633,55	sauer
6'-Sialyllactose	6'-SL	Neu5Ac- α -(2 \rightarrow 6)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	633,55	sauer
2'-Fucosyllactose	2'-FL	Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	488,44	neutral
3'-Fucosyllactose	3-FL		488,44	neutral
Lacto-N-hexaose	LNH		1072,96	neutral
Lacto-N-neo-hexaose	LNnH		1072,96	neutral
N-Acetyl-galactosaminyl-lactose		GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	545,49	neutral

2.2.2.2.2 Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden

Eine Literaturübersicht über Vorkommen und Gehalte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Milchproben verschiedener Tierarten (Human-, Kuh-, Schafs-, Stuten- und Ziegenmilch) ist in Tab. 6-2 im Anhang dargestellt. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass bei so allgemeinen Strukturen wie (Hex)₂-Neu5Ac für die Hexose diverse Monosaccharide eingesetzt werden können. Die für die Verbindung am wahrscheinlichsten und am häufigsten in der Literatur beschriebene Substanz ist die Sialyllactose (SL) mit folgender Strukturformel: Glc-Gal-Neu5Ac. Je nach Verknüpfung der Neu5Ac an die Lactose können verschiedenste Isomere (z. B.: 3'-SL und 6'-SL) entstehen. Jedoch ist nicht bei allen Substanzen eine einwandfreie Zuordnung - u. a. auf Grund fehlender Analysen wie NMR - möglich, wodurch die Struktur der einzelnen MOS allgemein angegeben ist.

Die Konzentration an MOS in den verschiedenen Tiermilchproben wird von vielen Faktoren wie Fütterung, Anzahl der Lactationen, Unterkunft der Tiere, genetische Faktoren der Tiere, Rasse, Alter und saisonalen Variationen beeinflusst [[Asakuma et al., 2010], [Barile et al., 2010], [McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek, 2004], [Sundekilde et al., 2012] und [Urashima et al., 2002]]. Besonderer Einfluss wird dabei der Lactationsdauer nach der Geburt zugeschrieben. Zu Beginn der Lactation können dabei deutlich höhere Gehalte an MOS gemessen werden, welche mit der Zeit abnehmen und später in Milch konstante Werte annehmen [[McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek, 2004], [Nakamura et al., 2003], [Wang et al., 2001], [Bao et al., 2013] und [Martín-Sosa et al., 2003]].

Humanmilch hat im Vergleich zu Kuh-, Schafs-, Stuten- und Ziegenmilch den höchsten Anteil an MOS, der bei ca. 5 g/l - 8 g/l liegt [Martinez-Ferez et al., 2006]. Dabei liegen ca. 77 % der MOS fucosyliert [Ninonuevo et al., 2006] und ca. 20 % als saure Verbindungen vor [Wu et al., 2011]. Die Verknüpfung der Fucose erfolgt dabei immer in α -Stellung. Die sauren MOS liegen vorwiegend mono- oder disialyliert vor, wobei der Anteil an α -(2 \rightarrow 6)-Neu5Ac-Monomeren gegenüber α -(2 \rightarrow 3)-Neu5Ac-Monomeren überwiegt [Wu et al., 2011]. Die Gehalte an Oligosacchariden in Humanmilch (HM) hängen zusätzlich zu den oben erwähnten Faktoren noch von der Lewis-Blutgruppe des Spenders ab. Personen mit der Le(a-b⁺)-Blutgruppe können α -(1 \rightarrow 2)-, α -(1 \rightarrow 3)- und α -(1 \rightarrow 4)-fucosylierte MOS bilden und weisen dadurch einen hohen Gehalt an Humanmilch-Oligosacchariden (HMOS) auf (Coppa et al. [2011]: 10,16 g/l fucosylierte MOS, Thurl et al. [2010]: 9,51 g/l neutrale HMOS). Le(a+b⁻)-Blutgruppen-Typen können keine α -(1 \rightarrow 2)-fucosylierte Verbindungen bilden, wodurch der Gehalt an HMOS geringer liegt (Coppa et al. [2011]: 3,63 g/l fucosylierte MOS, Thurl et al.

[2010]: 5,58 g/l neutrale HMOS). Bei der Blutgruppen Le(a-b-) sind keine α -(1→4)-fucosylierte Verbindungen synthetisierbar werden (Coppa et al. [2011]: 4,75 g/l fucosylierte MOS, Thurl et al. [2010]: 10,53 g/l neutrale HMOS). Bei der Blutgruppe Le(a+b+) können nur α -(1→3)-fucosylierte HMOS synthetisiert werden, wodurch der Gehalt an MOS sehr gering ausfällt (Coppa et al. [2011]: 0,82 g/l fucosylierte MOS). Die sauren sowie neutralen, nicht-fucosylierten HMOS (wie Lacto-N-Triose (LNT), Lacto-N-neo-Triose (LNnT), LNH und LNnH) werden dabei nur wenig beeinflusst [[Thurl et al., 2010], [Coppa et al., 2011] und [Totten et al., 2012]]. Bisher wurden über 200 verschiedene Oligosaccharide in Humanmilch detektiert, wobei Strukturen mit bis zu sieben Isomeren identifiziert werden konnten [[Wu et al., 2010] und [Totten et al., 2012]]. HMOS zeichnen sich dabei durch eine hohe Komplexität und Vielfalt aus, was sie deutlich von den MOS der anderen Tierarten unterscheidet [Tao et al., 2011].

Im Gegensatz zur Humanmilch konnten in Kuhmilch bisher nur max. 52 verschiedene MOS [Sundekilde et al., 2012] mit einem Anteil von ca. 70 % an sauren MOS [Tao et al., 2008] detektiert werden. Darin kommen v. a. einfach sialylierte Substanzen vor, die überwiegend Neu5Ac-Monomere beinhalten [[Martinez-Ferez et al., 2006] und [Tao et al., 2008]]. Der Gehalt an 3'-SL liegt gegenüber Humanmilch deutlich über dem von 6'-SL [[Sundekilde et al., 2012] und [Finke, 2000]]. Im Gegensatz zur Humanmilch weist Kuhmilch nur sehr wenige oder keine fucosylierte MOS [[Tao et al., 2008], [McSweeney and Fox, 2009] und [Barile et al., 2010]] sowie nur relativ kurzkettige MOS auf [Tao et al., 2008]. Die Anzahl der detektierten Isomere in Kuhmilch ist deutlich geringer als in Humanmilch [Tao et al., 2008]. Dennoch konnten einige MOS in Kuhmilch detektiert werden, die in Humanmilch vorkommen. Dabei handelt es sich v. a. um Sialyllactosen und einige kleinere, neutrale MOS [[Tao et al., 2008] und [Barile et al., 2010]]. Die in Kuhmilch gemessenen MOS-Gehalte von 0,03 g/l bis 0,06 g/l Oligosacchariden [Martinez-Ferez et al., 2006] entsprechen dabei ca. einem Hundertstel des MOS-Gehaltes in Humanmilch.

Im Vergleich zur Kuh- und Humanmilch sind Kamel-, Stuten und Schafsmilch wenig untersucht. Bisher konnten zwölf MOS in Kamelmilch identifiziert werden, sieben sind sialyliert, drei neutral unfucosyliert und zwei neutral fucosyliert sind [[Fukuda et al., 2010] und [Alhaj et al., 2013]]. Konzentrationen zu diesen Oligosacchariden wurden bisher nicht veröffentlicht. In Stutenmilch konnten sechs neutrale MOS identifiziert werden [Finke, 2000]. Schafsmilch weist MOS-Gehalte von 0,02 g/l bis 0,04 g/l auf [Martinez-Ferez et al., 2006]. Die Zusammensetzung der MOS ist dabei komplexer als bei Kuhmilch. Die sauren MOS der

Schafsmilch bestehen überwiegend aus Neu5Gc und nicht aus Neu5Ac und sind meist doppelt sialyliert [[Finke, 2000] und [Martinez-Ferez et al., 2006]].

Im Vergleich zu den anderen Tiermilcharten besitzt das MOS-Profil von Ziegenmilch die größte Ähnlichkeit mit Humanmilch [[Daddaoua et al., 2006] und [Martinez-Ferez et al., 2006]]. Es konnten MOS-Gehalte von 0,25 g/l bis 0,30 g/l in Ziegenmilch gemessen werden, was etwa einem Zehntel der MOS-Konzentration in Humanmilch, aber auch etwa einem zehnfach höheren MOS-Gehalt im Vergleich zur Kuhmilch entspricht. Ein Großteil der MOS in Ziegenmilch sind kleine, neutrale und saure MOS, die einfach oder doppelt sialyliert vorliegen [Martinez-Ferez et al., 2006].

Der höchste Gehalt an Oligosacchariden ist somit in Humanmilch detektierbar, gefolgt von Ziegenmilch sowie Kuh-, Kamel-, Schafs- und Stutenmilch. Dabei ist der MOS-Gehalt in Humanmilch um ein hundertfaches höher als in Kuhmilch.

2.2.2.2.3 *Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden*

Die milcheigenen Oligosaccharide sind gut wasserlöslich, leicht hydrolysierbar durch Säuren [Belitz et al., 2008] und stabil gegenüber Basen [[Belitz et al., 2008] und [Schneir and Rafelson, 1966]]. Etwa 0,5 % bis 1 % der von Säuglingen täglich aufgenommenen HMOS gehen in den Urin über, wobei sowohl intakte HMOS als auch HMOS-Metabolite gemessen werden konnten [[Rudloff et al., 1996] und [Rudloff et al., 2012]]. Sowohl neutrale als auch saure HMOS sind auch im Stuhl von Säuglingen nachweisbar. Zu Beginn des Stillens bzw. direkt nach der Geburt ist dabei das fäkale MOS-Profil von Säuglingen analog zum HMOS-Profil der Mutter. Erst nach Entwicklung diverser Enzymaktivitäten des Säuglings können auch HMOS-Metabolite im Stuhl gemessen werden. Mit Verabreichen von fester Nahrung sind keine intakten HMOS oder HMOS-Metabolite mehr im Stuhl des Säuglings messbar [[Albrecht, 2011], [Albrecht et al., 2011] und [Newburg et al., 2004]].

Eine Literaturübersicht zu den Eigenschaften der MOS ist im Anhang in Tab. 6-3 dargestellt. Ähnlich wie bei den GOS steigern MOS das Wachstum von *Bifidobakterien*, wobei es zum Abbau der OS und Bildung von SCFA (short chain fatty acid, kurzkettige Fettsäuren) kommt. Umstritten ist dabei die Wirkung der MOS auf *Clostridien*, *Staphylokokken*, *E. Coli*, *Bacteroiden* und *Lactobazillen*, da sowohl ein ansteigendes und abnehmendes Wachstum als auch eine stagnierende Wachstumsrate gemessen werden konnten. Die bifidogene Wirkung

ist dabei sowohl stammspezifisch, substratspezifisch als auch abhängig von der tierischen Herkunft der OS.

Den MOS werden - wie auch den GOS - potentiell antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die Literaturdaten fallen dazu jedoch sehr kontrovers aus, wodurch eine eindeutige Struktur-Wirkungsbeziehung der einzelnen Analyten noch nicht belegt werden konnte. Beispielsweise besitzt 3'-SL anscheinend sowohl positive als auch negative Eigenschaften. Eine Inhibierung die Monozytenadhäsion [Bode et al., 2004], aber auch eine Erhöhung des Risikos der HIV-Übertragung von der Mutter zum Kind [Bode et al., 2012] wurde nachgewiesen. Sowohl 3'-SL als auch 6'-SL wird eine inhibierende Wirkung gegenüber *E. coli* [Lane et al., 2012] und *Rotaviren* [Iskarpatyoti et al., 2012], nicht aber gegenüber *C. difficile* [El-Hawiet et al., 2011] zugeschrieben. Die Wirkung der SL auf die Pathogenadhäsion ist dabei auch von der Verknüpfung der Neu5Ac (Sialinsäure) an den Lactose-Rest abhängig [Bode et al., 2004]. Dementsprechend können für die Sialyllactosen keine allgemein gültigen Aussagen getroffen werden. Ebenso gilt dies für fucosylierte und/oder neutrale MOS. Den α -(1→2)-verknüpften fucosylierten MOS - insbesondere 2'-FL - wird eine inhibierende Wirkung auf *C. difficile* [El-Hawiet et al., 2011], *C. jejuni* [Ruiz-Palacios et al., 2003], *S. aureus* [Lane et al., 2011] und *E. coli* [Newburg et al., 2004] zugeschrieben, wohingegen das Ablösen von *Entamoeba histolytica* nur durch OS mit einem freien, terminalen Galactosemonomer (ohne Fucose-Reste) erzielt werden kann [Jantscher-Krenn et al., 2012]. Es lässt sich konstatieren, dass MOS die Inhibierung von diversen Pathogenen bewirken, die Schwere, Dauer und Häufigkeit von Atem- und Darmerkrankungen reduzieren [Stepans et al., 2006] sowie einen potentiell positiven Einfluss auf die Interleukin-Sekretion besitzen [Zenhom et al., 2011]. Natürlich vorkommende Mischungen der MOS haben dabei anscheinend einen größeren Einfluss als Standard-Substanzen (siehe Tab. 6-3 im Anhang).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass MOS eine potentiell bifidogene [[McSweeney and Fox, 2009], [Bode, 2009], [Mijan et al., 2011] und [Kunz and Rudloff, 2008]], anti-pathogene [McSweeney and Fox, 2009], anti-adhäsive [[Bode, 2009] und [Mijan et al., 2011]], immunomodulatorische [[McSweeney and Fox, 2009] und [Mijan et al., 2011]], antiinfektiöse [Kunz and Rudloff, 2008] und antiinflammatorische Wirkung [[Mijan et al., 2011] und [Kunz and Rudloff, 2008]] besitzen. Diese Zusammenhänge konnten v. a. an einer großen Anzahl von *in-vitro*-Daten sowie Daten aus Tierversuchen entnommen werden (siehe Tab. 6-3). Die Vergleichbarkeit ist auf Grund der hohen Anzahl an verschiedenen

Analyseverfahren stark eingeschränkt. Dagegen sind nur sehr wenige Humanstudien und keine klinischen Studien vorhanden. Eine Struktur-Wirkungsbeziehung konnte für MOS daher noch nicht abgeleitet werden. Auf Grund der zahlreichen positiven Eigenschaften wäre ein Einsatz in einem funktionellen Lebensmittel denkbar.

2.2.2.3 Weitere Oligosaccharide

2.2.2.3.1 Fructo-Oligosaccharide / Inulin

Inulin bzw. Fructo-Oligosaccharid (FOS) besteht aus ca. 30 furanoiden D-Fructoseeinheiten, welche β -(1 \rightarrow 2)-verknüpft sind. Bei Inulin bildet das Ende des linearen Polysaccharides eine 2,1-verknüpfte α -Glucose und bei FOS eine 1,2-verknüpfte D-Fructose (siehe Abb. 2-4). FOS wird dabei aus Inulin mit Hilfe der Inulase enzymatisch hergestellt.

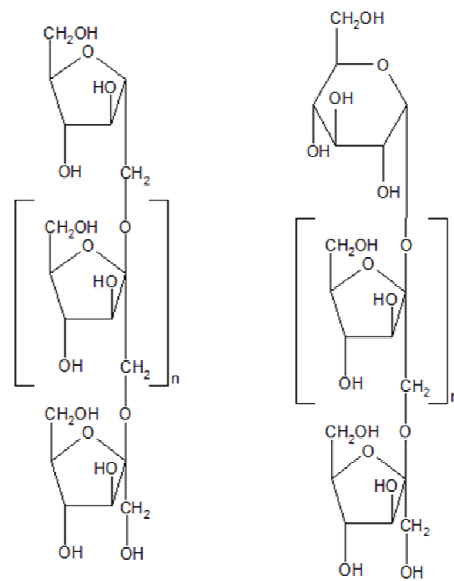


Abb. 2-4: Strukturformel von FOS und Inulin

Inulin ist löslich in warmem Wasser, resistent gegenüber Basen und leicht hydrolysierbar durch Säure bzw. Enzyme [Belitz et al., 2008]. Inulin und FOS sind unverdaulich im Dünndarm und werden erst im Dickdarm durch Bakterien abgebaut. Daher resultiert die Anwendung als Zucker- bzw. Fettaustauschstoff [Belitz et al., 2008]. Die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften werden in der Literatur kontrovers diskutiert, wohingegen die prebiotische Wirkung, insbesondere der Anstieg des Bifidobakterienwachstums erwiesen zu sein scheint [Macfarlane et al., 2008]. Eine Erhöhung

der Konzentration an IL5, IL6, IL10 und IgA sowie der B- und T-Lymphozyten sollen durch eine FOS- bzw. Inulin-Gabe erreicht werden. Auch die Funktion der NK-Zellen (natürliche Killerzellen) soll dadurch zunehmen. Die Dauer und Schwere von Durchfall- und Atemwegserkrankungen sowie die Sterberate bei einer Infektion mit *C. difficile* wird durch die Gabe von FOS bzw. Inulin gesenkt [Lomax and Calder, 2008]. Zur weiteren Bewertung der gesundheitsfördernden - insbesondere der antiinflammatorischen - Wirkung von FOS, einer GOS-FOS-Mischung wie auch GOS müssen weitere Untersuchungen - bevorzugt Humanstudien - durchgeführt werden.

2.2.2.3.2 Malto-, Isomalto-, Gentio- und Xylo-Oligosaccharide

Oligosaccharide wie Malto-, Isomalto-, Gentio- und Xylo-Oligosaccharide sind lineare Mehrfachzucker und werden aus ihren jeweiligen Monomeren (siehe Abb. 2-5) aufgebaut.

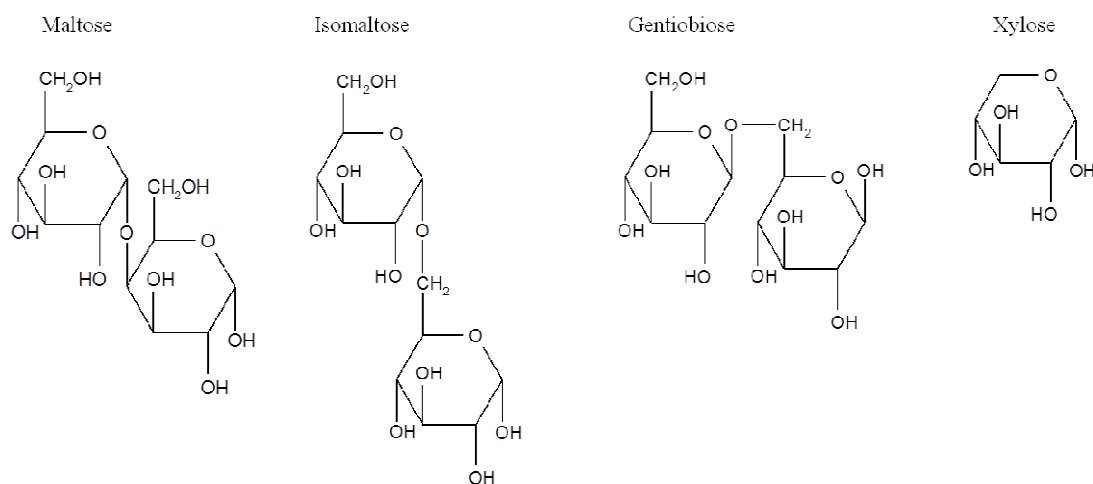


Abb. 2-5: Strukturformel von Maltose, Isomaltose, Gentiobiose und Xylose als Ausgangsstoff für Malto-, Isomalto-, Isomaltulose-, Gentio- und Xylo-Oligosaccharide

Malto-OS werden im Dünndarm hydrolysiert und besitzen somit einen großen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel. Durch Malto-Oligosaccharide können unerwünschte Bakterien im Darm reduziert werden [Belitz et al., 2008]. Isomalto-OS werden dagegen nur zu einem geringen Maß im Stoffwechsel verwertet, wodurch der Einfluss auf den Blutzuckerspiegel niedrig ist. Die Isomalto-OS besitzen zudem eine bifidogene Wirkung [Belitz et al., 2008].

Gentio-Oligosaccharide und Xylo-Oligosaccharide werden - genau wie GOS, FOS und MOS - nicht im Stoffwechsel verwertet und haben somit auch keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel. Jedoch besitzen diese OS eine bifidogene Wirkung [Belitz et al., 2008].

2.3 Milch als funktionelles Lebensmittel

Als funktionelle Lebensmittel „[...] werden Produkte, die außer dem reinen Nährwert einen physiologischen Vorteil bieten, der die Gesundheit fördern soll [...]“ bezeichnet [Belitz et al., 2008]. Nach Rivero-Urgell und Santamaria-Orleans [2001] sollte ein funktionelles Lebensmittel zwei Anforderungen erfüllen: erstens sollten die zugesetzten funktionellen Bestandteile - in der vorliegenden Arbeit entspricht dies den Oligosacchariden - während der Verdauung nicht abgebaut werden und zweitens v. a. von Colon-Bakterien genutzt werden. Dadurch wird ein prebiotischer Charakter des Analyten erzeugt. Nach Gibson et al. [2004] sind Prebiotika nicht verdaubare Lebensmittelinhaltsstoffe, die einen gesundheitsfördernden Effekt durch ihren selektiven Metabolismus im Intestinaltrakt besitzen. Entscheidend ist dabei die Spezifität der mikrobiellen Änderung. Dabei sollten v. a. drei Kriterien beachtet werden: (1) Resistenz gegenüber Magensäure, gegenüber Hydrolyse durch tierische Enzyme und gegenüber gastrointestinaler Absorption; (2) Fermentation durch intestinale Mikroflora; (3) selektive Stimulation des Wachstums und/oder der Aktivität der intestinalen Bakterien in Zusammenhang mit Gesundheit und Wohlbefinden. Damit eine Einordnung als Prebiotikum zulässig ist, müssen die drei Kriterien erfüllt sein. Dies konnten bisher für Fructo-Oligosaccharide, Galacto-Oligosaccharide und Lactulose bestätigt werden. Belitz et al. [2008] definiert als Prebiotika „[...] unverdauliche Stoffe, die selektiv Bifidobakterien bzw. möglicherweise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum im Darm fördern und dadurch positive gesundheitliche Wirkung erzielen sollen [...]“. Dadurch sollen gleichzeitig potentiell pathogene Mikroorganismen (*Enterobacteriaceae*, *Clostridia*), die OS nicht metabolisieren können, zurückgedrängt werden. Durch die bifidogene Wirkung (Förderung des Wachstums von Bifidobakterien) der OS werden antimikrobielle Substanzen und organische Säuren im Darm produziert. Der Darm-pH-Wert wird folglich abgesenkt und kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids - SCFA) bilden sich. Durch eine erhöhte Bildung von SCFA kann es jedoch zu Durchfall und Flatulenz kommen. Eine schädigende Nebenwirkung ist für die Allgemeinbevölkerung nicht bekannt, wodurch „[...] ihr Einsatz [Anmerkung: Einsatz der OS] für diese Gruppe als gesundheitlich unbedenklich [...]“ gilt [Bischoff and Kochling, 2012]. Da OS zu den Ballaststoffen (unverdauliche

Nahrungsbestandteile) zählen, sollte auch der Richtwert der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. für die tägliche Zufuhr von mind. 30 g Ballaststoffe beachtet werden. Dabei werden Ballaststoffe als „wahrscheinlich krebssenkend“ angesehen [DGE-aktuell, 2008]. Aus diesen Gründen ist ein Einsatz von Oligosacchariden in einem funktionellen Lebensmittel empfehlenswert.

2.4 Analytische Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden

2.4.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung von OS-Analyten umfasst die Entfernung von Matrixbestandteilen wie Fette und Proteine sowie die Abtrennung der überschüssigen Lactose.

Das MilCHFett kann nach Martinez-Ferez et al. [2006] durch Zentrifugation in der Kälte abgetrennt werden. Zur Proteinabtrennung können mehrere Methoden angewandt werden. Mit Hilfe von Ethanol kommt es zu einer guten Proteinentfernung, aber auch zu Verlusten von OS [[Fong et al., 2011] und [Scherz and Bonn, 1998]]. Eine weitere Methode zur Proteinabtrennung ist die Membranfiltrationstechniken [[Marino et al., 2011] und [Thurl et al., 1997]]. Diese Methode hat den Vorteil, dass ein Upscaling in den großtechnischen Bereich möglich ist. Eine Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur Proteinentfernung soll in dieser Arbeit vorgenommen werden.

Bei den enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben müssen für die meisten chromatographischen Analysenmethode die denaturierten Enzyme entfernt werden. Das kann mit Hilfe einer Carrez-Fällung durchgeführt wird [Weiß, 2001]. Durch die Carrez-Klärung werden neben Proteinen auch Pektine, andere Polysaccharide, Aminosäuren und Peptide abgetrennt [Maier, 1990].

Als besonders herausfordernd gestaltet sich die Separation der im Überschuss vorhandenen Lactose von den OS (Verhältnis Lac:OS = ca. 1000:1). Im Nachfolgenden sind dazu mehrere Methoden (Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE), Größenausschlusschromatographie mit Sephadex[®]- bzw. BioGel[®]-Material), die in der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt werden sollen, erläutert.

2.4.1.1 Festphasenextraktion an Aktivkohle

Bei der GCC-SPE (graphitized carbon cartridge solid phase extraction) handelt es sich um eine Festphasenextraktion an Aktivkohle, wodurch Oligosaccharide von Salzen, Proteinen, Mono- und Disacchariden abgetrennt werden können [Packer et al., 1998]. Die OS werden dabei unter Analysebedingungen vollständig zurückgehalten, während die Störsubstanzen nicht festgehalten oder mit einem schwächeren Eluationsmittel eluiert werden [Galensa et al., 1995]. Mit dieser Methode können auch neutrale von sauren Oligosacchariden getrennt werden. Das Prinzip dieser Trennmethode ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

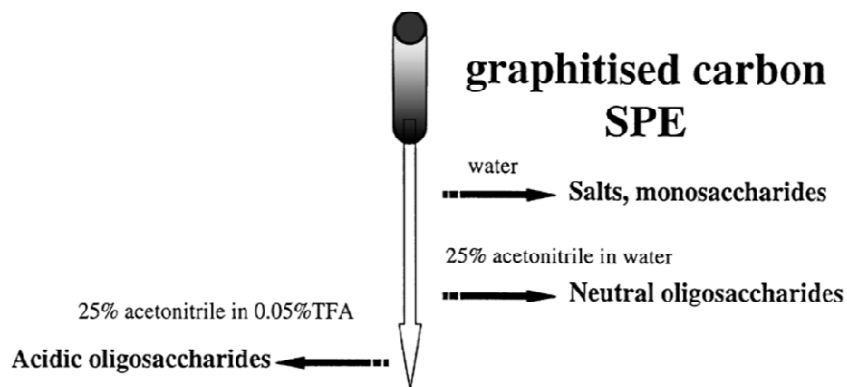


Abb. 2-6: Prinzip der Abtrennung von Salzen und Monosacchariden von Oligosacchariden mittels GCC-SPE nach Packer et al. [1998]

Die Eluation von Salzen und Monosacchariden erfolgt mit Wasser, da deren Wechselwirkung mit der stationären Phase der Säule sehr gering ist und die Eluation mit einem schwachen Lösungsmittel ermöglicht. Neutrale Oligosaccharide und Lactose werden mit Hilfe eines organischen Modifiers wie Acetonitril eluiert. Abhängig vom Anteil an organischem Modifier am Wasser ist auch eine Trennung zwischen Oligosacchariden und Lactose möglich. Oligosaccharide eluieren dabei umso später, je größer ihre molekulare Masse ist. Die sauren Oligosaccharide binden deutlich stärker an die Aktivkohle und können nur durch den weiteren Zusatz einer flüchtigen Säure wie TFA eluiert werden. Dabei kommt es auch zur Eluation von phosphorylierten und sulfatierten Zuckern [Redmond and Packer, 1999]. Nach der Behandlung mit einem Gemisch aus Wasser, organischem Modifier und flüchtiger Säure verbleiben Restproteine und Peptide auf der Säule und können von den Kohlenhydraten ebenfalls abgetrennt werden [Packer et al., 1998]. Die Füllmenge der verwendeten Kartuschen

liegt dabei im Normalfall zwischen 100 mg und einigen Gramm [Galensa et al., 1995]. Dadurch scheint der Einsatz dieser SPE-Methode sowohl im kleineren Maßstab als auch im größeren Maßstab - als präparative Chromatographie an Aktivkohle - möglich. Eine Optimierung geeigneter Sorbentien sowie die Auswahl der selektivsten Lösemittel für Eluitions-, Wasch- und Desorptionsvorgänge sind dabei für fast jede Substanz (inklusive der entsprechenden Matrix) notwendig [Gey, 2008].

2.4.1.2 Größenausschlusschromatographie

Eine weitere Methode, um Lactose von den Oligosacchariden abzutrennen, ist die Größenausschlusschromatographie, welche mit verschiedenen Phasenmaterialien, z. B. Sephadex[®]- oder BioGel[®], betrieben werden kann. Dabei erfolgt die Trennung der Moleküle (siehe Abb. 2-7) nach ihrer effektiven Größe [[Gey, 2008] und [Scherz and Bonn, 1998]].

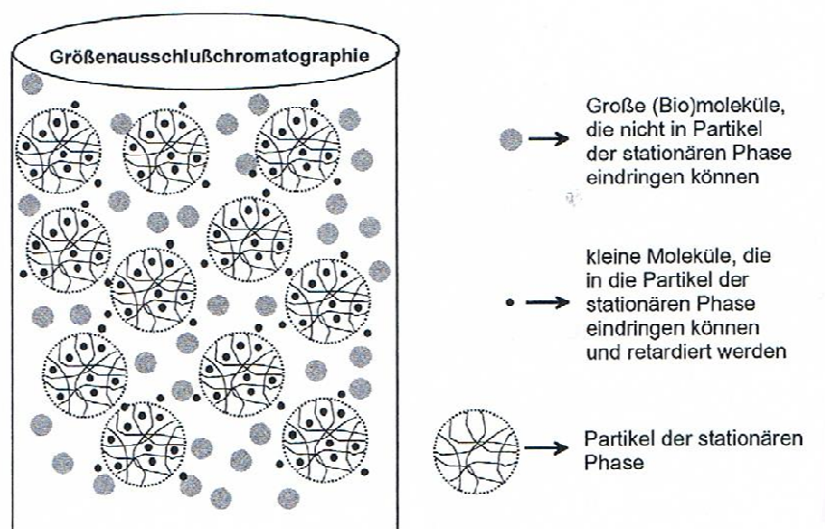


Abb. 2-7: Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie nach Gey [2008]

Moleküle mit einer größeren Molekülmasse als der Porendurchmesser des Materials können nicht in die Poren des Materials eindringen, werden somit ausgeschlossen und eluieren nahe der Totzeit im Chromatogramm. Je kleiner die Moleküle sind, desto länger ist ihre Verweilzeit im Material, da sie umso stärker zurückgehalten werden. Dies verlängert die Eluitionszeit [[Gey, 2008] und [Scherz and Bonn, 1998]]. Diese Methode wird v. a. zur Trennung polarer, wasserlöslicher Analyten (Kohlenhydrate) verwendet. Als mobile Phase

wird dabei überwiegend Wasser verwendet. Als stationäre Phasen werden u. a. das Handelsprodukt Sephadex[®] (Separation Pharmacia dextran, Material: mit Epichlorhydrin vernetztes Dextran) und BioGel[®] (Material: Polyacrylamid) verwendet [Maier, 1990]. Somit ist eine Trennung von Lactose und Oligosaccharide zur weiteren analytischen Untersuchung möglich. Dabei sollten zuerst die Restproteine nahe dem Totpeak eluieren, gefolgt von den Oligosacchariden, Lactose, Monosacchariden und Salzen.

Nachdem Fette, Proteine und Lactose abgetrennt wurden, verbleiben im Wesentlichen nur noch Oligosaccharide in der Lösung, welche anschließend mittels HPAEC-PAD aufgetrennt sowie massenspektrometrisch untersucht werden können.

2.4.2 Analytische Messmethoden

2.4.2.1 HPAEC-PAD/IT-MS

Die Identifizierung und Quantifizierung der Kohlenhydrate soll in dieser Arbeit mit Hilfe einer hochauflösenden Anionenaustauscherchromatographie (HPAEC) mit pulsierender amperometrischer Detektion (PAD) sowie direkter Kopplung an einem Massenspektrometer (IT-MS) durchgeführt werden (siehe Abb. 2-8).

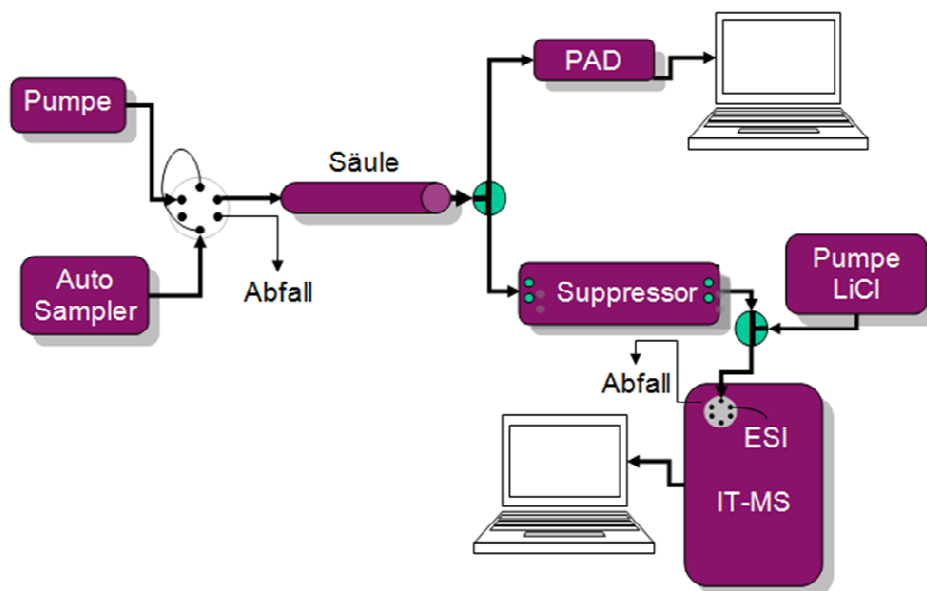


Abb. 2-8: Schematische Darstellung der hochauflösenden Anionenaustauscherchromatographie mit pulsierender amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Massenspektroskopie mit Hilfe einer Ionenfalle (IT-MS) und Elektrospray-Interface (ESI) zur Quantifizierung der Oligosaccharide

Nach der Trennung der Oligosaccharide durch die chromatographische Säule wird der Fluss gesplittet und es erfolgt auf der einen Seite die elektrochemische Detektion mittels pulsierender amperometrischen Detektion (PAD) und auf der anderen Seite die massenspektrometrische Analyse. Auf die einzelnen Bestandteile dieser Apparatur wird in den nachfolgenden Abschnitten eingegangen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine Analyse von Kohlenhydraten ohne vorherige Derivatisierung möglich ist. Mit Hilfe der MS-Kopplung ist eine Identifizierung von Oligosacchariden trotz einer geringen Verfügbarkeit von Standardsubstanzen durchführbar [Richardson et al., 2001].

2.4.2.1.1 Hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie (HPAEC)

Mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule sollen organische Ionen (in diesem Fall Kohlenhydrate und v. a. Oligosaccharide) aufgetrennt werden. An der Oberfläche der stationären Phase befinden sich dabei positive Ladungen, die durch negativ geladene Ionen des Eluenten besetzt werden. Diese Elutionen können durch andere Anionen ausgetauscht werden. Die verschiedenen Anionen des Probeanalyten konkurrieren um die Ionenaustauscherplätze der stationären Phase. Je länger und intensiver diese ionische Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der stationären Phase ist, umso später werden die Ionen von der Säule eluiert [[Scherz and Bonn, 1998], [Gey, 2008], [Weiß, 2001] und [Maier, 1990]]. Die Trennung kann dabei durch Parameter wie pH-Wert des Eluenten, Art und Konzentration (Ionenstärke) der Elutionen in der mobilen Phase und die Wahl des Ionenaustauschertyps beeinflusst werden [Gey, 2008].

Kohlenhydrate können mittels Anionenaustauscherchromatographie getrennt werden, da diese Stoffklasse bis auf wenige Ausnahmen sehr polar und wasserlöslich sind. Die Analytik kann daher im wässrigen Medium stattfinden [Matissek and Steiner, 2006]. Die Kohlenhydrate dissoziieren unter stark basischen Bedingungen vollständig und bilden Anionen [[Scherz and Bonn, 1998], [Dionex, 2004] und [Weiß, 2001]], die anschließend als nicht derivatisierte Analyten im low-picomol-Level direkt quantifiziert werden können [Dionex, 2004]. Die Trennung ist dabei auf die unterschiedliche Acidität der einzelnen Hydroxylgruppen in der Substanz zurückzuführen [Weiß, 2001]. Dennoch stellt die Analytik von Kohlenhydraten eine Herausforderung dar, da diese Stoffklasse eine hohe Anzahl an gleichen funktionellen Gruppen (Hydroxylgruppen) je Verbindung sowie eine große Anzahl an Stereoisomeren aufweist. Des Weiteren können Kohlenhydrate mutarotieren, was zu einer Peakverbreiterung

im Chromatogramm führen kann. Dies ist v. a. bei niedrigen Temperaturen und Eluenten mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel möglich [Matissek and Steiner, 2006]. Die Wahl eines hohen pH-Wertes im Eluenten kann zudem unterschiedlichste Reaktionen der Zucker hervorrufen, die zusätzlich mit dem Chromatogramm interferieren. Dazu zählen v. a. Epimerisierung, Keto-Enol-Tautomerie und De-Acetylierung der N-acetylierten Zucker. Diese Reaktionen sind jedoch eher gering, wenn die Analytik bei Raumtemperatur durchgeführt wird [Dionex, 2004]. Durch den hohen pH-Wert des Eluenten müssen spezielle pH-stabile Säulen verwendet werden, wozu sich v. a. basen-stabile Polymere eignen [Dionex, 2004]. Auf diese Weise können Zucker, die keine starken Chromophore besitzen, was eine Analytik mittels UV/VIS oder Photometer unmöglich macht [[Dionex, 2011] und [Gey, 2008]], durch Anionenaustauscherchromatographie getrennt werden. Die Trennung erfolgt mit hoher Selektivität und ohne vorherige Derivatisierung [Dionex, 2004]. Mit dieser Methode können strukturisomere Kohlenhydrate und Glycopeptide getrennt und detektiert werden [[Weiß, 2001] und [Bruggink et al., 2005]].

Ein wichtiger Faktor bei der HPAEC stellt die Eluentenzusammensetzung, bestehend aus Wasser, Natriumhydroxid und Natriumacetat, dar. Das verwendete Wasser zur Eluentenherstellung sollte so wenig wie möglich Kohlenstoffdioxid enthalten, frei von biologischen Kontaminationen wie Bakterien und Schimmel sein und keine Partikel enthalten. Bei pH-Werten über 12 kann sich Kohlenstoffdioxid in Wasser lösen und Carbonate bilden, wodurch ein stärkeres Eluansmittel als die üblicherweise verwendete Natronlauge entsteht. Dadurch kommt es zur Veränderung der Retentionszeit der Analyten. Aus diesem Grund sollte das verwendete Wasser und die benutzten Eluenten entgast und der Eluent unter Helium aufbewahrt werden [Dionex, 2007]. Die Behandlung der Eluenten mit Helium sorgt auch dafür, dass gelöste Gase wie Sauerstoff, die diverse Kohlenhydratverbindungen oxidieren könnten, eliminiert werden [[Galensa et al., 1995] und [Weiß, 2001]]. Dem Eluenten Natriumhydroxid kommen bei der Kohlenhydrateluation zwei Funktionen zu - zum einen die Funktion als Eluent-Ion und zum anderen die Festlegung des pH-Wertes der mobilen Phase. Bei einer Änderung der Hydroxid-Konzentration kommt es auch zu einer Veränderung des pH-Wertes, was seinerseits Einfluss auf die Dissoziation der Kohlenhydrate hat. Aus diesen Gründen und wegen einer möglichen Änderung der Eluentenkonzentrationen kommt es zur Retentionszeitverschiebung der Analyten [Weiß, 2001]. Zur chromatographischen Trennung von sauren und hochmolekularen OS ist ein stärkerer Eluent als Natronlauge nötig, wodurch es zum Einsatz eines Natronlauge-Natronacetat-Gemisches kommt. Dabei wird die Eluation

von stark gebundenen Spezies beschleunigt ohne die Selektivität zu beeinträchtigen [[Dionex, 2007], [Dionex, 2004], [Dionex, 2011] und [Weiß, 2001]].

Zur Trennung der Kohlenhydrate wurde von der Dionex GmbH eine spezielle Ionenaustauschersäule entwickelt. Diese beinhaltet ein spezielles pelliculäres Ionenaustauscherpolymer mit einheitlichen Korngrößen und kleinen, nicht porösen Latexpartikeln (MicroBeads™), die durch elektrostatische Wechselwirkung an die Oberfläche der stationären Phase gebunden sind. Bei der Säule CarboPac PA100 (siehe Abb. 2-9) handelt es sich bei dem Ionenaustauscherpolymer um sulfoniertes Ethylvinylbenzen/Divinylbenzen-Copolymer und um quarternäre Ammoniumionen, die an die Latexpartikel gebunden sind [Gey, 2008].

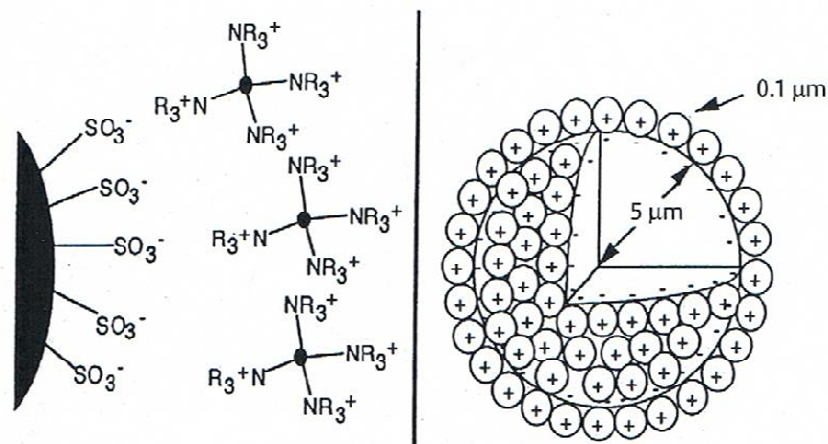


Abb. 2-9: Schematische Darstellung der stationären Phase der Säule CarboPac PA100 zur Trennung von Kohlenhydraten nach Scherz and Bonn [1998]

Die stationäre Phase dieser Säule ist hydrolysestabil in einem pH-Bereich von 1 - 14, lösemittelstabil und sehr robust (mechanisch stabil) [[Gey, 2008], [Weiß, 2001] und [Dionex, 2004]]. Um eventuell vorhandene Matrixeffekte nach der Probenanalyse zu entfernen, muss die Säule nach jedem Probelauf regeneriert werden [Weiß, 2001].

Die Affinität der Kohlenhydrate zur stationären Phase steigt von Zuckeralkoholen über Monosacchariden und Oligosacchariden zu Polysacchariden hin an. Dennoch ist eine Veränderung der Reihenfolge durch komplexe Zuckermischungen möglich. Die Retentionszeit der Oligosaccharide nimmt - im Gegensatz zum Retentionsverhalten von linearen Homooligomeren - nicht mit abnehmender Molekülgröße ab [Weiß, 2001]. Durch die

Komplexität, Vielfalt und z. T. starke Verzweigung der OS kann die Eluationszeit der Substanz stark beeinflusst werden. Prinzipiell eluieren zuerst neutrale Oligosaccharide, gefolgt von monosialylierten, disialylierten, trisialylierten und tetrasialylierten OS. Phosphorylierte Zucker werden sehr stark von der stationären Phase zurückgehalten und eluieren damit sehr spät [[Weiß, 2001] und [Martinez-Ferez et al., 2006]]. In der nachfolgenden Abbildung sind einige Verhaltensweisen der OS/Monomere in Bezug auf die Retentionszeitveränderung im Verlauf der chromatographischen Trennung dargestellt.

<i>Verhaltensweise</i>	<i>Literatur</i>
1. Je größer das Oligosaccharid, desto höher ist seine Retentionszeit (z. B. ein Oligosaccharid mit 5 Mannose-Resten eluiert vor einem Oligosaccharid mit 9 Resten).	Hardy und Townsend, 1988 [215]; Basa und Spellman, 1990 [219]; Hernandez et al., 1990 [220]; Pfeiffer et al., 1990 [221]; Townsend et al., 1991 [222].
2. Mit steigender negativer Ladung erhöht sich die Retentionszeit (Sialylierung, Sulfatierung, Phosphorylierung).	Townsend et al., 1988 [223]; 1989 [224]; Hermentin et al., 1992 [225].
3. Anknüpfung von Fucose verringert die Retentionszeit.	Hardy und Townsend, 1988 [215]; 1989 [226]; Basa und Spellman, 1990 [219]; Pfeiffer et al., 1990 [221].
4. Ein Oligosaccharid mit Neu5Ac(α 2-3)Gal eluiert nach dem entsprechenden Oligosaccharid mit Neu5Ac(α 2-6)Gal.	Townsend et al., 1988 [223]; 1989 [224].
5. Ein Oligosaccharid mit Gal(β 1-3)GlcNAc eluiert nach dem entsprechenden Oligosaccharid mit Gal(β 1-4)GlcNAc.	Hardy und Townsend, 1988 [215].
6. Anknüpfung einer GlcNAc-Verzweigung erhöht die Retentionszeit.	Hermentin et al., 1992 [225].
7. Austausch von Neu5Ac durch Neu5Glc erhöht die Retentionszeit.	Hermentin et al., 1992 [225].
8. Anknüpfung eines Lactosamin-Restes an ein neutrales Oligosaccharid erhöht die Retentionszeit.	Hermentin et al., 1992 [225].
9. Anknüpfung eines Lactosamin-Restes an ein sialyliertes Oligosaccharid erniedrigt die Retentionszeit.	Hermentin et al., 1992 [225].
10. Reduktion des reduzierenden endständigen GlcNAc zum GlcNAc-ol erniedrigt die Retentionszeit.	Hardy und Townsend, 1988 [215].
11. Ein Oligosaccharid mit einem vollständigen Core ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) eluiert nach dem Oligosaccharid mit einem unvollständigen Core ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}$).	Basa und Spellman, 1990 [219]; Pfeiffer et al., 1990 [221].
12. Sialylierte Oligosaccharide mit durchweg Neu5Ac(α 2-3)Gal-Verbindungen zeigen eine bessere Auflösung bei pH 5.	Watson et al., 1992 [227].

Abb. 2-10: Verhaltensweisen einiger OS/Monomere in Bezug auf die Retentionszeitveränderung im Verlauf der chromatographischen Trennung nach Weiß [2001]

Anhand dieser Methode ist die Trennung von z. B. 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose (siehe Punkt 4 in Abb. 2-10) oder 4'-Galactosyllactose und 6'-Galactosyllactose (siehe Punkt 5 in Abb. 2-10) möglich [Dionex, 2004]. Eine tägliche Kalibrierung oder ein reduziertes Set an täglichen Standardchecks wird empfohlen, um die Kalibrierung vor jeder Probenmessung zu überprüfen [Dionex, 2011].

Mit Hilfe der HPAEC ist daher eine chromatographische Trennung der Kohlenhydrate ohne vorherige Derivatisierung der Zucker möglich.

2.4.2.1.2 Pulsierende amperometrische Detektion (PAD)

Die Analyse der chromatographisch getrennten Kohlenhydrate erfolgt mit Hilfe einer pulsierenden amperometrischen Detektion, die zu den elektrochemischen Detektionsarten gehört. Dabei handelt es sich um ein Drei-Elektroden-Messsystem aus einer Arbeitselektrode, einer Referenzelektrode und einer Gegenelektrode. Die Arbeitselektrode sorgt dabei für eine Oxidation der Kohlenhydrate, wodurch das benötigte Potential zwischen der Gold-Arbeits- und der Ag/AgCl-Referenzelektrode angelegt wird. Die Gegenelektrode wird zur Aufrechterhaltung des Potentials benötigt [[Galensa et al., 1995] und [Weiß, 2001]]. Durch die Oxidation des Analyten entsteht ein Stromfluss (Freiwerden von Elektronen), welcher über einen bestimmten Bereich der Konzentration proportional ist und dadurch chromatographisch dargestellt werden kann [[Weiß, 2001] und [Dionex, 1998]]. Somit können scharfe Stromstärke-Peaks gemessen werden, die das Konzentrationsprofil der gemessenen Analyten wiedergeben [Scherz and Bonn, 1998]. In der nachfolgenden Abbildung ist der Vorgang der Oxidation von Kohlenhydraten am Beispiel der Glucose dargestellt.

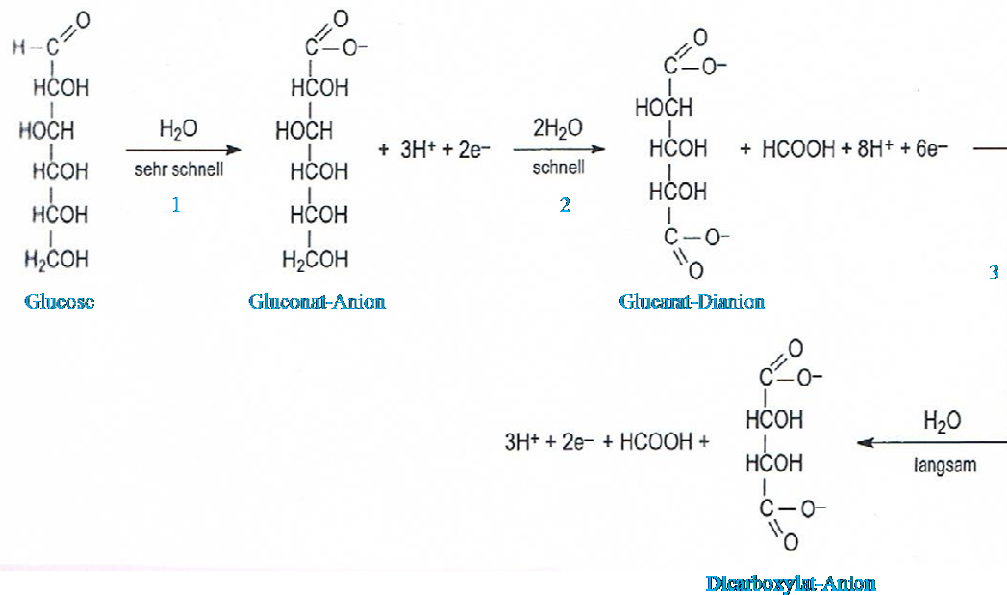


Abb. 2-11: Oxidation der Glucose mit Hilfe von Arbeits- und Referenzelektrode bei der pulsierenden amperometrischen Detektion nach Weiß [2001]

Bei der Oxidation der Glucose wird in einem ersten Schritt die C1-Aldehydgruppe unter Ausbildung eines Gluconat-Anions oxidiert (markiert mit 1 in Abb. 2-11). Anschließend erfolgt die Oxidation der C6-Alkoholgruppe zum Glucarat-Dianion (2) sowie die Decarboxylierung unter Ausbildung des entsprechenden Dicarboxylat-Anions und Formiat (3) [[Weiß, 2001] und [Scherz and Bonn, 1998]]. Problematisch bei dieser Detektionsart ist, dass sich die Oxidationsprodukte der oben dargestellten Reaktion auf die Elektrodenoberfläche niedersetzen und damit die Elektrode kontaminiert. Diese kontaminierte Elektrode verändert ihre Oberflächencharakteristik, was zu verstärktem Basisliniendrift, erhöhtem Grundrauschen und zu sich permanent ändernder Ansprechempfindlichkeit in der chromatographischen Trennung führt. Aus diesem Grund werden vier verschiedene Potentiale an der Arbeitselektrode angelegt, welche sich ständig wiederholen. Somit soll eine höhere Langzeitstabilität während der Kohlenhydrat-Detektion gewährleistet werden. Bei dem ersten Potential handelt es sich um das Oxidationspotential, das für die Oxidation der Zucker verantwortlich ist. Eine maximale Stromausbeute wird dabei bei einem Oxidationspotential zwischen 0,1 V und 0,2 V erreicht. Jedoch enthalten Analysenproben oftmals Amine, die ab einem Potential von 0,15 V ebenfalls oxidiert werden. Daher sollte ein Potential von 0,1 V gewählt werden, damit Amine nicht mit der Zucker-Detektion interferieren. Das zweite Potential ist das Reinigungspotential, welches die adsorbierten Oxidationsprodukte wieder von der Elektrode entfernen sollen. Dabei ist mindestens ein Potential von -1,5 V notwendig.

In der praktischen Anwendung wird ein Potential von -2 V angelegt, um gleichzeitig Matrixkomponenten wie Aminosäuren und kleine Peptide wirksam zu entfernen. Das dritte Potential dient der Aktivierung der Elektrodenoberfläche. Bei 0,6 V werden die katalytisch aktiven Plätze durch Bildung und anschließender Reduzierung von Goldoxid geschaffen. Ein höheres Potential ist hierbei nicht möglich, da sonst mit einem signifikanten Goldverlust an der Elektrodenoberfläche gerechnet werden muss. Das vierte Potential liegt bei -0,1 V und hält die katalytisch aktive Elektrodenoberfläche ohne Goldverlust aufrecht. Die Grenzen der angelegten Potentiale ergeben sich daraus, dass der genutzte Eluent nicht oxidiert oder reduziert werden darf. Die Detektionsgrenze für Kohlenhydrate liegt dabei im mittleren fmol-Bereich [Weiß, 2001]. Mit dieser Detektionsmethode kann eine hohe Selektivität, Sensitivität bzw. Empfindlichkeit erreicht werden [[Weiß, 2001] und [Scherz and Bonn, 1998]].

2.4.2.1.3 *Massenspektrometrische Analyse (MS)*

Die Kopplung von chromatographischer Trennung mittels HPAEC-PAD und massenspektrometrischer Analyse gestaltet sich schwierig, da relativ große Mengen an flüssiger, mobiler Phase mit dem in einer Ionenquelle herrschenden Vakuum nicht kompatibel sind. Aus diesem Grund wurden verschiedene Interfaces entwickelt, die eine Kopplung zwischen HPAEC und MS möglich machen sollen. Dazu muss das Analytenmolekül von der Trennsäule der HPAEC in das Hochvakuum der massenspektrometrischen Analyse sowie in die Gasphase überführt werden [Weiß, 2001]. In dem vorliegenden Fall wird ein Electrospray-Interface genutzt, das den Analyten in einem elektrischem Feld zerstäubt [Gey, 2008]. Die grundlegenden Vorgänge bei einem ESI (Elektrospray-Ionisation)-Interface sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.

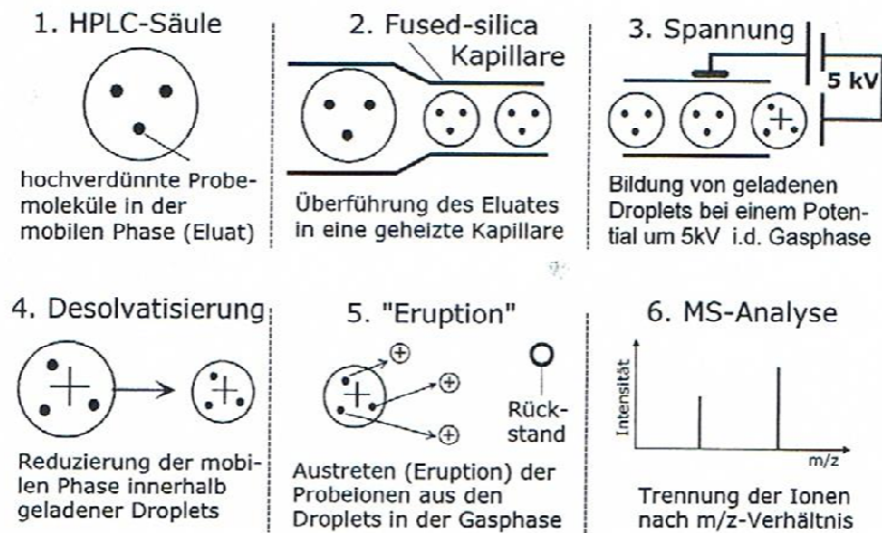


Abb. 2-12: Prinzipielle Vorgänge bei einem ESI-Interface nach Gey [2008]

Die aus der HPAEC-Säule eluierenden Analytenmoleküle enthalten noch eine große Menge an Flüssigkeit (siehe Nr. 1 in Abb. 2-12) und werden anschließend durch eine aufgeheizte Metallkapillare mit spannungsgeladener Metallkapillarspitze befördert (2). Durch die anliegende Spannung wird ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode gebildet. Auf Grund der daraus resultierenden elektrischen Aufladung des Säulen-Eluates entsteht an der Kapillarenspitze ein Aerosol mit geladenen, ca. 10 µm großen Tröpfchen (3). Anschließend kommt es zur Verdampfung des noch vorhandenen Lösungsmittels, was eine Verkleinerung der Tröpfchengröße und damit verbundene Erhöhung der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zur Folge hat (4). Ist der Radius der Tröpfchen kleiner als das Rayleigh-Limit (maximale Anzahl aufnehmbarer, gleicher Ladungen), kommt es zur Coulomb-Explosion, wobei die Tröpfchen zerfallen und die Analyten in die Gasphase übergehen (5). Danach ist eine Analyse mittels Massenspektrometrie möglich (6). Im Fall der Kohlenhydrate wird eine positive Spannung an der Kapillare angelegt und LiCl zur Ionisierungshilfe zugesetzt, wodurch Quasimoleküle wie $[M+H]^+$ oder $[M+Li]^+$ entstehen [Gey, 2008]. Bei der Elektrospray-Ionisation handelt es sich um eine weiche Ionisierungsart bei der kaum Fragmentierungen der Analyten auftreten. Diese Methode kann daher bei empfindlichen Molekülen eingesetzt werden [Gey, 2008]. Die Fragmentierung der Analyten kann durch geeignete MS-Bedingungen oder durch die Verwendung einer Tandem-MS erzwungen werden, wodurch eine Strukturaufklärung der Analyten ermöglicht wird

[Weiß, 2001]. Die ESI stellt eine hoch empfindliche, zuverlässige und zugleich robuste Methode zur Kopplung von HPAEC und MS dar [Weiß, 2001].

Neben dem Problem der Kopplung zwischen HPAEC und MS sorgt auch die hohe Salzkonzentration der Eluenten für eine Herausforderung in der Kohlenhydratanalytik. Da hohe Salzkonzentrationen nicht ohne weiteres in einen Massenspektrometer gelangen dürfen, kommen kontinuierlich arbeitende Suppressoren zum Einsatz. Die Suppressorsysteme werden genutzt, um die Grundleitfähigkeit des Eluenten auf chemischem Wege zu verringern ohne den Probeanalyten zu beeinflussen. Durch das Verwenden einer geeigneten Membran und das Anlegen einer Stromstärke von 100 mA werden die Eluationsmittel, die NaOH und NaAc enthalten, entsalzt. Als Suppressorprodukt entsteht Wasser oder Essigsäure, welche ohne Probleme in die Massenspektrometrie überführt werden können. Die in den Proben enthaltenen Oligosaccharide werden dabei nicht beeinflusst, da die Verweilzeit der Probeanalyten im Suppressorsystem zu gering ist [Weiß, 2001].

Unter Verwendung des Elektrospray-Interfaces und eines Suppressors kann eine massenspektrometrische Analyse mit Hilfe einer Ionenquelle und mehrerer Quadrupolen durchgeführt werden. Die Herausforderung stellt dabei die Zusammensetzung der OS-Mischungen dar. So haben zwei Fucose-Reste bis auf 1,03 Da dieselbe Masse wie ein Neu5Ac-Rest. Zudem besitzen fünf Fucosereste eine ähnliche Molekularmasse wie zwei Hex-HexNAc-Reste [Finke, 2000]. Aus diesem Grund ist eine Fragmentierung zur Strukturaufklärung empfehlenswert.

2.4.2.2 Weitere Analysensysteme

Neben der HPAEC-PAD/IT-MS können auch andere Analysenmethoden zur Detektion der Oligosaccharide herangezogen werden. So kann die chromatographische Trennung mittels NP/RP-HPLC (normal phase / reverse phase HPLC), HILIC-HPLC (hydrophilic interaction chromatography), CE-LIF (capillary electrophoresis laser induced fluorescence) oder HPLC-Chip durchgeführt werden. Massenspektrometrische Detektionen können auch mit MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight) erfolgen. Dies sind neben der HPAEC-PAD/IT-MS-Methode die am häufigsten in der Literatur beschriebenen Analysenmethoden und sollen in diesem Abschnitt erklärt werden.

Die Analyse mittels HPLC ist u. a. nur durch eine Derivatisierung der Kohlenhydrate mit fluoreszierenden Reagenzien möglich. Dabei kann eine Vorsäulenderivatisierung mit

2-Aminopyridin oder 9-Fluorenylmethylchlorformiathydrazin erfolgen oder eine Nachsäulenderivatisierung mit 2-Ethanolamin, Ethylendiamin, 2-Cyanoacetamid oder Acrylamidinen [Gey, 2008]. Außerdem können fluoreszierende Verbindungen wie 2-Aminobenzamid (2-AB), 2-Aminobenzoessäure (2-AA), 2-Amino(6-amidobiotinyl)pyridin (BAP), 2-Aminoacridon (2-AMAC) oder Benzylamin durch reduktive Aminierung Kohlenhydrate derivatisieren [[Gey, 2008], [Mehra and Kelly, 2006], [Broberg, 2007], [Novotny et al., 2013] und [France et al., 2000]]. Anschließend erfolgt die Analyse mittels NP- oder RP-HPLC. Die Elution erfolgt dabei meist mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten [Gey, 2008].

Wenn die Elution mit organischen Lösungsmitteln nicht durchführbar ist, kann auch auf einen wässrigen Eluenten in Kombination mit der HILIC-HPLC-Technik (hydrophilic interaction chromatography) zurückgegriffen werden. Dazu ist wie bei der NP-HPLC eine vorherige Derivatisierung notwendig [Ruhaak and Lebrilla, 2012]. Die anschließende Trennung beruht auf dem hydrophilen Charakter der Kohlenhydrate. Dabei wird die Interaktion zwischen Analyt und polarer stationärer Phase ausgenutzt [[Novotny et al., 2013] und [Marino et al., 2011]].

Eine weitere Möglichkeit der OS-Trennung stellt die Kapillarelektrophorese (CE) dar, die eine Analyse underivatisierte Kohlenhydrate im nahen UV-Bereich ermöglicht [[Gey, 2008] und [Mehra and Kelly, 2006]]. Die elektrophoretische Trennung kann ebenfalls nach der Derivatisierung der Kohlenhydrate (z. B. mit 9-Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate (APTS)) erfolgen [Albrecht et al., 2011]. Anschließend erfolgt die Trennung durch das Anlegen eines elektrischen Feldes mit konstantem pH-Wert und konstanter Ionenstärke des Migrationpuffers [Gey, 2008].

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung der OS ist die HPLC-Chip-Technik. Es handelt sich hierbei um wiederverwendbare Hochleistungs-LC-Chips, welche die herkömmliche LC-Säule ablösen. Dabei werden Probenanreicherung und Trennung eines Nanoflow-LC-Systems mit dem ESI-Interface verknüpft, wodurch ein hohes Totvolumen und die Gefahr der Undichtigkeit der Apparatur vermindert werden [www.agilent.de].

Zur massenspektrometrischen Detektion wird neben der vorliegenden IT-MS v. a. die MALDI-TOF-MS-Technik (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight) angewandt. Dabei wird der Analyt mit einem großen Überschuss an Matrix (ca. 1000- bis 10000-fach) vermischt und anschließend darin auskristallisiert. Beim Beschuss des

Analyten-Matrix-Gemisches mit einem Laser absorbiert die Matrix die Energie der verwendeten Laserwellenlänge, wodurch es zum Herauslösen intakter Analytenmoleküle aus der Matrix kommt. Dadurch erfolgt der Übergang des Analyten in die Gasphase und sogenannte Quasimolekülonen können massenspektrometrisch analysiert werden. Bei der Detektion von OS werden organische Matrizen (wie z. B. Siapinsäure) verwendet, wobei eine schonende Desorption und Ionisierung der Analyten stattfindet. Häufig erfolgt die Kombination der MALDI-Technik mit der TOF-Technik. Dabei wird die unterschiedliche Flugzeit von verschiedenen schweren Ionen ausgenutzt. So erreichen leichtere Ionen durch ihre schnellere Fluggeschwindigkeit den Massendetektor eher [Gey, 2008]. Beim Vergleich zwischen HPAEC-PAD und MALDI-TOF entstehen sehr ähnliche Ergebnisse, wobei die Standardabweichungen der HPAEC-Methode geringer ausfallen als mit der MALDI-TOF-Analyse. Die Unterschiede liegen meist unter 2,5 % [Grey, 2009].

Jede Analysetechnik für Oligosaccharide besitzt eine individuelle Trennungseigenschaft, wodurch sich ein Vergleich der verschiedenen Methoden sehr schwierig gestaltet [Kunz et al., 2000]. Die HPAEC-PAD-Technik wird dabei als „Gold Standard“ für die Kohlenhydratanalyse angesehen [Novotny et al., 2013].

Oligosaccharide bzw. Kohlenhydrate können mit diversen photometrischen Schnellmethoden analysiert werden, welche jedoch eine geringere Genauigkeit besitzen als die oben genannten Methoden. Neutrale Zucker können mit Hilfe des Resorcinol-Schwefelsäure-Tests analysiert werden. Dabei reagieren Hexosen bzw. Pentosen unter Säureeinwirkung und der Anwesenheit von Resorcinol zu einem roten bzw. orangen Farbstoff, der bei 430 nm photometrisch detektiert werden kann [Monsigny et al., 1988]. Sialinsäurehaltige Zucker können mit Hilfe des Perjodat-Resorcinol-Testes photometrisch bestimmt werden. Noch vorhandene Lactose in der Probelösung sollte so weit entfernt werden, dass ein Verhältnis zwischen Rest-Lactose und sialinsäurehaltigen Substanzen von 1:1 vorliegt, damit die photometrische Messung nicht verfälscht wird [Bhavanandan and Sheykhazari, 1993]. Anschließend wird die Probe mit Perjodat versetzt, um die glycosidisch gebundenen Sialinsäure-Reste zu oxidieren. Die entstandenen Reaktionsprodukte bilden nachfolgend mit Resorcinol Chromophore, die bei 630 nm photometrisch gemessen werden können [[Jourdain et al., 1971] und [Spyridaki and Siskos, 1996]].

Für die Analyse von Kohlenhydraten stehen somit eine Vielzahl an Analysemethoden - sowohl chromatographisch als auch photometrisch - zur Verfügung.

2.4.3 Validierung von Messmethoden

Unter Validierung „[...] sind die Qualitätsdaten von chemischen Analysen zusammengefasst, die eine Methode charakterisieren und ihre Leistungsdaten präsentieren. Diese Daten müssen bei neu entwickelten Methoden mittels statistischer Verfahren ermittelt werden [...]“ [Galensa et al., 1995]. Für die entwickelten Methoden sind die Parameter Messpräzision, Methodenpräzision, Wiederholbarkeit, Linearität, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze von großer Bedeutung. Die Messpräzision stellt das „[...] Maß für die Schwankungen dar, die durch das Analysengerät verursacht werden [...]“ [Wellmitz und Gluschke, 2005] und wird durch die Mehrfachanalyse eines Standards bestimmt. Der Standard sollte dabei sowohl mehrfach innerhalb einer Sequenz als auch an verschiedenen Tagen gemessen werden. Empfehlenswert ist dazu die Doppelbestimmung eines Standards in einer Sequenz an sechs bis zehn verschiedenen Tagen [Wellmitz und Gluschke, 2005]. Die Methodenpräzision ist das „[...] Maß für die zufällige Streuung der Analysenergebnisse über die gesamte Methode [...]“ [Wellmitz und Gluschke, 2005] und wird durch die Mehrfachmessung der gesamten Analyse (d. h. inkl. Probenvorbereitung) eines Standards innerhalb einer Sequenz bestimmt. Als Maß für die Wiederholbarkeit kann die Kombination von Mess- und Methodenpräzision genutzt werden [Wellmitz und Gluschke, 2005]. Die Formeln zur Berechnung der Messpräzision, Methodenpräzision und Wiederholbarkeit sind im Anhang unter Kapitel 6.1.4 dargestellt. Die Linearität stellt den „[...] Konzentrationsbereich dar, in welchem das Messsignal direkt proportional zur Analytenkonzentration ist [...]“ und kann durch die Messung von Standardkalibriergeraden angegeben werden [Wellmitz und Gluschke, 2005]. Als Nachweisgrenze wird die „[...] kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die qualitativ noch erfasst werden kann [...]“ definiert. Die Bestimmungsgrenze wird definiert als die „[...] kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die quantitativ noch erfasst werden kann [...]“ [Wellmitz und Gluschke, 2005]. Die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte nach DIN ISO 32645.

2.5 Enzymatische Synthese der Galacto-Oligosaccharide

Mit Hilfe des Enzyms β -Galactosidase (Lactase, EC 3.2.1.23) kann sowohl Lactose in die Monosaccharide Glucose und Galactose hydrolysiert als auch Galacto-Oligosaccharide in Folge einer Transgalactosylierungsreaktion gebildet werden. Das Enzym β -Galactosidase ist eine bakterielle Carbohydrase, die v. a. durch den Stoffwechsel von Milchsäurebakterien und

Hefen gebildet wird [Spreer, 2011]. Die β -Galactosidasen werden u. a. in der Milchtechnologie zur Lactosehydrolyse eingesetzt [Belitz et al., 2008], wobei v. a. lactosefreie Milchprodukte und Molkegetränke produziert werden [Ganzle et al., 2008]. Mit β -Galactosidasen versetzte Handelsprodukte wie Lactaid[®] sind dabei für lactoseintolerante Menschen verfügbar [Ganzle et al., 2008]. Als Nebenprodukt der Lactosehydrolyse entstehen geringe Mengen an GOS, die durch die Transgalactosylierungsaktivität desselben Enzyms gebildet werden. So konnten 950 mg/l bis 4350 mg/l GOS in lactosefreien UHT-Milchproben sowie 600 mg/l bis 2260 mg/l in lactosefreien UHT milchhaltigen Getränken gemessen werden [Ruiz-Matute et al., 2012]. In den nachfolgenden Abschnitten werden der Reaktionsmechanismus zur Bildung von GOS sowie diverse Einflussfaktoren auf den Mechanismus näher erläutert.

2.5.1 Lactosehydrolyse und Transgalactosylierung

In einem ersten Schritt der GOS-Synthese erfolgt die Lactosehydrolyse mit Hilfe der β -Galactosidase. Bei der Anwesenheit von Wasser als Akzeptormolekül kommt es in einem zweiten Schritt zur Produktion der Monosaccharide Glucose und Galactose. Falls während des zweiten Schrittes Lactose oder andere höhermolekulare Zucker als Akzeptor zur Verfügung stehen, können GOS gebildet werden [[Gänzle, 2012] und [Prensil et al., 1987]]. Der Reaktionsmechanismus zur GOS-Bildung ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

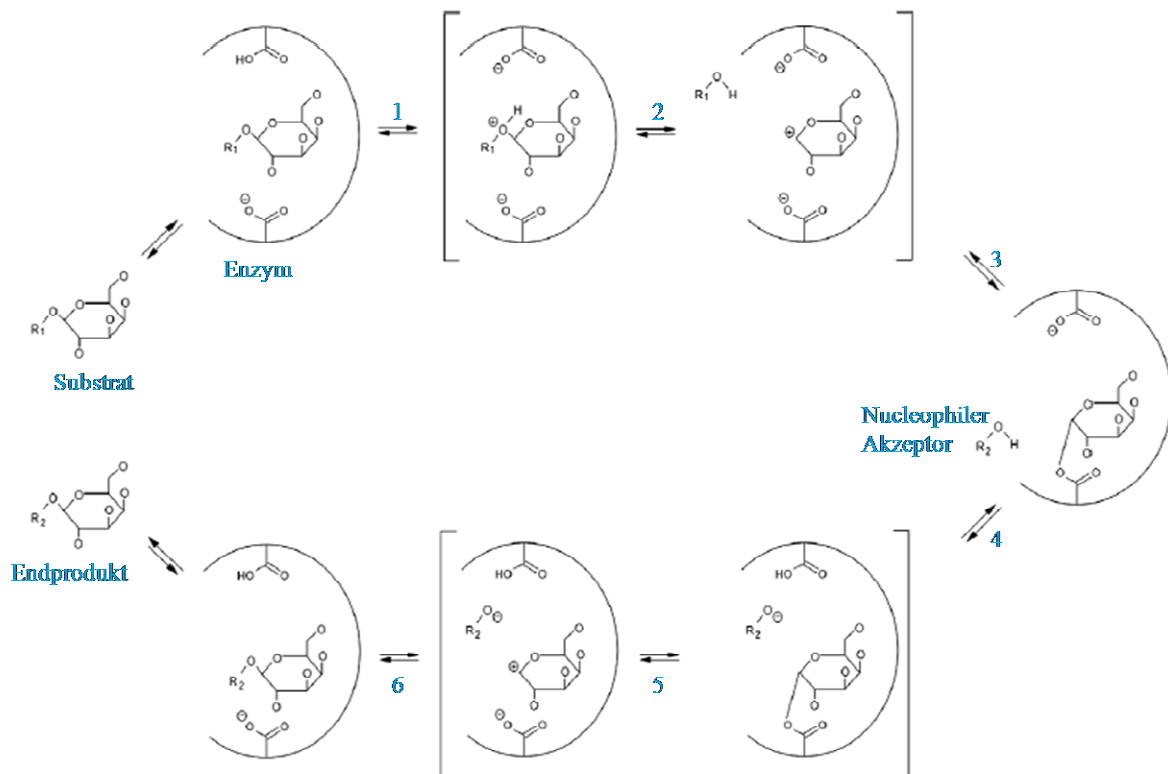


Abb. 2-13: Reaktionsmechanismus der β -Galactosidaseaktivität auf Kohlenhydrate (R_1 = Aglykan-Rest des Galactosid-Substrat, R_2 = nucleophile Galactosyl-Rezeptor) nach Gosling et al. [2010]

Die funktionelle Gruppe des Enzyms wirkt in einem ersten Schritt der GOS-Synthese als Säure und gibt ein Proton ab. Dieses Proton wird vom glycosidisch gebundenen Sauerstoff des Substratmoleküls gebunden, wodurch ein positiv geladenes Substratmolekül entsteht (siehe Nr. 1 in Abb. 2-13). Anschließend wird der Aglykanrest - bei einem Lactosesubstratmolekül ist der Aglykanrest Glucose - abgespalten und ein positiv geladenes Galactosyl-Intermediat entsteht (2). Dieses positiv geladene Galactosyl-Intermediat wird durch eine weitere funktionelle, negativ geladene Gruppe des Enzyms stabilisiert (3). Dabei entsteht eine kurzlebige kovalente Bindung. Anschließend erfolgt die Reaktion mit einem nucleophilen Akzeptormolekül. Das nucleophile Akzeptormolekül gibt ein Proton ab, das von der negativ geladenen Carboxylgruppe des Enzyms aufgenommen wird (4), so dass das Akzeptormolekül negativ geladen vorliegt. Dieses negativ geladene Molekül greift die kovalente Substrat-Enzym-Bindung an. Die kovalente Bindung wird destabilisiert und das positiv geladene Galactosyl-Intermediat wird frei gesetzt (5). Daraufhin reagieren das negativ geladene Akzeptormolekül mit dem positiv geladenen Galactosyl-Intermediat miteinander (6), wodurch sich das Endprodukt bildet. Ist das Akzeptormolekül Wasser, läuft die Hydrolyse ab und freie

Galactose-Moleküle entstehen. Falls als Akzeptor höhermolekulare Zucker vorliegen, erfolgt die Bildung von GOS-Molekülen. Die Hydrolyse dominiert dabei über die Transgalactosylierungsreaktion, da die Konzentration an Wasser meist sehr hoch ist. Die GOS-Bildung ist somit abhängig von der Hydrolyse- bzw. Transgalactosylierungsaktivität des Enzyms. Die β -Galactosidase zeigt dabei eine hohe Substrat-Spezifität zu Galactosyl-Glykanen, die β -glycosidisch gebunden sind [[Gosling et al., 2010] und [Mahoney, 1998]].

2.5.2 Einflussfaktoren auf die enzymatische GOS-Synthese

Verschiedene Einflussfaktoren wie der Ausgangslactosegehalt, die Enzymquelle, die Temperatur, der pH-Wert, das Enzym-Substrat-Verhältnis, der Gehalt an Monosacchariden oder der Salzgehalt können die enzymatische Synthese der GOS beeinflussen. Eine Literaturübersicht über die optimalen GOS-Ausbeuten mit den drei in der Arbeit verwendeten Enzymen und damit einhergehenden Prozessbedingungen ist im Anhang in Tab. 6-4 dargestellt.

2.5.2.1 Einfluss des Ausgangslactosegehalts auf die enzymatische GOS-Synthese

Der größte Einfluss wird dem Ausgangslactosegehalt zugeschrieben. Nach Gänzle [2012] reduziert ein hoher Lactosegehalt die Verfügbarkeit von Wasser als alternativer Galactosylakzeptor, wodurch das Reaktionsgleichgewicht zur GOS-Seite hin verschoben wird. Dabei ist zu beachten, dass Lactose nur eine Löslichkeit von 25 % bei 37 °C (w/v) besitzt, wobei die Löslichkeit durch Erwärmen der Lösung stark erhöht werden kann [Gänzle, 2012]. Allgemein gilt: je höher der Ausgangslactosegehalt ist, umso größer ist die GOS-Ausbeute [u. a. [Gosling et al., 2011], [Rustom et al., 1998], [Goulas et al., 2007], [Splechna et al., 2007], [Neri et al., 2009] und [Rodriguez-Colinas et al., 2012]] und desto mehr höherkettige GOS werden gebildet [Boon et al., 2000].

2.5.2.2 Einfluss der Enzymquelle auf die enzymatische GOS-Synthese

Nach der Ausgangslactosekonzentration besitzt die Wahl der Enzymquelle den größten Einfluss auf die GOS-Synthese. Nach Tab. 6-4 im Anhang kann die höchste GOS-Ausbeute mit 39 % bis 49 % mit Hilfe der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* [[Gosling et al., 2009], [Rodriguez-Colinas et al., 2012], [Palai et al., 2012] und [Gosling et al., 2011]] erreicht

werden, gefolgt von der β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* mit Ausbeuten von 20 % bis 30 % [[Urrutia et al., 2013], [Rustom et al., 1998], [Chen et al., 2002], [Matella et al., 2006], und [Valero, 2009]]. Die geringste GOS-Ausbeute von 10 % bis 20 % kann mit Hilfe der β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis* erzielt werden [[Martinez-Villaluenga et al., 2008], [Foda and Lopez-Leiva, 2000], [Rustom et al., 1998], [Chockchaisawasdee et al., 2005], [Mozaffar et al., 1985] und [Montilla et al., 2012]]. Die Reihenfolge der GOS-Ausbeuten durch verschiedene Enzymquellen kann von Boon et al. [2000] bestätigt werden. Mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* können höhermolekulare GOS und eine damit verbundene größere GOS-Vielfalt gebildet werden [Boon et al., 2000].

2.5.2.3 Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die enzymatische GOS-Synthese

Parameter wie Temperatur und pH-Wert sollten bei der enzymatischen Synthese so gewählt werden, dass eine optimale Enzymaktivität erreicht wird. Dabei sind die Bedingungen für eine optimale Transgalactosylierungsaktivität jedoch nicht zwingend analog zu den Bedingungen einer optimalen Hydrolyseaktivität. Nach Boon et al. [2000] und Töpel [1991] sorgen höhere Temperaturen für höhere GOS-Ausbeuten. Dies ist jedoch nur begrenzt möglich, da das Enzym bei höheren Temperaturen denaturieren kann, was zu einer Abnahme der GOS-Ausbeute führen würde [[Neri et al., 2009] und [Vera et al., 2011]]. Oft werden Temperaturen zwischen 25 °C und 60 °C je nach eingesetztem Enzym für die Reaktion genutzt.

Der Einfluss des pH-Wertes ist durch eine mögliche Denaturierung des Enzyms stark begrenzt. Je nach eingesetztem Enzym muss der pH-Wert angepasst werden. So benötigen Enzyme aus *Aspergillus* tendenziell saure pH-Werte und β -Galactosidasen aus *Bacillus*-Arten oder *Kluyveromyces*-Arten neutrale pH-Werte. Häufig werden pH-Werte zwischen 4,5 und 7,5 eingestellt.

2.5.2.4 Einfluss der Enzymkonzentration auf die enzymatische GOS-Synthese

Die Enzymkonzentration beeinflusst - ebenso wie die Temperatur und der pH-Wert - die GOS-Synthese nur geringfügig. Nach Cardelle-Cobas et al. [2008] und Hellerova and Curda [2009] wird durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration die GOS-Ausbeute nicht beeinflusst, sondern nur die Reaktionszeit minimiert.

2.5.2.5 Einfluss des Monosaccharidgehalts auf die enzymatische GOS-Synthese

Ein weiterer Einflussfaktor auf die GOS-Ausbeute ist der Gehalt an Monosacchariden. Glucose und Galactose sind kompetitive Inhibitoren für die GOS-Synthese und sorgen für eine Verringerung der GOS-Ausbeute [[Rodriguez-Fernandez et al., 2011], [Palai et al., 2012], [Vera et al., 2011] und [Neri et al., 2009]]. Bei einer Entfernung der gebildeten Monosaccharide wird eine Inhibierung des Enzyms β -Galactosidase verhindert [[Czermak et al., 2003] und [Czermak et al., 2004]]. Je höher der Ausgangslactosegehalt, desto ausgeprägter ist die Inhibierung durch die während der enzymatischen Reaktion gebildeten Monosaccharide [Das et al., 2011]. Allerdings scheint der positive Effekt einer hohen Ausgangslactosekonzentration ausgeprägter zu sein als der inhibitorische Effekt der gebildeten Monosaccharide. Die inhibierenden Effekte der Monosaccharide zeigen je nach eingesetztem Enzym sehr unterschiedliche Wirkungen. So sorgt v. a. Glucose für die Inhibierung der β -Galactosidase aus *B. circulans*, während Galactose für die Inhibierung der β -Galactosidase aus *A. oryzae* verantwortlich ist. Der Effekt beider Monosaccharide auf die β -Galactosidase aus *K. lactis* ist dagegen weniger inhibierend [Boon et al., 2000].

2.5.2.6 Einfluss des Salzgehalts auf die enzymatische GOS-Synthese

Einen besonderen Einflussfaktor für die β -Galactosidase aus *K. lactis* stellt der Salzgehalt der Lösung dar. Die optimale Aktivität des Enzyms wird erst nach Einstellen einer bestimmten Salzkonzentration erlangt. Nach Boon et al. [2000] wird Magnesiumchlorid zur enzymatischen Reaktion zugesetzt, um die Enzymstabilität zu verbessern. Dadurch erhöht sich die maximale Ausbeute an Trisacchariden (und damit auch GOS) [Montilla et al., 2012].

2.5.2.7 Weitere Einflussfaktoren auf die enzymatische GOS-Synthese

Die bisher genannten Einflussfaktoren beziehen sich auf die enzymatische GOS-Synthese mit nicht immobilisiertem Enzym im Batch-Verfahren. Die GOS-Synthese kann jedoch auch mit immobilisierten Enzymen im kontinuierlichen Verfahren mit Hilfe von Membranreaktorsystemen durchgeführt werden. Durch die Immobilisierung des Enzyms ist eine Wiederverwendbarkeit und eine verbesserte thermische Stabilität des Enzyms gewährleistet [[Neri et al., 2009] und [Valero, 2009]]. Zudem wird so ein kontinuierliches Arbeiten und eine stabile GOS-Bildung ermöglicht [Valero, 2009]. Dies ist für ein späteres Upscaling der entwickelten Prozesse im großtechnischen Bereich von Bedeutung.

Verschiedene Forschungsgruppen [[Matella et al., 2006], [Neri et al., 2009], [Urrutia et al., 2013] und [Pruksasri, 2007]] konnten beim Einsatz der immobilisierten Enzyme im kontinuierlichem Verfahren keine signifikant höhere GOS-Ausbeute erzielen. Allerdings konnte eine ähnliche GOS-Kinetik zwischen der Reaktion mit freiem und immobilisiertem Enzym festgestellt werden [[Valero, 2009] und [Pruksasri, 2007]].

In Membranreaktorsystemen werden Cross-Flow-Ultrafiltration-Techniken (siehe Kapitel 2.6.1) eingesetzt, um das Enzym vom entstandenen Reaktionsgemisch, welches Mono- und Disaccharide (siehe Kapitel 2.5.2.5) sowie GOS enthält, abzutrennen. Die Membran wird dabei so gewählt, dass der NMWCO (Nominal Molecular Weight Cut Off) bei circa 50000 Da liegt [[Czermak et al., 2003] und [Czermak et al., 2004]]. Nach Das et al. [2011] wird so die Ausbeute um 33 % im Vergleich zum Batch-Verfahren erhöht. Dabei ist das OS-Muster zwischen diskontinuierlichem und kontinuierlichem Prozess unverändert [Chockchaisawasdee et al., 2005]. Somit wäre der Einsatz von immobilisierten Enzymen und von Membranreaktoren für ein späteres großtechnisches Upscaling der GOS-Synthese denkbar.

In dieser Arbeit werden die drei zurzeit industriell erhältlichen Enzyme (*Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* und *Bacillus circulans*) im Batch-Verfahren als freie (nicht immobilisierte) Enzyme untersucht. Zu den Untersuchungen zählt die Analyse diverser Einflussfaktoren wie pH-Wert, Temperatur, Enzym-Substrat-Verhältnis und Enzymquelle, wobei die oben dargestellten Korrelationen nur allgemeingültig sind und noch nicht für die hier dargestellten Enzyme belegt werden konnten. Anschließend erfolgt die direkte Analyse der maximalen GOS-Ausbeuten mittels HPAEC-PAD/IT-MS.

2.6 Aufreinigung von Oligosacchariden

Eine Aufreinigung der milcheigenen Oligosaccharide ist notwendig, da diese zu den Minorkomponenten gehören. Bei einem Lactosegehalt von 5 g/100ml in Kuhmilch [Souci et al., 2008] sind nur circa 0,003 g/100ml - 0,006 g/100ml MOS [Martinez-Ferez et al., 2006] detektierbar. Somit liegt ein Faktor von etwa 1000 zwischen diesen beiden Analytengruppen. Dieser Fakt und die Tatsache der sehr geringen Konzentrationen an MOS in den Milchproben macht eine Aufreinigung der MOS erforderlich. Diese Aufreinigung sollte so erfolgen, dass die Konzentrationen für einen späteren Einsatz in einem Lebensmittel ausreichend sind. Als

Ausgangsmaterial wird dabei v. a. Kuhmilch in Betracht gezogen, da diese im Gegensatz zu den anderen Tierarten (Schaf, Ziege, Kamel, Human und Stute) im Industriemaßstab verfügbar ist. Zur Aufreinigung der OS sollen in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Methoden - Nanofiltration (siehe Kapitel 2.6.1) und präparative Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 2.6.2) - gegenübergestellt werden.

2.6.1 Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration

2.6.1.1 Definitionen und Einteilung der Nanofiltration

Nach Matissek and Steiner [2006] werden bei einer Filtration „[...] feste oder kolloidale Partikel von einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen getrennt [...]“. Je nach Größe der zu trennenden Partikel kann mit verschiedenen Filtrationsverfahren gearbeitet werden (siehe Abb. 2-14).

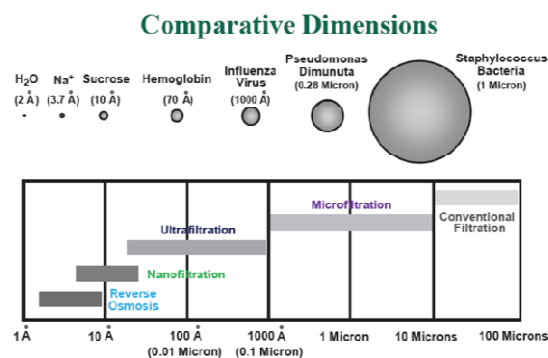


Abb. 2-14: Einteilung der verschiedenen Filtrationsprozesse nach Partikelgröße [Koch Membrane Systems, 2011]

Bei einer Partikelgröße von ca. 50 Å bis 100 Å bzw. einer Molekülmasse von 10³ Da bis 10⁶ Da erfolgt die sogenannte Ultrafiltration und von ca. 5 Å bis 50 Å bzw. 100 Da bis 1000 Da die Nanofiltration (siehe Abb. 2-14). Die Trennung zwischen Oligosacchariden (ca. 500 Da - 1500 Da) und Lactose (342,3 Da) fällt somit in den Bereich der Nanofiltration. Mittels Nanofiltration können divalente und größere Ionen von monovalenten Ionen abgetrennt werden, wodurch der überwiegende Einsatz diese Technik in der Entsalzung stattfindet. Weitere großtechnische Anwendungsbereiche sind die Lactoseabtrennung von der Käsemolke, Pestizidelimination und die Reinigung der Natronlauge [Koch Membrane

System, 2011]. Die Nanofiltration ist im Gegensatz zur Chromatographie großtechnisch einsetzbar, benötigt jedoch viel Zeit, hohe Drücke und viel Eluat (Wasser), was einen hohen Energieaufwand zur Folge hat [Hernández et al., 2009]. Des Weiteren kann die Nanofiltration in zwei Varianten unterteilt werden: Dead-End-Nanofiltration und Cross-Flow-Nanofiltration.

2.6.1.2 Dead-End-Filtration

Diese Methode ist sehr effektiv, wenn die Konzentration der zu entfernenden Partikel recht gering ist. Anwendung findet diese Methode bei dem Gebrauch von handelsüblichen Wasserfiltern, Kfz-Ölfiltren sowie bei der Sterilfiltration von Wasser, Bier und Wein [Koch Membrane System, 2011]. Das Prinzip der Dead-End-Filtration ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

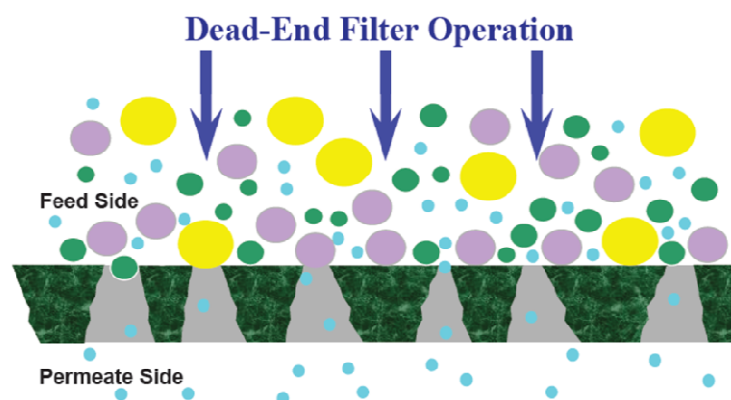


Abb. 2-15: Prinzip der Dead-End-Nanofiltration [Koch Membrane System, 2011]

Bei der Dead-End-Filtration wird die Flüssigkeit im rechten Winkel durch die Membranoberfläche filtriert (siehe Abb. 2-15).

Grandison et al. [2003] und Goulas et al. [2003] nutzen dieses Verfahren um Mono- von Di- und Galacto-Oligosacchariden abzutrennen. Dabei konnten Monosaccharide zu 81 % abgetrennt und Di- und Galacto-Oligosaccharide zu 88 % im Retentat wiedergefunden werden. Eine Trennung zwischen Di- und Galacto-Oligosacchariden war nicht möglich. Außerdem haben Grandison et al. [2003] festgestellt, dass elektrisch geladene Oligosaccharide die Trennung beeinflussen. Über den Einfluss vom Druck auf den Rückhalt

bestimmter Zucker sind nur kontroverse Daten vorhanden. Der Aufbau einer solchen genutzten Dead-End-Filtrationseinheit ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

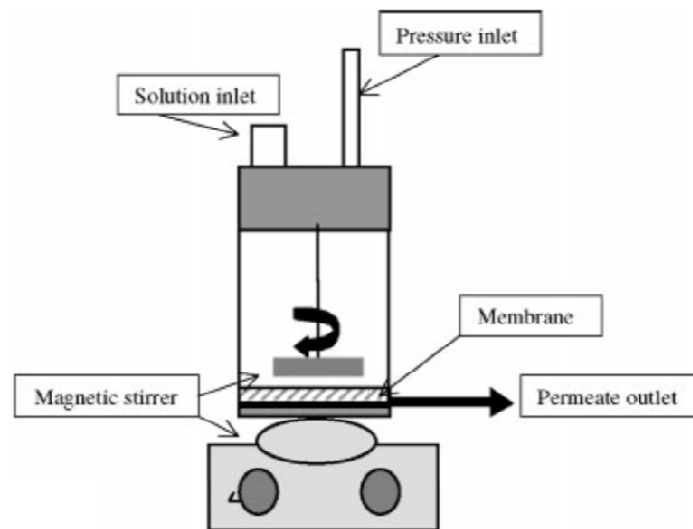


Abb. 2-16: Aufbau einer Dead-End-Filtrationseinheit [Goulas et al., 2003]

Für die Dead-End-Filtration wird die wässrige Zuckerlösung über den Substratzulauf (Solution Inlet) in das Filtrationssystem eingebracht und anschließend mit Hilfe von Stickstoff (aus dem Pressure inlet) durch die Membran gepresst. Das entstehende Permeat wird über den Permeatablauf abgezogen. Idealerweise sollten die OS auf der Retentatseite verbleiben.

2.6.1.3 Cross-Flow-Filtration

Die zweite Variante der Nanofiltration ist die Cross-Flow-Filtration (siehe Abb. 2-17)

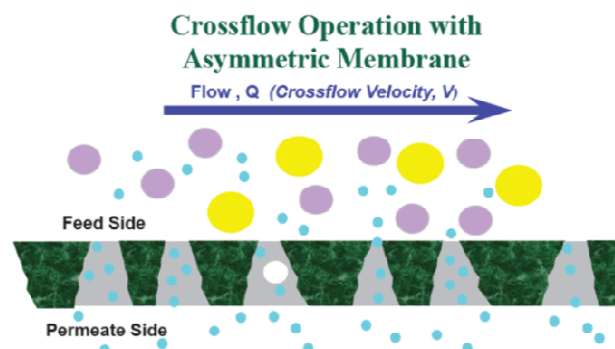


Abb. 2-17: Prinzip der Cross-Flow-Nanofiltration [Koch Membrane System, 2011]

Bei der Cross-Flow-Filtration wird die Flüssigkeit mit einer definierten Überströmgeschwindigkeit über eine Membran geführt (siehe Abb. 2-17). Die Konzentration der Analyten im Retentat ist dabei abhängig von der Überströmgeschwindigkeit (Crossflow Velocity, V). Mit Hilfe dieser Technik werden im Vergleich zur Dead-End-Filtration stabilere Filtrationsraten und höhere Konzentrationen an den zurückgehaltenen Partikeln erreicht. Daher ist eine Filtration von viskosen Flüssigkeiten und Flüssigkeiten mit einem hohen Anteil an Feststoffen möglich.

Die Cross-Flow-Nanofiltration kann mit verschiedenen Membrantypen durchgeführt werden: tubulär, als Flachmembran, als Spiralwickelmodul oder als Hohlfaser. Die Membranen bestehen überwiegend aus Polymeren oder Keramik. Keramik wird nur in speziellen Fällen eingesetzt, z. B. wenn der erforderliche pH-Wert, Temperatur oder Reinigungsmethoden den Einsatz von Polymermembranen nicht zulassen [Koch Membrane System, 2011]. Eine häufig industriell verwendete Form ist das Spiralwickelmodul. Für Versuchszwecke sind Flachmembranen auf Grund ihrer Variabilität dienlich (siehe Abb. 2-18).

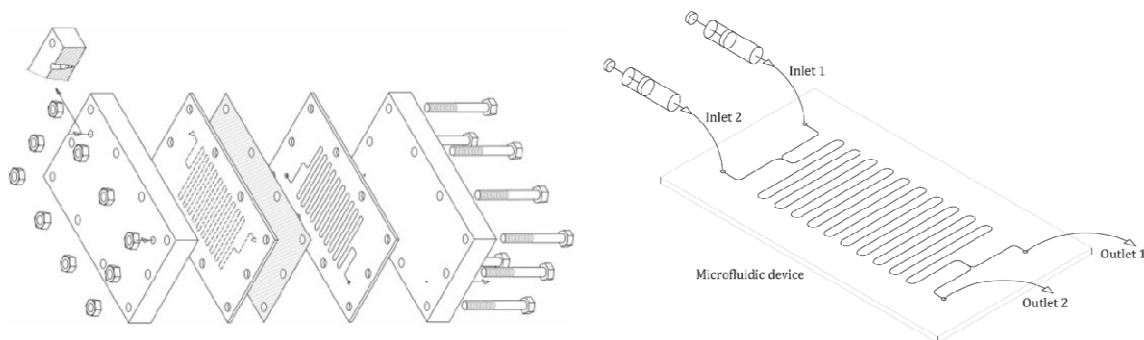


Abb. 2-18: Aufbau einer Cross-Flow-Nanofiltrationseinheit mit Flachmembranen [Kofschoten et al., 2011]

Die Nutzung mehrerer Flachmembranen erfolgt dabei meistens in Reihe, damit die Membranoberfläche und die Trennleistung der Nanofiltration erhöht wird. Mit Hilfe von Inlet 1 wird Wasser und mit Inlet 2 die wässrige Zuckerlösung in das System eingeführt. Anschließend erfolgt die Trennung durch Massendiffusion in die verschiedenen Bestandteile der Zuckerlösung. Die Oligosaccharide sollten analog zur Dead-End-Filtration auf der Retentatseite verbleiben.

2.6.1.3.1 Einflussfaktoren auf die Cross-Flow-Filtration

Diese Trennung der Zuckernanalyten - Oligosaccharide und Lactose - ist von vielen verschiedenen Faktoren wie der Trenngrenze (NMWCO) der Membran, der molekularen Masse der zu filtrierenden Substanz, der Polarität, der Form sowie der Zusammensetzung der Oligosaccharide (Anzahl der Monomere, Verknüpfungspositionen, Anwesenheit anderer Zucker oder Salze) abhängig [[Botelho-Cunha et al., 2010], [Hernández et al., 2009] und [Pruksasri, 2007]]. Außerdem spielen die Faktoren Druck, Temperatur, Zuckerkonzentration und Flux bei der Nanofiltration eine entscheidende Rolle. Die Effekte der einzelnen Faktoren werden in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass unterschiedliche Membranmaterialien (z.B. Polyethersulfon vs. Celluloseacetat vs. Keramik) und Konstruktionen (z. B. Flachmembran vs. Spiralwickelmodul vs. Hohlfasermembran) genutzt und außerdem abweichende Verfahrensbedingungen (Aufkonzentrierungsfaktoren und Waschvolumen) gewählt wurden. Optimal für die Abtrennung der Lactose von den OS ist nach Feng et al. [2009] eine Membran mit hohem Permeatfluss und folglich hohem Durchsatz, geringem Rückhalt an Mono- und Disacchariden sowie großem Rückhalt an Trisacchariden und höheren Oligosacchariden.

Einfluss des Drucks auf die Cross-Flow-Filtration

Nach Atra et al. [2005], Botelho-Cunha et al. [2010], Feng et al. [2009], Goulas et al. [2002] und Grandison et al. [2003] wird durch einen Anstieg des verwendeten Nanofiltrationsdrucks auch der Permeatfluss und der Rückhalt der Zucker erhöht, was im vorliegenden Fall für Mono- und Disaccharide unerwünscht ist. Dieser Effekt ist für Zuckermoleküle mit geringer Molekülmasse größer als für hochmolekulare Moleküle. Nach Botelho-Cunha et al. [2010] bleibt der Rückhalt von Trisacchariden bei unterschiedlichen Drücken sogar unbeeinflusst. Mit steigendem Druck sinkt die Differenz zwischen den Rückhalten von Mono- und Trisacchariden, wodurch die Trennung verschlechtert wird. Ein geringer Druck ist daher empfehlenswert, womit der Permeatfluss und der Durchfluss verringert wird. Dies hat zur Folge, dass die Nanofiltration sehr zeitaufwändig wird. Somit muss ein Kompromiss zwischen notwendigem Permeatfluss und gewünschtem Rückhalt gefunden werden [Feng et al., 2009]. Pruksasri [2007] und Sarney et al. [2000] kommen hingegen zu der Erkenntnis, dass ein erhöhter Druck nur den Permeatfluss erhöht und der Zuckerrückhalt unbeeinflusst bleibt.

Einfluss der Temperatur auf die Cross-Flow-Filtration

Der Einfluss der Temperatur auf den Zuckerrückhalt ist invers zum Druck. Durch eine Erhöhung der Temperatur sinkt der Rückhalt der Zuckercomponenten, was für den Rückhalt der Mono- und Disaccharide wünschenswert ist. Dieser Effekt ist bei Molekülen mit geringem Molekulargewicht größer, weshalb eine Trennung bei höheren Temperaturen empfehlenswert ist [[Botelho-Cunha et al., 2010], [Feng et al., 2009], [Goulas et al., 2002] und [Grandison et al., 2003]]. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt zudem eine Verringerung der Zuckerviskosität und eine Weitung der Membranporen, was zu einem erhöhten Permeatfluss führt [[Feng et al., 2009] und [Goulas et al., 2002]]. Im Gegensatz dazu kommt Atra et al. [2005] zu der Erkenntnis, dass bei steigender Temperatur vermehrt Lactose im Retentat zurückgehalten wird. Dies ist nicht wünschenswert, da Lactose in das Permeat übergehen soll.

Einfluss der Ausgangszuckerkonzentration auf die Cross-Flow-Filtration

Durch einen Anstieg der Ausgangszuckerkonzentration sinkt der Rückhalt der Zuckercomponenten, was positiv für Mono- und Disaccharide wäre. Dieser Effekt ist für Mono- und Disaccharide größer als für höhermolekulare Zucker. Eine bessere Trennung kann daher bei erhöhten Ausgangszuckerkonzentrationen erreicht werden [[Botelho-Cunha et al., 2010], [Feng et al., 2009], [Goulas et al., 2002], [Grandison et al., 2003] und [Pruksasri, 2007]]. Jedoch steigt mit erhöhter Zuckerkonzentration auch die Viskosität der Lösung und führt damit auch zu einer Abnahme des Permeatflusses. Folglich muss ein Kompromiss gefunden werden, um einen notwendigen Permeatfluss zu gewährleisten und gleichzeitig eine gewünschte Trennung zu erzielen [Feng et al., 2009].

Einfluss des Volumenstroms auf die Cross-Flow-Filtration

Durch eine Erhöhung des Volumenstroms auf der Retentatseite der Membran werden dieselben Effekte erreicht wie durch den Anstieg des Druckes. Die Volumenstrom-Erhöhung steigert den Rückhalt der Zucker (nicht erwünscht für Mono- und Disaccharide), wobei der Einfluss auf Monosacchariden größer ist als bei höher molekularen Oligosacchariden. Damit ist ein geringer Volumenstrom für die Zuckertrennung empfehlenswert, was zur Folge hat, dass der Permeatfluss sinkt. Ein Kompromiss zwischen geringem Volumenstrom und

erwünschtem Permeatfluss muss dementsprechend gefunden werden [[Atra et al., 2005], [Goulas et al., 2002], [Grandison et al., 2003] und [Pruksasri, 2007]].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Faktoren Druck, Temperatur, Ausgangszuckerkonzentration und Volumenstrom den größten Einfluss auf die Lactoseabtrennung von den Oligosacchariden haben.

2.6.1.3.2 *Erfolge der Cross-Flow-Nanofiltration*

Feng et al. [2009] konnte mit Hilfe der Nanofiltration 90,5 % der Monosaccharide und 52,5 % der Ausgangslactose einer Zuckerlösung, bestehend aus Mono-, Di- und Galacto-Oligosaccharide, entfernen. Der Rückhalt von GOS betrug 70 % mit einer Reinheit von 54,5 %, (1,5mal höher als im Ausgangsprodukt). Ähnliche Werte erzielten Goulas et al. [2002] und Grandison et al. [2003]. Es konnten 82 % - 86 % Monosaccharide und 11 % - 41 % Lactose entfernt werden, wobei die Ausbeute an Trisacchariden 81 % - 98 % betrug. Bei all diesen Versuchen ist bemerkenswert, dass Monosaccharide von den Oligosacchariden getrennt werden konnten, aber Disaccharide immer noch im Endprodukt zu großen Anteilen enthalten waren. Nach Sarney et al. [2000] kann die Lactose enzymatisch in ihre Monosaccharide gespalten und so die Trennung deutlich verbessert werden. Durch die verbesserten Trennbedingungen konnte aus einem Liter entfetteter, enzymbehandelter Humanmilch 6,7 g HMOS gewonnen werden, wobei der verbleibende Lactosegehalt im Endprodukt gering war. Die Reinheit des Produkts betrug 97 % [Sarney et al., 2000]. Martinez-Ferez et al. [2006] und Oliveira et al. [2012] verwendeten einen zweistufigen tangentialen Ultrafiltrations-Nanofiltrationsprozess, um die Lactoseabtrennung von den OS zu optimieren. Dabei wurden mit Hilfe einer 50kDa-Ultrafiltrationsmembran aus Keramik Proteine und Fett entfernt sowie mit einer 1kDa-Nanofiltrationsmembran aus Keramik die Zucker aufgetrennt. Auf diese Weise entstand ein nahezu lactose- und salzfreies Produkt mit mehr als 80 % Wiederfindung der originalen Oligosacchariden aus Ziegenmilch. Der Lactosegehalt im Endprodukt lag bei circa 5 % - 7 % [[Martinez-Ferez et al., 2006] und [Oliveira et al., 2012]].

Eine Aufreinigung der milcheigenen Oligosaccharide mittels Nanofiltration scheint somit möglich, wobei die Wahl der Membran sowie diverser Prozessparameter von Bedeutung sind.

Die Ergebnisse der hier dargestellten Versuche mit GOS bzw. Human- und Ziegenmilch sollen auf Kuhmilch und Milch anderer Tierarten übertragen werden können.

2.6.2 Aufreinigung der Oligosaccharide mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle

Die präparative Chromatographie an Aktivkohle lehnt sich an die Probenaufarbeitung von Oligosacchariden mittels GCC-SPE an. Oligosaccharide besitzen eine höhere Affinität zur Aktivkohle als Mono- oder Disaccharide, wodurch eine Trennung der einzelnen Zuckerkomponenten möglich ist [Boon et al., 2000]. Die Eluation der Zuckerkomponenten erfolgt mit Hilfe eines Ethanol-Wasser-Gemisches [Boon et al., 2000]. Je nach gewählter Ethanolkonzentration kann die Wiederfindung bestimmter Zuckerkomponenten beeinflusst werden. Somit ist eine Abtrennung der Mono- und Disaccharide von den GOS möglich [Hernández et al., 2009]. Mit Hilfe dieser Methoden können auch neutrale und saure OS getrennt werden [Strum et al., 2012]. Analog zur Ethanol-Eluation kann auch Methanol oder Acetonitril verwendet werden [[Strum et al., 2012] und [Ward, 2009]].

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Tab. 3-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	$\geq 99,9$ % (GC) System	Merck KGaA, Darmstadt
3'-Acetylneuraminyl-D-lactose (3'-Sialyllactose) Natriumsalz, von Kuhkolostrum	ca. 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
6'-Acetylneuraminyl-D-lactose (6'-Sialyllactose) Natriumsalz, von Kuhkolostrum	$\geq 97,0$ %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	99 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Adenosin	mind. 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosin-5'-Mono- phosphat (AMP) Natriumsalz	mind. 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aktivkohle Darco [®] (100 mesh particle size, powder)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ameisensäure	98 % - 100 % zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Beetle Lysis-Juice		PJK GmbH, Kleinbittersdorf

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
BioGel [®] P-2 Gel (extra fine, < 45 µm)		Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead (GB)
1-Butanol	zur Analyse ≥ 99,5 % (GC)	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Carrez I (Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat)	mind. 99 % zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Carrez II (Zinksulfat-Heptahydrat)	99,5 % - 103,0 % zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	99,8 % (GC)	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)		PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dowex (1 x 8, 200 mesh - 400 mesh, Chlorid-Form)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisen(III)-chlorid	wasserfrei p. a.	Fluka AG, Steinheim
Eisessig	mind. 99,8 % (alkalimetrisch)	Merck KGaA, Darmstadt
Enzymkit Lactose/D-Galactose	reinst	Roche R-Biopharm AG, Darmstadt
Ethanol	99 % vergällt mit 1 % Methyl-ethylketon	Merck KGaA, Darmstadt
F 002-A1 <i>Bifidobacterium bifidum</i> , aus Faeces von Erwachsenen (2004), Lagerung bei -80 °C		Stammsammlung vom Institut „Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT)“ des Max Rubner-Instituts Kiel

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
F 011 A3 <i>Bifidobacterium longum</i> , aus Faeces von Erwachsenen (2004), Lagerung bei -80 °C		Stammsammlung vom Institut „Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT)“ des Max Rubner-Instituts Kiel
F 024 A1 <i>Bifidobacterium longum</i> , aus Faeces von Erwachsenen (2004), Lagerung bei -80 °C		Stammsammlung vom Institut „Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT)“ des Max Rubner-Instituts Kiel
FCS (Fetal Calf Serum)		PAA Laboratories GmbH, Cölbe
2'-Fucosyl-D-lactose, von Humanmilch	ca. 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-Fucosyl-D-lactose	≥ 95,0 % (TLC)	Fluka AG, Steinheim
D-(-)-Fructose	min. 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
G418 (Geneticin)		AppliChem GmbH, Darmstadt
D-(+)-Galactose	beinhaltet < 0,01 % Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Acetyl-galactosaminyl-lactose		Dextra Laboratories Ltd., Reading (GB)
Gluconsäure	50%ige Lösung in Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
α-D-Glucose	p. a. wasserfrei analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D-Glucose	p. a. wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
GOS90 (Galacto-Oligosaccharid-Mischung, bestehend aus 1 % Gal, 2 % Glc, 5 % Lac und 90 % Tri- bis Pentasaccharide)	75 °Brix	Friesland Campina Domo EMEA, Amersfoort (NL)
Hefeextrakt	wasserfrei zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
HEK-Zellen (human embryonal kidney cells)		Institut für angewandte Zellkultur Dr. Toni Lindl GmbH, München
Kaliumhydrogenphosphat	wasserfrei zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	99 % - 100,5 % (iodometrisch)	Merck KGaA, Darmstadt
Lacto-N-hexaose (LNH)		Dextra Laboratories Ltd., Reading (GB)
Lacto-N-neohexaose (LNnH)		Dextra Laboratories Ltd., Reading (GB)
Lactobionsäure	97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Lactose-Monohydrat	≥ 99,5 % (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lactose „Meggletose B“	Nahrungsmittelqualität	Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG, Wasserburg
Lactulose	mind. 99 %	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Lactulose „MLS50“		Milei GmbH, Leutkirch
Lithiumchlorid, anhydrous	mind. 98 %	Fluka AG, Steinheim

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Luciferase-Plasmid pGLD32.4		Promega GmbH, Heidelberg
Magnesiumchlorid- Hexahydrat	p. a. > 99 %	Fluka AG, Steinheim
D-(+)-Melezitose- Monohydrat	≥ 99 % (HPLC) für Mikrobiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	≥ 99,9 % (GC)	Merck KGaA, Darmstadt
5-Methylresorcinol (Orcinol), anhydrous		Molekula Limited, Gillingham (GB)
Natriumacetat	mind. 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge	50 % (w/w)	Fluka AG, Steinheim
Natronlauge (Plätzchen)	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Ninhydrin	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Perjodsäure		Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Phytone	für enzymatische Verdauung	AppliChem GmbH, Darmstadt
PS 023 A <i>Bifidobacterium breve</i> , aus Faeces von Kleinkind (2000), Lagerung bei -80 °C		Stammsammlung vom Institut „Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT)“ des Max Rubner-Instituts Kiel
D-(+)-Raffinose- Pentahydrat	≥ 99 % für Mikrobiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Resorcinol	p. a. mind. 99 % (GC)	Merck KGaA, Darmstadt
Riboflavin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Ringertabletten		Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	37 % - 38 % (acidimetrisch)	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	mind. 97,5 % (acidimetrisch)	Merck KGaA, Darmstadt
Sephadex [®] G-25 (dry bead diameter: 20 µm - 80 µm, bed volumen: 4 ml/g - 6 ml/g)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	99 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tert-Butylalkohol	99 %	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trifluoressigsäure		Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tryphone	pankratisch verdaut für Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween 80	zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
P3-ultrasil 11 (enthält: Natriumhydroxid, Ethylen- diamintetraessigsäure; Natriumcarbonat, Benzol- sulfonsäure, Natriumsalze)		Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf
P3-ultrasil 75 (enthält: Salpetersäure, Phosphorsäure)		Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Vivinal®GOS (Galacto-Oligosaccharid-Mischung, bestehend aus 31,5 % Gal, 2,5 % Glc, 14,8 % Lac, 0,7 % Lactu und 50,5 % Tri- bis Pentasaccharide)		Friesland Campina Domo EMEA, Amersfoort (NL)
Wasser (Reinstwasser)	ASTM Type I max. 0,05 µS/cm	hauseigene Produktion
Zinksulfat-Heptahydrat	zur Analyse	VWR International GmbH, Darmstadt
β-Galactosidasen:		
- Biolactase NTL-conc aus <i>Bacillus circulans</i>	Aktivität: 1500 GTU/unit	Biocon Española S.A., Barcelona (E)
- Lactase EC S aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Aktivität: 87500 ALU/g	Extrakt Chemie Dr. Bruno Stellmach GmbH & Co. KG, Stadthagen
- Lactozym® 3000 L HP-G aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	Aktivität: 3000 LAU/g	Novozymes A/S, Bagsværd (DK)
- Lactozym® Pure 6500 L aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	Aktivität: 6500 LAU/g	Novozymes A/S, Bagsværd (DK)
- HaLactase™ 2100 aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	Aktivität: 2442 NLU/g	Chr. Hansen A/S, Hørsholm (DK)
- Maxilact® LG 5000 aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	Aktivität: 5295 U/g	DSM Nutritional Products GmbH, Heerlen (NL)
- Tolerase® Granulate aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Aktivität: 42700 ALU/g	DSM Nutritional Products GmbH, Heerlen (NL)

3.1.2 Verwendete Materialien

Tab. 3-2: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Anaerobierkontrollstreifen	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
DC-Platten:	
- HPTLC Kieselgel 60 Aluminium (20 x 20 cm)	Merck KGaA, Darmstadt
- HPTLC Kieselgel 60 Glasplatten (10 x 10 cm)	Merck KGaA, Darmstadt
Dichtscheibe SiI / PTFE weiß-blau bzw. rot 1 mm	A-Z Analytikzubehör GmbH, Langen
Eppendorf-Pipetten (diverse Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Tubs (diverse Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Extractclean™ SPE Carbo (mesh size: 120/400, bed weight: 150 mg, tube size: 4 ml)	W. R. Grace and Company, Maryland (USA)
Filter:	
- 595 ½ (diverse Durchmesser)	Whatman GmbH, Dassel
- Rundfilter	Separtis AG, Grellingen (CH)

Materialien	Hersteller
Flachmembran:	
- MPF34, Material: Composite, NMWCO: 200 Da - 300 Da, Fläche: 160 cm ² bzw. 560 cm ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
- MPF36, Material: Composite, NMWCO: 700 Da - 1000 Da, Fläche: 160 cm ² bzw. 560 cm ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
- SR100, Material: TFC [®] Polyamid, NMWCO: ca. 200 Da, Fläche: 160 cm ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
- Minimate TM TFF Capsule, Material: PES, NMWCO: 650 Da, Fläche: 160 cm ²	Pall GmbH, Dreieich
- GE, Material: Composite, NMWCO: 500 Da, Fläche: 160 cm ²	Desalogs Membrane Supplies GmbH, Kempen
- DL, Material: Composite, NMWCO: 150 Da - 300 Da, Fläche: 160 cm ²	Desalogs Membrane Supplies GmbH, Kempen
- Nadir NP 030 P, Material: PES, NMWCO: 500 Da, Fläche: 560 cm ²	Microdyn Nadir GmbH, Bad Hersfeld
- Nano SW, Material: PES, NMWCO: unbekannt, Fläche: 560 cm ²	Hydranautics GmbH, München
- Hydracore 10, Material: PES, NMWCO: 600 Da, Fläche: 560 cm ²	Hydranautics GmbH, München
- Hydracore 50, Material: PES, NMWCO: 550 Da - 1000 Da, Fläche: 560 cm ²	Hydranautics GmbH, München
- Hydracore 70 pHT, Material: PES, NMWCO: 500 Da - 720 Da, Fläche: 560 cm ²	Hydranautics GmbH, München
Gewindeflaschen (1,5 ml), 32 x 11,6 mm, klar, mit Schriftfeld	VWR International GmbH, Darmstadt

Materialien	Hersteller
Isolute [®] SPE Accessoires empty reservoir 10 ml	Separis AG, Grellingen (CH)
Mess- und Vollpipetten (diverse Volumina)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Mikroeinsatz (0,1 ml) (Mikroinsert), Klarglas, 15 mm Spitze	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroliterspritzen (500 µl - 5000 µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (CH)
Mikrotiterplatte aus Quarz mit 96 Kavitäten, incl. Quarzabdeckplatte	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Pipettenspritzen (diverse Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Spiralwickelmodule:	
- HFK-328, Material: Polyethersulfon, NMWCO: 5000 Da, Fläche: 7,1 m ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
- SR50/SR2, Material: TFC, NMWCO: 300 Da - 400 Da, Fläche: 5 m ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
- MPF36, Material: Composite, NMWCO: 1000 Da, Fläche: 3,2 m ²	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
Spritze ohne Kanüle (2 ml)	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Spritzenfilter (4 mm)	Phenex Pharmaceuticals AG, Ludwigshafen
Spritzenfilter Phenex-NY 4 mm	Phenomenex LTD, Aschaffenburg
Sterile Dualfilter-Tips PCR clean (100 µl und 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Petrischalen (Ø 90 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Vakuumkammer (diverse Typen)	Supelco Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
96Well-Platen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Materialien	Hersteller
Zentrifugeneinsätze:	
- Sorvall PN 00382	Sorvall DuPont, Wilmington (USA)
- 425	Sorvall DuPont, Wilmington (USA)
Zentrifugenmembran:	
- Microsep TM Centrifugal Devices 1K, gelb, Reservoir: 3,5 ml, Material: modifiziertes PES, NMWCO: 1000 Da	Pall GmbH, Dreieich
- Microsep TM Centrifugal Devices 10K, blau, Reservoir: 3,5 ml, Material: modifiziertes PES, NMWCO: 10000 Da	Pall GmbH, Dreieich
- Microsep TM Centrifugal Devices 50K, grün, Reservoir: 3,5 ml, Material: modifiziertes PES, NMWCO: 50000 Da	Pall GmbH, Dreieich
- Amicon Ultra 1000 Molecular Weight Cut Off (MWCO), Material: regenerierte Cellulose, NMWCO: 1000 Da	Merck & Co., Inc., Massachusetts (USA)
- Amicon Ultra 500 MWCO, Material: regenerierte Cellulose, NMWCO: 500 Da	Merck & Co., Inc., Massachusetts (USA)
Zentrifugenröhrchen und Zentrifugendeckel	Sorvall DuPont, Wilmington (USA)

3.1.3 Verwendete Geräte

Tab. 3-3: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
ÄKTAcrossflow™	GE Healthcare GmbH, Solingen
Anaerobierarbeitsstation	Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte
Anaerobiertopf 2,5 l	Merck KGaA, Darmstadt
Anaerobiertopf 7,0 l	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Analysenwaagen:	
- BP 221S	Sartorius AG, Göttingen
- BL 1500S	Sartorius AG, Göttingen
- LP34	Sartorius AG, Göttingen
- 440-49N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
- Universal	Sartorius AG, Göttingen
- AE 163	Mettler Toledo GmbH, Greifensee (CH)
- LH 235	Sartorius AG, Göttingen
- AE 240	Mettler Toledo GmbH, Greifensee (CH)
- MC1	Sartorius AG, Göttingen
- Adventurer™ Pro	OHAUS CORPORATION, Parsippany (USA)
- Atilon	Sartorius AG, Göttingen
Chameleon plate reader	Deelux Labortechnik GmbH, Gödenstorf
Gefriertrocknungsanlagen:	
- CiT2	Heraeus Holding GmbH, Hanau
- Alpha I-6	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz

Geräte	Hersteller
Anlage zur Abtrennung von Lactose (Größenausschlusschromatographie):	
- Hitachi L-6200A Intelligent Pump (mit integriertem Gradientenmischer und Injektionsventil)	Merck KGaA, Darmstadt
- Superformance [®] Universal-Glaskartuschen-System Grundeinheit 600-10 (Länge: 600 mm, ID: 10 mm)	Merck KGaA, Darmstadt
- RI Detector ERC-7511 (Brechungsindex-Detektor)	Erma Inc., Tokyo (J)
- Fraktionssammler Foxy	ISK Optics GmbH, Göttingen
- Software: D-7000 Multi HSM Manger	Hitachi Data Systems GmbH, Dreieich-Buchsschlag
ELISA Reader Synergy HT	BioTec-Klute GmbH, Borcheln
Gas-Pack	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
GLC:	
- HP 5890 (series II) gas chromatograph	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
- Säule: fused-silica SPB-5 (3 m x 0,25 mm x 0,25 µm film thickness)	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
- Detektor: FID (Flammenionisationsdetektor)	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
GLC-MS:	
- HP 5890 (series II) gas chromatograph	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
- Säule: fused-silica SPB-5 (3 m x 0,25 mm x 0,25 µm film thickness)	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
- Detektor: FID (Flammenionisationsdetektor)	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
- MS: MS 5989A mass spectrometer mit vacuum gauge controller 59827A	Agilent Technologies, Santa Clara (US)

Geräte	Hersteller
Heiz- und Rührplatten	
- Combimag RCO	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
- Combimag RCT	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
- VMS-C7	VWR International GmbH, Darmstadt
HPAEC-PAD/IT-MS:	
Chromatographie-System (ICS-3000):	
- Gradientenpumpe ICS-3000 SP mit Degasser	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Autosampler ICS-3000 SA (5 °C)	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Detector Compartment ICS-3000	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Elektrochemischer Detektor mit pulsierender amperometrischen Detektion	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Injektionsventil	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Analytische Säule CarboPac PA100 (2 x 250mm, Harzzusammensetzung: pellicular 8,6 µm diameter ethylvinylbenzene / divinyl benzene substrate (cross-linking: 55 %) agglomeriert mit 275 nm MicroBead quaternary ammonium functionalized latex (cross-linking: 6 %)]	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Suppressor ASRS 300 2 mm	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Hilfspumpe ICS-3000 AXP	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
- Software: Chromeleon	Dionex Softron GmbH, Sunnyvale (USA)
MS-System:	
- Ionenfalle-Massenspektroskopie LTQ XL	Thermo Electron GmbH, Waltham (USA)
- Hilfspumpe ICS-5000 AXP	Thermo Electron GmbH, Waltham (USA)

Geräte	Hersteller
(Tief-) Kühlschränke:	
- Premium no frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
- Super Öko	Privileg (Eine Marke der IRE Beteiligungs GmbH), Stuttgart
- Santo	Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH (Markenvertrieb AEG-Electrolux), Nürnberg
- No frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Labor-Separator TYP LWA 205-1	GEA Westfalia Separator Group GmbH, Oelde
Membranfiltrationsanlage	UFI-TEC Institut für Membrantechnologie GmbH, Oranienburg
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co., Wertheim
Milchanwärmer	eigene Herstellung
Minishaker MS1	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
NMR-Spektrometer:	
- Bruker DRX Avance III 700 MHz spectrometer	Bruker Corporation, Billerica(US)
- Frequenz: 700,75 MHz für ¹ H-NMR; 176,2 MHz für ¹³ C-NMR	Bruker Corporation, Billerica(US)
- Bruker software	Bruker Corporation, Billerica(US)
oD-Messgerät Photometer PF – 12	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
pH-Meter:	
- PH540 GLP MultiCal [®]	WTW Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
- pH 330	WTW Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim

Geräte	Hersteller
Photometer LAMBDA 40	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau
Pilot System Modell SW40	MMS Membrane Systems AG, Urdorf (CH)
Tellerzentrifuge Type LWA 205	Westfalia Separator AG, Oelde
Tellerzentrifuge Separator GEA	Westfalia Separator AG, Oelde
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank Kelvitron®t	Heraeus Holding GmbH, Hanau
TurboFect™ (Transfektion)	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Ultrafiltrations-Anlage:	
- Pumpe: LP-1A (CH2A) pump	Amicon GmbH, Schorndorf
- Vorlaufbehälter: RA200	Amicon GmbH, Schorndorf
- Druckmessgerät: EN 837-3	WIKA Alexander Wiegand SE & Co. KG, Klingenberg
- Membran: CTG, 1" HF1.0-43-PM5-PB	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee
Ultraschallbad:	
- Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- Sonorex Super RK 510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuumkonzentrator:	
- Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg
- Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R	Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Wasseranlage Arium®611VF	Sartorius AG, Göttingen

Geräte	Hersteller
Wasserbäder:	
- Büchi HB-140	Büchi Labortechnik GmbH, Essen
- GFL [®] -	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
- RM20	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
- CS/C6	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifugen:	
- Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
- Sorvall RC 28S	Sorvall DuPont, Wilmington (USA)

3.2 Probenübersicht

Tab. 3-4: Milchproben verschiedener Nutztierarten

Milchproben verschiedener Nutztierarten	Bemerkung	Hersteller, Herkunftsland (Herstellerjahr)
Kuhmilch	Rohmilch Morgengemelk	Max Rubner-Institut Versuchsstation Schädtbek Deutschland (2013)
Kuhmilch	Rohmilch Abendgemelk	
Kuhmilch	Rohmilch Gemisch aus Morgen- und Abendgemelk	
Stutenmilch	Rohmilch Sammelmilch von 11 Haflingerstuten 1. Melkzeit (9 Uhr)	Stutenmilchbetrieb Seraphin Seedorf-Berlin Deutschland (2013)
Stutenmilch	Rohmilch Sammelmilch von 11 Haflingerstuten 2. Melkzeit (12 Uhr)	
Stutenmilch	Rohmilch Sammelmilch von 11 Haflingerstuten 3. Melkzeit (15 Uhr)	
Schafsmilch	Rohmilch Abendgemelk Sammelmilch von 25 ostfriesischen Milchschaften	Milchschaftshof Solterbeck GbR Owschlag Deutschland (2013)
Schafsmilch	Rohmilch Morgengemelk Sammelmilch von 25 ostfriesischen Milchschaften	
Schafsmilch	Rohmilch Gemisch aus Morgen- und Abendgemelk Sammelmilch von 25 ostfriesischen Milchschaften	

Milchproben verschiedener Nutztierarten	Bemerkung	Hersteller, Herkunftsland (Herstellerjahr)
Ziegenmilch	Rohmilch Morgengemelk Sammelmilch von 27 weißen deutschen Edelziegen und 8 Toggenburger	Ziegenhof Rehder Boksee
Ziegenmilch	Rohmilch Abendgemelk Sammelmilch von 27 weißen deutschen Edelziegen und 8 Toggenburger	Deutschland (2013)
Kamelmilch	Pasteurisiert	Emirates Industry for Camel Milk & Products
Kamelmilch	Rohmilch	Dubai Vereinigte Arabische Emirate (2011)
Kamelmilch	Pasteurisiert	Emirates Industry for Camel Milk & Products Dubai Vereinigte Arabische Emirate (2012)
Humanmilch	9 Wochen postpartum	Anonyme Spenderin
Humanmilch	11 Wochen postpartum	
Humanmilch	20 Wochen postpartum	
Humanmilch	23 Wochen postpartum	

Tab. 3-5: Proben der Produktströme der milch- und molkeverarbeitenden Industrie

Probe	Bemerkung	Hersteller, Herkunftsland (Herstellerjahr)
Rohmilch	Sammelmilch von Kühen	UTM, Deutschland (09/2011)
Magermilch	Entfettete Rohmilch	UTM, Deutschland (09/2011)
Konz. UF- Permeat	Entfettete, durch Ultrafiltration weitgehend proteinfreie und mittels Umkehrosmose aufkonzentrierte Rohmilch	UTM, Deutschland (09/2011)
Süßmolke	Aus der Herstellung von Schnittkäse	UTM, Deutschland (09/2011)
Sauermolke	Aus der Herstellung von Sauermilchkäse (bei niedrigem pH-Wert)	UTM, Deutschland (09/2011)
Melasse	Flüssiger Rückstand der Lactosekristallisation von mikro- und ultrafiltrierter sowie auf 60 % Lactose aufkonzentrierter und durch Aktivkohle entfärbter Magermilch bzw. Molke	UTM, Deutschland (09/2011)
Fermentat	Mit Hefe versetzte (zur Alkoholgärung) Melasse	UTM, Deutschland (09/2011)
Schlempe	Rückstand der Destillation vom Fermentat	UTM, Deutschland (09/2011)
Lactosefreie Milch	Mit β -Galactosidase behandelte, pasteurisierte Milch	UTM, Deutschland (09/2011)

3.3 Allgemeine Analysenmethoden

3.3.1 Tüpfeltest

Mittels einer Mikroliterspritze wurden 3,0 µl der zu untersuchenden Substanz auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte gegeben und getrocknet. Zur Detektion der proteinhaltigen Analyten wurde die Platte mit einer Ninhydrinlösung (0,3 g Ninhydrin in 95 ml Butanol) bespritzt. Mit Hilfe einer Orcinollösung (0,1 % Orcinol in 20%iger Schwefelsäure) erfolgte die Detektion der Kohlenhydratverbindungen. Nach Besprühen und Trocknen der DC-Platte wurde diese für 10 Minuten im Trockenschrank bei 110 °C entwickelt.

3.3.2 Dünnschichtchromatographie zur Zuckerdetektion

Zur Detektion der Zucker mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurde eine mit dem verwendeten Laufmittel gesättigte Doppeltrogkammer verwendet. Für die Trennung erfolgte das punktförmige Auftragen von 2 µl Probe und 1 µl Standard (Melezitose, 1:1-Mischung aus Glucose und Lactose sowie aus Galactose und Lactulose). Zusätzlich wurden 2 µl GOS90 strichförmig aufgetragen. Nach dem Trocknen der Proben mit dem Heißlufttrockner wurde die DC-Platte in die Doppeltrogkammer gestellt. Sobald die Fließmittelfront eine Höhe von ca. 6 cm erreicht hatte, wurde die Platte erneut getrocknet. Diese Prozedur war noch zweimal zu wiederholen. Als Laufmittel kamen dabei entweder ein Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (70:16:29 v/v/v) oder ein Acetonitril-Wasser-Gemisch (80:20 v/v) in Betracht. Nach wiederholtem Trocknen der DC-Platte wurde diese für 10 min bei 110 °C mit Orcinollösung (0,1 % Orcinol in 20%iger Schwefelsäure) entwickelt.

3.3.3 Enzymatische Lactosebestimmung

Die enzymatische Bestimmung von Lactose erfolgte mit Hilfe des Enzymkits für Lactose und D-Galactose. Es wurden 0,25 ml Probelösung in einen 25 ml-Kolben pipettiert. Danach wurde der Kolben zu $\frac{2}{3}$ mit Wasser gefüllt. Anschließend wurden 1,25 ml Carrez-I-Lösung (3,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II) in 100 ml Wasser) sowie 1,25 ml Carrez-II-Lösung (7,2 g Zinksulfat in 100 ml Wasser) hinzugegeben und durchmischt. Nach der pH-Wert-Einstellung von 7 bis 8,5 wurde der Kolben bis zum Eichstrich mit Wasser aufgefüllt und die Lösung anschließend filtriert. Die Probe wurde nach weiterer Verdünnung gemäß dem

Pipettierschema der Firma Enzymtec™ (siehe Tab. 6-5 im Anhang) analysiert. Die photometrische Messung erfolgte gegen Luft bei 430 nm. Die Formel für die Berechnung des Lactosegehalts ist im Anhang (siehe 6.2.1.2) dargestellt.

3.4 Photometrische Testsysteme

3.4.1 Resorcinol-Schwefelsäure-Test zur photometrischen Bestimmung der neutralen Zucker

Mit Hilfe eines photometrischen Schnelltests konnten die neutralen Zucker in der Probelösung bestimmt werden. In Anlehnung an Monsigny et al. [1988] wurden 40 µl der Probelösung in eine Glas-Mikrotiterplatte pipettiert und 40 µl Resorcinlösung (6 mg/ml) hinzugefügt. Anschließend wurden 200 µl 75%ige Schwefelsäure hinzugefügt und durchmischt. Im Trockenschrank (90 °C) erfolgte die gewünschte Farbreaktion innerhalb von 30 Minuten. Danach wurde die Mikrotiterplatte weitere 30 Minuten lang im Dunkeln auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Messung der Extinktion erfolgte gegen Luft bei 430 nm mittels ELISA-Reader. Zur Kalibrierung wurde Lactose in einem Bereich von 1 nmol bis 100 nmol verwendet. Die Formel zur Berechnung des Gehaltes an neutralen Zuckern befindet sich im Anhang (siehe 6.2.2.1).

3.4.2 Photometrische Tests zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Zur Abtrennung des Überschusses an Lactose erfolgte die Aufreinigung der sialinsäurehaltigen Zucker (v. a. saure Zucker) mit Hilfe eines Anionenaustauschers nach Svennerholm [1958] und Salcedo et al. [2011]. Dazu wurden Säulen mit 2 g in Wasser gequollenem Dowex-Material gepackt und in deren Formiat-Form mittels 1 N Ameisensäure überführt. Zur Konditionierung wurde der Ionenaustauscher mit 20 ml 1 N Ameisensäure gewaschen. Nach der Aufgabe von 3 ml Probe erfolgte die Eluation der Mono- und Disaccharide mit 20 ml Wasser. Die Eluation der sialinsäurehaltigen Zucker erfolgte mit 20 ml 0,1 N Ameisensäure. Im Vakuumkonzentrator wurden 4 ml des sauren Eluates bis zur Trockne eingengt und in 0,3 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung konnte für die anschließenden photometrischen Tests (siehe Kapitel 3.4.2.2 und 3.4.2.3) eingesetzt werden.

Zur Regeneration wurde der Ionenaustauscher mit 6 ml 50%igem Methanol-Wasser-Gemisch, 6 ml Wasser und 6 ml 1 N Ameisensäure behandelt.

3.4.2.2 Perjodat-Resorcinol-Test zur photometrischen Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker

In Anlehnung an Jourdian et al. [1971] wurden die sialinsäurehaltigen Zucker mit Hilfe eines photometrischen Schnelltests bestimmt. Für den photometrischen Test wurden im Eisbad 250 µl aufgereinigte Probe mit 50 µl Perjodat-Lösung versetzt. Die Perjodat-Lösung bestand aus 0,9116 g Perjodsäure, 40 ml Wasser, 60 ml 28%ige Salzsäure und 6,2 mg Kupfersulfat-Pentahydrat. Nach kurzem Durchmischen verblieb das Reaktionsgemisch für 20 Minuten im Eisbad. Danach wurden 625 µl gekühlte Resorcinol-Lösung (0,6 g Resorcinol + 40 ml Wasser + 60 ml 28%ige Salzsäure + 6,2 mg Kupfersulfat-Pentahydrat) hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln und weiteren 5 Minuten im Eisbad, wurde die Probe für 15 Minuten auf 100 °C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser wurde der Probe 625 µl tert-Butylalkohol zugesetzt und gut durchgemischt. Das Gemisch wurde für 3 Minuten im Thermoshaker bei 37 °C geschüttelt. Die Messung der Absorption erfolgte mittels Photometer gegen Luft bei 630 nm. Sialinsäure wurde im Konzentrationsbereich von 7 mg/l bis 125 mg/l zur Kalibrierung genutzt. Die Berechnungsformel für den Gehalt an sauren Zuckern ist im Anhang (siehe 6.2.2.2) dargestellt.

3.4.2.3 Resorcinol-Salzsäure-Test zur photometrischen Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker

Nach Svennerholm [1957] erfolgte die photometrische Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker mit Hilfe des Resorcinol-Salzsäure-Tests. Es wurden 0,5 ml Probe mit 0,5 ml Resorcinol-Lösung versetzt und im kochenden Wasserbad für 15 Minuten erhitzt. Die Resorcinol-Lösung bestand aus 0,2 g Resorcinol, 20 ml Wasser, 80 ml Salzsäure und 2 g Kupfersulfat-Pentahydrat. Nachdem die Probe unter fließendem Wasser abgekühlt wurde, erfolgte die Zugabe von 1,25 ml tert-Butylalkohol. Nach starkem Schütteln wurde die Probe für 15 Minuten im Eisbad unter Lichtausschluss gelagert. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm gegen Luft. Zur Kalibrierung wurde Sialinsäure im Bereich von 7,5 mg/l bis 15 mg/l genutzt. Die Formel zur Berechnung des Gehaltes an sauren Zuckern ist im Anhang (siehe 6.2.2.3) dargestellt.

3.5 Identifizierung und Quantifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS

3.5.1 Probenaufarbeitung

3.5.1.1 Fettabtrennung

In Anlehnung an Martinez-Ferez et al. [2006] wurde das Milchfett durch Zentrifugation in der Kälte abgetrennt. Es wurden 5 ml Milch in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 4 °C sowie 6500 RZB (relative Zentrifugenbeschleunigung) für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiterverarbeitet.

3.5.1.2 Proteinabtrennung

3.5.1.2.1 Proteinfällung mit Ethanol

Die Fällung der Milchproteine mit Ethanol erfolgte in Anlehnung an Martinez-Ferez et al. [2006]. Dazu wurden 3 ml entfetteter Überstand mit 6 ml Ethanol versetzt und für 20 Minuten gerührt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und der Niederschlag anschließend mittels Zentrifugation (4 °C, 6500 RZB, 25 min) abgetrennt. Zur Entfernung des vorhandenen Ethanols wurde das Zentrifugat im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Probe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -18 °C gelagert.

3.5.1.2.2 Proteinfällung mit einem Chloroform-Ethanol-Gemisch

Die Fällung der Proteine mit Hilfe eines Chloroform-Ethanol-Gemisches erfolgte nach Tao et al. [2008] und Nakamura et al. [2003]. Es wurden 0,75 ml entfettete Milch mit 3 ml Chloroform-Ethanol-Lösung (2:1 v/v) versetzt, gut geschüttelt und bei 4000 RZB für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 0,75 ml Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -18 °C gelagert.

3.5.1.2.3 *Proteinfällung mit Säure*

Es wurden analog zu Marino et al. [2011] zu 20 ml entfetteter Milch 1 M Salzsäure gegeben bis ein pH-Wert von 4,6 erreicht war, um die Proteine mittels Säure auszufällen. Nach dem Erhitzen der Lösung (35 °C für 30 Minuten) erfolgte die Zentrifugation bei 25 °C und 3850 RZB für 30 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und mittels 4 M Natronlauge neutralisiert. Anschließend erfolgte die Filtration von 2 ml Probe durch eine 10 kDa-Membran (7500 RZB, 4 °C, 60 Minuten). Das Zentrifugat wurde bei -18 °C gelagert.

3.5.1.2.4 *Proteinabtrennung durch Membranfiltration im Labormaßstab*

In Anlehnung an Marino et al. [2011] und Thurl et al. [1997] wurde der Überstand von der Fettabtrennung direkt auf eine Zentrifugenmembran (PES, NMWCO 5 kDa bzw. 10 kDa) gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 6500 RZB und 4 °C bis der Großteil der Flüssigkeit ins Zentrifugat übergegangen war. Das Filtrat wurde bis zur weiteren Aufreinigung bei -18 °C gelagert.

3.5.1.2.5 *Proteinabtrennung durch eine Technikum-Ultrafiltrationsanlage*

Um Proteine mit Hilfe der Ultrafiltration abzutrennen, wurde die Magermilch auf 50 °C erwärmt. Die Ultrafiltrationsanlage wurde mit der erwärmten Magermilch befüllt und 10 Minuten im Kreislauf-Modus betrieben. Danach erfolgte die Abtrennung des Magermilchpermeats über eine 5 kDa-Membran bei 50 °C. Das entstandene Permeat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -18 °C gelagert.

3.5.1.3 *Lactoseabtrennung*

3.5.1.3.1 *Größenausschlusschromatographie mit Sephadex® G25 zur Lactoseabtrennung*

Die entfettete und weitgehend proteinfreie Probe wurde analog zu Kunz et al. [1996] und Martinez-Ferez et al. [2006] mittels Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt. Dieser Vorgang diente zur Abtrennung der im Überschuss vorhandenen Lactose. Dazu wurden 500 µl der Probe in das System (siehe Tab. 3-3) injiziert und mit 0,25 ml/min bzw. 1,5 ml/min (180min- bzw. 30min-Lauf) Wasser eluiert. Nach der erfolgreichen RI-Detektion wurden Fraktionen von jeweils 5 Minuten bzw. 0,7 Minuten gesammelt. Mit Hilfe von

Tüpfeltests (siehe Kapitel 3.3.1) wurden die kohlenhydratreichen Fraktionen bestimmt und anschließend mittels Zucker-DC (siehe Kapitel 3.3.2) näher charakterisiert. Zur analytischen Quantifizierung erfolgte die Vereinigung einzelner Fraktionen nach den Ergebnissen der Zucker-DC. Nachdem die Proben mittels Gefriertrocknung bzw. Vakuumkonzentrator eingengt wurden, erfolgte die Analyse mittels HPAEC-PAD (siehe Kapitel 3.5.2).

3.5.1.3.2 Größenausschlusschromatographie mit BioGel® zur Lactoseabtrennung

Analog zur Größenausschlusschromatographie mit Sephadex®G25 erfolgte die Abtrennung der Lactose mit BioGel®. Der Vorgang erfolgte nach Hernández et al. [2009], Leo et al. [2009] und Martínez-Villaluenga et al. [2008]. Dabei wurden 500 µl Probe auf die BioGel®-Säule (siehe Tab. 3-3) gegeben und mit 0,1 ml/min Wasser eluiert. Fraktionen von je 10 ml Eluat wurden gesammelt. Nach Analyse der Fraktionen mittels Tüpfeltest (siehe Kapitel 3.3.1) und Zucker-DC (siehe Kapitel 3.3.2) erfolgte die Vereinigung der Fraktionen. Anschließend wurden die Proben mit HPAEC-PAD (siehe Kapitel 3.5.2) näher charakterisiert.

3.5.1.3.3 Festphasenextraktion an Aktivkohle zur Lactoseabtrennung

In Anlehnung an Packer et al. [1998] und Redmond and Packer [1999] wurde die überschüssige Lactose mit Hilfe einer Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE: graphitized carbon cartridge solid phase extraction) abgetrennt. Die SPE-Säule wurde mit 3 ml Wasser, 3 ml Acetonitril-TFA-Gemisch (80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA) und 3 ml Wasser konditioniert. Nachdem 100 µl Probe auf die Säule gegeben wurden, erfolgte die Elution mit 4 ml Wasser, 4 ml 2%igem Acetonitril, 4 ml 4%igem Acetonitril, 4 ml 20%igem Acetonitril und 4 ml 40%igem Acetonitril mit 0,1 % TFA. Die so erhaltenen Fraktionen wurden im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in 50 µl Wasser aufgenommen. Die letzten beiden Fraktionen wurden vereinigt und nach entsprechender Verdünnung mittels HPAEC (siehe Kapitel 3.5.2) analysiert.

3.5.2 Detektion der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS

Die Quantifizierung der aufgearbeiteten OS-Proben erfolgte nach Kunz et al. [1996] und Bruggink et al. [2005]. Zur Anwendung kam hierbei eine hochauflösende

Anionenaustauscherchromatographie mit pulsierender amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Massenspektroskopie mit Hilfe einer Ionenfalle (IT-MS) wie schon im Kapitel 2.4.2.1 näher erläutert wurde. Im Nachfolgenden sind die verwendeten Parameter (siehe Tab. 3-6 und Tab. 3-7) sowie der Gradient zur Trennung der OS aufgeführt (Tab. 3-8).

Tab. 3-6: Verwendete Parameter für das HPAEC-System

HPAEC-System																			
Hersteller der Anlage	Dionex																		
Säule	CarboPac PA100																		
Fließmittel	A = 10 mM Natriumhydroxid B = 100 mM Natriumhydroxid C = 100 mM Natriumhydroxid + 1000 mM Natriumacetat D = 100 mM Natriumhydroxid + 50 mM Natriumacetat																		
Säulentemperatur	Raumtemperatur																		
Injektionsvolumen	20 µl																		
Flussrate	0,2 ml/min																		
Detektor	Elektrochemischer Detektor (ED) mit Gold-Arbeitselektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode																		
Pulsation des ED	<table border="1" style="border-style: dashed; border-collapse: collapse; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Zeit [sec]</th> <th style="text-align: center;">Spannung [V]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0,1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,2</td> <td style="text-align: center;">0,1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,4</td> <td style="text-align: center;">0,1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,41</td> <td style="text-align: center;">-2,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,42</td> <td style="text-align: center;">-2,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,43</td> <td style="text-align: center;">0,6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,44</td> <td style="text-align: center;">-0,1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,5</td> <td style="text-align: center;">-0,1</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [sec]	Spannung [V]	0	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,41	-2,0	0,42	-2,0	0,43	0,6	0,44	-0,1	0,5	-0,1
Zeit [sec]	Spannung [V]																		
0	0,1																		
0,2	0,1																		
0,4	0,1																		
0,41	-2,0																		
0,42	-2,0																		
0,43	0,6																		
0,44	-0,1																		
0,5	-0,1																		
Software	Chromleon (Version: 6.80 SR9 Build2673)																		

Tab. 3-7: Verwendete Parameter für das LC/MS-System

LC/MS-System	
Hersteller der Anlage	Thermo
Ionisationsflüssigkeit	LiCl (0,5 mmol/l)
Flussrate LiCl	0,03 ml/min
Ionisation	Elektrospray-Ionisation
Massenanalysator	Quadrupol
Messmodus	Positiver Modus
Tuning	Lactose
Anzahl der Scan Events	3
Scan Event 1	Messgeschwindigkeit: enhanced
	Spray voltage: 4,0 kV
	Sheath gas: 36 arb
	Auxiliary gas: 10 arb
	Sweep gas: 0 arb
	Temperatur der Ionentransferkapillare: 400 °C
	m/z-Range: 150 bis 2000

Scan Event 2	Zoom der intensivsten Ionen von Scan Event 1
	Aktivierungstyp: CID (collision-induced dissociation)
	Min. signal required: 500,0 uAU
	Isolation width: 2,00 s
	Normalized collision energy: 35,0 eV
	Default charge state: 2
	Activation Q: 0.25
	Activation time: 30,00 ms
	Wiederholungen: 3
Scan Event 3	MS/MS der intensivsten Ionen von Scan Event 2
	Aktivierungstyp: CID (collision-induced dissociation)
	Min. signal required: 500,0 uAU
	Isolation width: 2,00 s
	Normalized collision energy: 35,0 eV
	Default charge state: 2
	Activation Q: 0.25
	Activation time: 30,00 ms
	Wiederholungen: 3
Software	Xcalibur (Version: 2.0.7 SP1)

Tab. 3-8: Trennprogramm zur Bestimmung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
Injektion bei Minute 0				
0 - 10	95	0	0	5
10 - 15	95	0	0	5
15 - 20	90	0	0	10
20	0	80	0	20
20 - 50	0	99	1	0
50 - 60	0	75	25	0
60	0	75	25	0
60 - 75	95	0	0	5
75	95	0	0	5

Zur Quantifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD wurden Kalibriergeraden der jeweiligen Oligosaccharide angefertigt. Als externe Standards wurden Kalibriergeraden von Glucose, Galactose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose mitgeführt. Diese Standardsubstanzen wurden zu Beginn und zum Ende jeder Sequenz analysiert. Falls keine entsprechenden Standards zur Quantifizierung vorhanden war, wurde über Lactose quantifiziert oder eine speziell definierte Auswertung vorgenommen.

3.6 Enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β -Galactosidasen

3.6.1 Herstellung von lactosereichem Ultrafiltrations-Magermilchpermeat

Die Versuche erfolgten in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Peter Chr. Lorenzen (Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts Kiel). Frische, rohe Sammelmilch vom Versuchsgut Schädtebek des Max Rubner-Instituts wurde zur Fettabtrennung auf 45 °C erwärmt und mit Hilfe einer Tellerzentrifuge in Rahm

und Magermilch separiert. Zur Abtrennung der Proteine wurde die Ultrafiltrationsanlage mit 50 °C warmer Magermilch befüllt und 10 Minuten unter Permeat-Rückfluss betrieben. Die Ultrafiltration (UF) erfolgte über einer 5 kDa-Membran bei 50 °C. Das entstandene Ultrafiltration-Magermilchpermeat (UF-Magermilchpermeat), das einen Lactosegehalt von circa 5 % aufwies, wurde abgenommen und mit Lactose auf einen Gesamtkohlenhydratgehalt von 40 % aufgezuckert. Die zugeführte Lactose wurde im Wasserbad bei circa 70 °C gelöst und der gewünschte pH-Wert bei 40 °C eingestellt. Das lactosereiche UF-Magermilchpermeat wurde über Nacht bei 20 °C gelagert und konnte anschließend zur weiteren enzymatischen Reaktion eingesetzt werden.

3.6.2 Enzymatische Reaktion mit β -Galactosidase

Die über Nacht auskristallisierte Lactose des lactosereichen UF-Magermilchpermeats wurde am Versuchstag bei 70 °C wieder in Lösung gebracht und auf die gewünschte Reaktionstemperatur abgekühlt. Nach dem Abnehmen einer Ausgangsprobe wurde die berechnete Menge Enzym hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 Stunden inkubiert. Dabei erfolgte eine stündliche Probennahme. Das Enzym wurde durch eine Hitzebehandlung bei 85 °C für 3 min inaktiviert. Nach Carrezfällung (siehe Kapitel 3.3.2) konnte die Probe direkt für weitere Analysemethoden wie HPAEC-PAD/IT-MS (siehe Kapitel 3.5.2) oder der enzymatische Lactosebestimmung (siehe Kapitel 3.3.3) eingesetzt werden. Die Berechnungsgrundlage zur Ermittlung des GOS-Gehalts, der GOS-Ausbeute und der Lactosehydrolyse in Anlehnung an Gosling et al. [2011] und Roberts and Pettinati [1957] ist im Anhang (siehe 6.2.3) dargestellt.

3.7 Aufreinigung von Oligosacchariden

3.7.1 Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration

3.7.1.1 Vorversuche zur Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben im Dead-End-Modus

Die entfettete und weitgehend proteinfreie Probe (siehe Kapitel 3.5.1.1 und 3.5.1.2) wurde auf verschiedene Zentrifugenmembranen (siehe Tab. 3-9) gegeben und mit der maximal zulässigen Umdrehungszahl bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und zusammen mit dem Eluat im Vakuumsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte die

analytische Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.5.1.3) der lactosereichen Proben und die Analyse mittels HPAEC-PAD (siehe Kapitel 3.5.2).

Tab. 3-9: Verwendete Membranen für die Vorversuche zur Nanofiltration

Name der Membran	Cut-off [Da]	Material	Hersteller	Verwendete RZB
Microsep™ Centrifugal Devices 1K	1000	modifiziertes PES	Pall GmbH, Dreieich	6500 G
Amicon Ultra 1000 MWCO	1000	regenerierte Cellulose	Merck & Co., Inc., Massachusetts (USA)	4000 G
Amicon Ultra 500 MWCO	500	regenerierte Cellulose	Merck & Co., Inc., Massachusetts (USA)	2000 G

In einem weiteren Vorversuch wurden in Anlehnung an Sarney et al. [2000] 3 ml der entfetteten und weitgehend proteinfreien Probe auf die Membran „Microsep™ Centrifugal Devices 1K“ gegeben und mehreren Waschschritten unterzogen. Dabei wurde der Überstand durch Zentrifugation bei 6500 RZB bis auf ca. 0,5 ml reduziert und anschließend mit 2,5 ml Wasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Auffüllen mit Wasser erfolgte die vollständige Zentrifugation der Flüssigkeit. Der Überstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und ebenso wie das Eluat im Vakuumsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen. Nach eventuell notwendiger analytischer Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.5.1.3) der lactosereichen Proben erfolgte die Analyse mittels HPAEC-PAD (siehe Kapitel 3.5.2).

3.7.1.2 Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™

3.7.1.2.1 Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™

Für die Versuche im Labormaßstab wurde die Nanofiltrationsanlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare GmbH (siehe Abb. 3-1) verwendet. Die technischen Daten der Anlage sind im Anhang (siehe Tab. 6-6) zu finden. Bei der Anlage wurde die zu filtrierende Flüssigkeit in

Tab. 3-10: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche mit der Anlage ÄKTAcrossflow™ mit GOS-haltigen Proben im Labormaßstab

Name der Membran	Cut-off [Da]	Material	Hersteller	Fläche [cm ²]	Maximal verwendeter TMP [bar]
MPF34	200 - 300	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	160	4,0 - 4,5
MPF36	700 - 1000	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	160	3,0
SR100	ca. 200	TFC [®] polyamide	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	160	4,0
GE	500 - 1000	Composite	Desalogics Membrane Supplies GmbH, Kempen	160	4,0

Als Ausgangsmaterial für die Nanofiltrationsversuche im Labormaßstab mittels ÄKTAcrossflow™ wurde eine 5%ige Zuckerlösung (Vivinal[®]GOS sowie enzymatisch synthetisierte, GOS-haltige Proben) verwendet. Die Experimente wurden bei 40 °C, 200 ml/min FeedFlow und bei dem in Tab. 3-10 angegebenen TMP durchgeführt. Nach dem Spülen der Anlage mit Wasser und Probe wurde das Vorlaufgefäß der ÄKTAcrossflow™-Anlage mit 103 ml Probe gefüllt. Die Probe wurde für fünf Minuten im Retentatkreislauf gepumpt. Danach wurden 3 ml Probe zur Bestimmung der Ausgangsgehalte entnommen. Die Nanofiltration erfolgte anschließend durch Diafiltration der Probe mit einem Washfaktor von ca. 30. Das Permeat wurde literweise aufgefangen und zur Analyse zurückgestellt. Zum Ende der Nanofiltration wurde die Anlage möglichst vollständig leer gepumpt und die Flüssigkeit auf der Retentatseite als Probe (NF-Retentat) zur weiteren Analyse aufbewahrt. Anschließend wurden 100 ml Wasser in das Vorlaufgefäß gegeben. Nachdem das Retentat für 10 Minuten im Kreislauf gepumpt wurde, erfolgte erneut das Leerpumpen der Anlage und das damit verbundene Auffangen der Probe (Recovery-Probe). Die so erhaltenen Proben wurden nach Carrez-Fällung (siehe Kapitel 3.3.3) mittels HPAEC-PAD/IT-MS (siehe Kapitel 3.5.2) untersucht. Die Reinigung der Membran und der Anlage erfolgte mit 0,8 % P3-ultrasil 11 (Lauge), Wasser und 0,5 % P3-ultrasil 75 (Säure).

3.7.1.2.2 Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™

Für diese Versuche wurde die im Kapitel 3.7.1.2.1 beschriebene Anlage ÄKTAcrossflow™ sowie die in Tab. 3-11 dargestellten Membranen verwendet.

Tab. 3-11: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche mit der Anlage ÄKTAcrossflow™ mit MOS-haltigen Milchproben im Labormaßstab

Name der Membran	Cut-off [Da]	Material	Hersteller	Fläche [cm ²]
MPF36	700 - 1000	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	160
SR100	ca. 200	TFC [®] polyamide	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	160
DL	150 - 300	Composite	Desalogics Membrane Supplies GmbH, Kempen	160
GE	500 - 1000	Composite	Desalogics Membrane Supplies GmbH, Kempen	160

Als Ausgangsmaterial wurde UF-Magermilchpermeat (siehe Kapitel 3.6.1) mit einem Lactosegehalt von circa 5 % verwendet. Die Versuche wurden bei 40 °C, 200 ml/min FeedFlow und einem TMP von 4 bar durchgeführt. Nach dem Spülen der Anlage mit Wasser und Probe erfolgte das Füllen des Vorlaufgefäßes mit 200 ml Probe. Die Probe wurde für 30 Minuten im Kreislauf gepumpt und 10 ml entnommen. Die Nanofiltration der Probe erfolgte in zwei Prozessschritten. Zunächst erfolgte eine Aufkonzentrierung um den Faktor zwei. Anschließend erfolgte die Diafiltrierung um ca. den Faktor 15. Während der beiden Prozessschritte wurden Proben des Permeats entnommen. Nach Beenden der Nanofiltration erfolgte die weitere Probennahme sowie Reinigung der Anlage (siehe Kapitel 3.7.1.2.1). Die Proben wurden sowohl mit Hilfe des Perjodat-Resorcinol-Testes photometrisch als auch nach eventuell notwendiger SPE-Aufarbeitung (je nach Rest-Lactosegehalt) mittels HPAEC-

PAD/IT-MS untersucht. Die Bestimmung der Monosaccharide bzw. Lactose erfolgte enzymatisch oder mittels HPAEC-PAD.

3.7.1.3 Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Technikumsmaßstab mit der Anlage Pilot System Modell SW40

Die Versuche wurden in Kooperation mit der Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG (UTM, vertreten durch Herrn Dipl.-Ing. Sebastian Kämpfer) durchgeführt. Bei der Anlage Pilot System Modell SW40 von MMS Membrane Systems handelt es sich um eine Sonderanfertigung, die im Litermaßstab betrieben wird. Das Prinzip der Nanofiltration ist identisch zur ÄKTAcrossflow™-Anlage. Der Unterschied besteht darin, dass mit dieser Anlage höhere Drücke und Überströmgeschwindigkeiten erzielt werden können. Optimalerweise wurden Drücke zwischen 15 bar und 30 bar sowie ein FeedFlow (Volumenstrom) von 500 l/h (entspricht circa dem 40fachen im Vergleich zur ÄKTAcrossflow™) genutzt. Außerdem ist eine Erhöhung der Membranfläche um den Faktor 3,5 auf 560 cm² möglich. Die verwendeten Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 3-12: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche von MOS-haltigen Proben mit der Anlage Pilot System Modell SW40 von MMS Membrane Systems

Name der Membran	Cut-off [Da]	Material	Hersteller	Fläche [cm ²]
Nadir NP 030 P	500	PES	Microdyn Nadir GmbH, Bad Hersfeld	560
GE	500	Composite	Desalogics Membrane Supplies GmbH, Kempen	560
Nano SW		PES	Hydranautics GmbH, München	560
Hydracore 10	600	PES	Hydranautics GmbH, München	560
Hydracore 50	550 - 1000	PES	Hydranautics GmbH, München	560
Hydracore 70 pHT	500 - 720	PES	Hydranautics GmbH, München	560
MPF34	200 - 300	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	560
MPF36	700 - 1000	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	560

Als Ausgangsmaterial wurde molkereitypisches konzentriertes Molken-Permeat verwendet. Zur Herstellung dieses Permeats wurde Molke aus der Käseherstellung erhitzt, Proteine mittels Ultrafiltration abgetrennt und die Trockenmasse mit Hilfe einer Umkehrosiose auf circa 20 % erhöht. Das konzentrierte Molken-Permeat wurde in den Vorlaufbehälter der Anlage gefüllt und um den Faktor 1,5 mit Wasser verdünnt, so dass ein Brixgehalt von ca. 13 °Brix erreicht wurde. Nach dem Spülen der Anlage mit der Probe-Lösung wurde eine Ausgangsprobe gezogen und für spätere Analysen zurückgestellt. Anschließend erfolgte die Nanofiltration ohne Diafiltration wegen mangelnder großtechnischen Umsetzbarkeit. Nach Variation verschiedener Nanofiltrationsparameter wie Druck, Überströmgeschwindigkeit und Temperatur wurden jeweils Proben der Permeate entnommen. Auf Grund der nicht zugänglichen Proben vom Retentat wurde mit Hilfe einer Differenzrechnung zwischen Ausgangsprobe und Permeatprobe die Analysenwerte für das Retentat ermittelt. Die Analyse der Proben erfolgte dabei mit dem photometrischen Schnelltest für saure Zucker

(Perjodat-Resorcinol-Test), der enzymatische Bestimmung von Galactose und Lactose sowie nach SPE-Aufreinigung die Messung mittels HPAEC-PAD/IT-MS.

3.7.1.4 Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im großtechnischem Maßstab mit der Anlage Membranfiltrationsanlage

Die Versuche wurden von Herrn Dr. Wolfgang Hoffmann und Herrn Norbert Johannsen (Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts Kiel) durchgeführt. Das Prinzip der Membranfiltrationsanlage von UFI-TEC Institut für Membrantechnologie GmbH ist analog zur Anlage ÄKTAcrossflow™. Die Filtration findet jedoch in einem deutlich größeren Maßstab statt. Anstelle von Flachmembranen werden je zwei Spiralwickelmodule (siehe Tab. 3-13) mit insgesamt 3,2 m² bzw. 5 m² Austauschfläche genutzt.

Tab. 3-13: Verwendete Membranen für die Nanofiltrationsversuche von MOS-haltigen Proben mit der Membranfiltrationsanlage von UFI-TEC Institut für Membrantechnologie GmbH

Name der Membran	Cut-off [Da]	Material	Hersteller	Fläche [m ²]
MPF36	1000	Composite	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	3,2
SR50/SR2	300 - 400	TFC	Koch Membranen GmbH, Rimsting/Chiemsee	5,0

Als Ausgangsmaterial wurde UF-Magermilchpermeat (Herstellung im großtechnischen Bereich analog zu Kapitel 3.6.1 mit dem Spiralwickelmodul HFK-328) verwendet. Die Hydrolyse der Lactose im UF-Magermilchpermeat erfolgte mit β -Galactosidase. Dazu wurden 140 g der β -Galactosidase HaLactase auf 40 kg UF-Permeat eingesetzt. Zur Enzyminaktivierung wurde die Lösung pasteurisiert (73,5 °C für mind. 20 sec). Die Nanofiltrationsversuche erfolgten bei ca. 40 °C und Drücken von 10 bar oder 20 bar. Nach Spülen der Anlage wurden 40 kg des pasteurisierten, nahezu lactosefreien UF-Magermilchpermeats in den Vorlaufbehälter überführt und für zehn Minuten im Kreislauf

gefahren. Anschließend erfolgte die kontinuierliche Permeatabnahme, wobei die aus dem Kreislauf abgezogene Menge ebenso kontinuierlich durch 40 °C warmes entionisiertes Wasser ersetzt wurde. Dazu wurden insgesamt ca. 240 l Wasser eingesetzt. Dies entsprach einem Waschkfaktor von 7. Nach der Diafiltration wurde das Retentat auf ca. 8 kg aufkonzentriert. Dabei wurden Proben der Ausgangslösung (pasteurisiertes, nahezu lactosefreies Magermilch-UF-Permeat), des NF-Permeats und des NF-Retentats genommen. Die Analyse umfasste den photometrischen Schnelltest für saure Zucker (Perjodat-Resorcinol-Test), die enzymatische Bestimmung von Galactose und Lactose sowie nach eventuell benötigter SPE-Aufreinigung (je nach Rest-Lactosegehalt) die Messung mittels HPAEC-PAD/IT-MS. Außerdem wurde in der Fachgruppe von Herrn Dr. Hoffmann die Trockenmasse bei 102 °C, der Gesamt-Stickstoffgehalt, der Nicht-Protein-Stickstoff (NPN), der Aschegehalt und der Calciumgehalt gemäß Methodenbuch Bd. VI (VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 2003) jeweils dreifach bestimmt.

Die Formel zur Ausbeute-Berechnung nach Oliveira et al. [2012], Goulas et al. [2002] und Pruksasri [2007] für ein Batch-Verfahren ist im Anhang (siehe 6.2.4.1) dargestellt.

3.7.2 Aufreinigung der Oligosaccharide durch präparative Chromatographie an Aktivkohle

Zur Abtrennung der Lactose von den Oligosacchariden wurde eine präparative Chromatographie an Aktivkohle verwendet. Dazu wurde die Anlage benutzt, die bereits zur Größenausschlusschromatographie mit Sephadex[®]G25 (siehe Kapitel 3.5.1.3.1) Anwendung fand. Die Probe wurde auf einen Gesamtzuckergehalt von max. 20 % verdünnt. Davon wurden 5 ml in das Chromatographie-System injiziert. Mit Hilfe des in Tab. 3-14 aufgeführten Gradientenprogramms (Eluent A: Wasser, Eluent B: Ethanol, Eluent C: 50 % Ethanol mit 2,5 % Ameisensäure) erfolgte die chromatographische Trennung der Probe.

Tab. 3-14: Trennprogramm für die Aufreinigung von GOS mit Hilfe einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (Eluent A: Wasser, Eluent B: Ethanol, Eluent C: 50 % Ethanol mit 2,5 % HCOOH)

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Fluss [ml/min]
Injektion bei Minute 0				
0 - 30	95	5	0	1,0
30 - 60	50	50	0	1,0
60	0	0	100	0,75
60 - 90	0	0	100	0,75

Nach RI-Detektion wurden Fraktionen von jeweils 5 Minuten gesammelt und diese mittels Zucker-DC (siehe Kapitel 3.3.2) untersucht. Anschließend erfolgte die Vereinigung chemisch ähnlicher Fraktionen. Der durch das Laufmittel vorhandene Ethanol wurde durch einen Vakuumsrotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser aufgenommen, wobei zum Lösen des Analyten Ultraschall und gegebenenfalls erhöhte Temperaturen (40 °C) Anwendung fand. Die so erhaltene Lösung wurde im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt und in 5 ml Wasser aufgenommen. Die genauere Charakterisierung und Quantifizierung der Proben erfolgte mittels HPAEC-PAD/IT-MS (siehe Kapitel 3.5.2).

3.8 Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung

Zur Prüfung der bifidogenen Wirkung einzelner Analyten wurden 5%ige Zuckerlösungen als Testmaterial verwendet. Die Versuche wurden von Herrn Nils Rösch in der Fachgruppe von Herrn Prof. Dr. Knut Heller (Institut „Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT)“ des Max Rubner-Instituts Kiel) durchgeführt.

Zunächst wurden die gewünschten Kulturen drei bis vier Tage wachsen gelassen. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in 10 ml TPY-Bouillon (TPY: Trypton). Dazu wurden 10 ml TPY-Bouillon für 15 Minuten gekocht, schnell abgekühlt und dann mit 0,1 ml der gewachsenen Kultur beimpft. Im Anaerobiertopf erfolgte die Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden Subkulturen angelegt, die für weitere 24 Stunden inkubiert wurden. Diese Kulturen wurden als Inokulum für die weiteren Versuche genutzt.

Für die bifidogenen Tests wurden 0,25 ml der 5%igen Zuckerlösung zu 4,75 ml 3:4-TPY-Bouillon gegeben. Anschließend wurden 0,05 ml der gewachsenen Kultur (Inokulum) in je ein Röhrchen mit 5 ml 4:3-TPY-Bouillon ohne Zucker (Negativkontrolle), 5 ml 4:3-TPY-Bouillon mit Glucose (Positivkontrolle) und 5 ml 4:3-TPY-Bouillon mit 5%iger Zuckerlösung gegeben. Die Inkubation erfolgte in der Anaerobierarbeitsstation für 24 Stunden bei 37 °C. Die optische Dichte (oD) wurde bei 620 nm vor und nach der Inkubation gemessen. Zudem wurde die Keimzahl nach Koch im Plattengussverfahren bestimmt. Hierbei diente die gewachsene Kultur (vor dem Beimpfen) mit einer Verdünnungsreihe von 1 bis 10^{-8} als Vergleichssubstanz. Zur Bestimmung von oD und Keimzahl nach der Inkubation musste beachtet werden, dass die Bifidobakterien nur kurz mit Luftsauerstoff in Kontakt kommen dürfen. Aus diesem Grund wurden die Röhrchen nach der Inkubation in der Anaerobierarbeitsstation mit Parafilm versehen und dann erst der Anaerobierarbeitsstation entnommen. Anschließend erfolgte die Resuspendierung für 5 Sekunden auf einem Vortex-Mischer und im Anschluss die Messung der optischen Dichte. Danach wurde der Parafilm entfernt und die Keimzahl bestimmt. Dazu wurden 1:10-Verdünnungen mit Ringerlösung hergestellt und 1 ml dieser Lösung in Petrischalen pipettiert. Etwa 10 ml - 12 ml, auf 45 °C angewärmter TPY-Agar wurden in die Petrischale hinzugegeben und gut gemischt. Nach Erstarren des Agars erfolgte die Inkubierung für drei bis vier Tage bei 37 °C in der Anaerobierarbeitsstation sowie die Messung der Keimzahl.

3.9 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Diese Messungen wurden im Forschungszentrum Borstel durch Frau Anna Czabanska durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die durch präparative Chromatographie an Aktivkohle aufgereinigten und am Vakuumverdampfer getrockneten Proben in Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Reduktion der Proben mit 20 mg Natriumborhydrid für 16 Stunden im Dunklen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 M Salzsäure gestoppt. Das Lösungsmittel wurde gefriergetrocknet und die Probe mit 0,5 ml Wasser gewaschen sowie in Pyridinium-Acetat-Puffer (4 ml Pyridin und 10 ml Essigsäure in 1 l Puffer) gelöst. Mit Hilfe einer Biogel[®]P2-Säule und einem Pyridinium-Acetat-Puffer als Eluent erfolgte die Trennung der Tri-, Tetra- und Pentasaccharide. Das Lösemittel wurde danach durch einen Vakuumrotationsverdampfer entfernt.

Für die Analyse der Zusammensetzung der einzelnen Analyten erfolgte die Detektion der Hexosen als Alditol-Acetate mittels GLC (gas liquid chromatography). Die Hexosen wurden bei 100 °C für zwei Stunden mit 2 M Trifluoressigsäure behandelt. Anschließend erfolgte die Reduktion mit Natriumborhydrid für 16 Stunden im Dunklen und die Acetylierung bei 85 °C für 10 Minuten. Die Analyse erfolgte mittels GLC und einem Temperatur-Programm, welches für drei Minuten bei 150 °C startet und danach mit 3 °C pro Minute auf 320 °C ansteigt. Mit Hilfe einer Methylierungsanalyse sowie GLC-MS konnten zudem glycosidische Verknüpfungen analysiert werden. Dazu wurden die nach der BioGel®P2-Behandlung getrennten und getrockneten GOS in trockenem DMSO aufgenommen und trockenes Natriumhydroxid zugegeben. Das Gemisch wurde zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend Iodmethan für die Methylierung zugefügt. Eine Aufreinigung der methylierten GOS erfolgte durch eine Chloroform-Wasser-Extraktion. Das Produkt wurde anschließend hydrolysiert (2 M Trifluoressigsäure bei 100 °C für zwei Stunden), reduziert (Natriumborhydrid in einem 1:1-Methanol-Wasser-Gemisch) und acetyliert (bei 85 °C für 10 Minuten). Anschließend erfolgte die Analyse mittels GLC-MS.

Die Analyse der GOS mittels NMR-Spektrometer erfolgte in D₂O bei 27 °C. ¹H-NMR-Experimente wurden bei 700,75 MHz und ¹³C-NMR-Experimente bei 176,2 MHz durchgeführt. Die chemische Verschiebung wurde relativ zu externen Aceton angegeben.

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Entwicklung von Methoden zur Analytik von Oligosacchariden

Die für diese Arbeit interessanten Oligosaccharide sind Minorkomponenten der Milch und müssen zur weiteren Analyse von den Majorkomponenten (Fette, Proteine und Lactose) isoliert werden. Die Herausforderung stellt dabei die Trennung zwischen Lactose und den Oligosacchariden dar. Beide Analyten gehören zu der Stoffklasse der Kohlenhydrate und unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Molmassen. Im Vergleich zu den Oligosacchariden liegt die Lactose in Milchproben im Überschuss (etwa 1000-fach) vor. Dieser hohe Lactoseanteil stört die Analytik und sollte während der Probenvorbereitung weitgehend abgetrennt werden. Bei der Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden werden folgende Schritte durchgeführt: Entfettung (siehe Kapitel 4.1.1.1), Proteinentfernung (ebenfalls Kapitel 4.1.1.1), Lactoseabtrennung (siehe Kapitel 4.1.1.2), chromatographische Trennung der einzelnen OS mit anschließender Detektion (siehe Kapitel 4.1.1.3.1) und massenspektrometrischer Analyse (siehe Kapitel 4.1.1.3.2).

Die Analyse der Oligosaccharide erfolgt mittels hochauflösender Anionenaustauscherchromatographie mit pulsierender amperometrischen sowie massenspektrometrischen Detektion (HPAEC-PAD/IT-MS). Die entwickelte Methode wird anschließend validiert (siehe Kapitel 4.1.1.4). Des Weiteren werden photometrische Testsysteme zur raschen Abschätzung der Gehalte an neutralen (siehe Kapitel 4.1.2.1) und sauren Oligosacchariden (siehe Kapitel 4.1.2.2) entwickelt.

4.1.1 Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden

4.1.1.1 Fett- und Proteinabtrennung

Die Fettabtrennung von Milchproben erfolgte durch Zentrifugation in der Kälte [[Kunz et al., 1996] und [Bode, 2003]].

Für die Proteinentfernung der Milchproben sind verschiedene Methoden (siehe Kapitel 3.5.1.2) in der Literatur beschrieben. Diese sind in Abb. 4-1 gegenübergestellt.

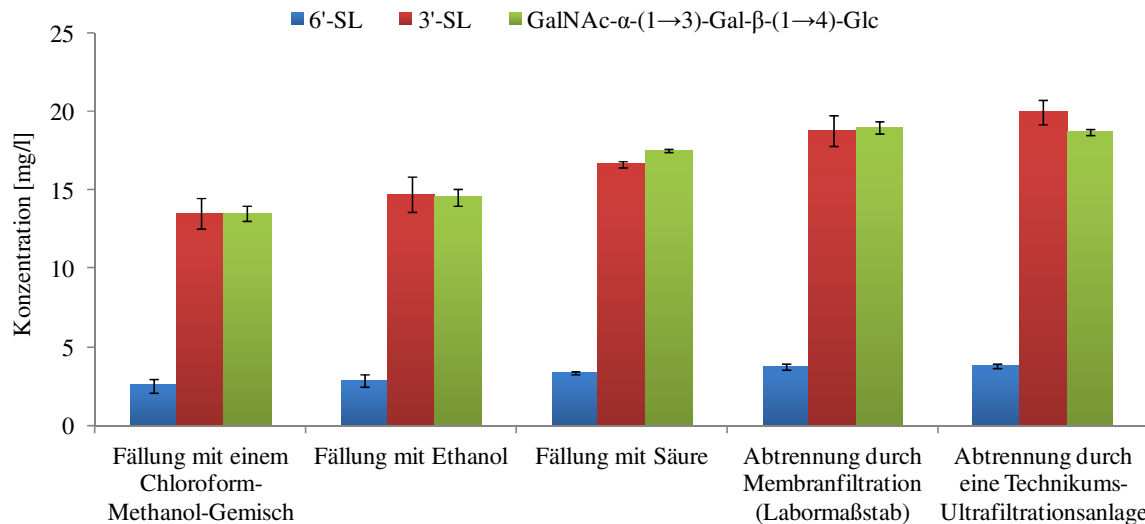


Abb. 4-1: Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden zur Proteinabtrennung bei einer Kuhmilchprobe (Probenaufarbeitung mittels GCC-SPE, Analyse durch HPAEC, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, n = 3)

Die höchsten Gehalte der quantifizierbaren Oligosaccharide in Kuhmilch wurden bei der Proteinentfernung mittels Membranfiltration im Labor- oder im Technikumsmaßstab gemessen. Bei den Proteinfällungen mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch, mit Ethanol oder mit Säure wurden deutlich geringere Werte gemessen, was auf einen Verlust der OS während der Aufarbeitung hindeutet (siehe Abb. 4-1). Die Membranfiltrationsmethoden sind - im Gegensatz zu den Fällungsmethoden - aus sicherheitstechnischen und lebensmittelrechtlichen Gründen auch großtechnisch umsetzbar. Das OS-Profil (siehe Abb. 6-1 im Anhang) bleibt durch die verschiedenen Aufarbeitungsmethoden unverändert. Offenkundig gehen keine Kuhmilch-OS durch die unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden vollständig verloren.

Geringe Gehalte an Restproteinen wurden in den mit der Technikum-Ultrafiltrationsanlage aufgereinigten Proben mit Hilfe von SDS-Gel-Elektrophorese (siehe Abb. 6-2 im Anhang) detektiert. Diese Proteine wurden in der nachfolgenden Lactoseentfernung abgetrennt und beeinflussten die weitere Analytik nicht. Bei diesen Restproteinen handelte es sich um Substanzen mit einer Molekülmasse von ca. 14,2 kDa, 19,8 kDa und 23,6 kDa. Milchproteine wie Caseine (v. a. α_{S1} -Casein mit einer molekularen Masse von ca. 23,6 kDa) oder Molkenproteine wie α -Lactalbumin (M = ca. 14,2 kDa) oder β -Lactoglobulin (M = ca. 18,3 kDa) könnten in den Restproteinen enthalten sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die geringsten Verluste an OS bei der Proteinentfernung mit Hilfe der Membranfiltrationstechniken eintreten.

4.1.1.2 Lactoseabtrennung

Die Abtrennung der im großen Überschuss vorhandenen Lactose wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Neben der Größenausschlusschromatographie mit unterschiedlichen Materialien (Sephadex[®]G25 (siehe Kapitel 4.1.1.2.1) und BioGel[®](siehe Kapitel 4.1.1.2.2)) wurde eine Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE = graphitized carbon cartridge solid phase extraction, siehe Kapitel 4.1.1.2.3) getestet.

4.1.1.2.1 Größenausschlusschromatographie mit dem Material Sephadex[®]G25 zur Lactoseabtrennung

Bei der Größenausschlusschromatographie - siehe Kapitel 2.4.1 - handelt es sich um die Trennung der Moleküle nach ihrer effektiven Größe [[Gey, 2008] und [Scherz and Bonn, 1998]]. Als stationäre Phase wurde das aus Dextranen und mit Epichlorhydrin vernetzte Handelsprodukt Sephadex[®]G25 genutzt. Der chromatographische Verlauf ausgewählter Standards wurde während eines 180min-Laufes (siehe Abb. 4-2) untersucht. Die Konzentration der in Milchproben vorhandenen Substanzen Lactose und der freien N-Acetylneuraminsäure - Trivialname: Sialinsäure - wurde analog zu deren Gehalt in Milch gewählt [[Souci et al., 2008] und [Kim et al., 1966]]. Somit wurde für Lactose eine 5%ige Lösung und für N-Acetylneuraminsäure eine 0,1%ige Lösung angesetzt. Weiterhin wurde Melezitose untersucht. Dieses Trisaccharid ist dem in Kuhmilch vorhandenem Oligosaccharid N-Acetyl-galactosaminyl-lactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] am ähnlichsten und kann nicht in Kuhmilch detektiert werden. Es wurde eine Konzentration von 0,1 % eingesetzt, die die Konzentration von N-Acetyl-galactosaminyl-lactose in der Kuhmilch von 2 mg/l bis 4 mg/l [[Fong et al., 2011] und [McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek, 2004]] stark überschreitet, aber eine chromatographische Untersuchung ermöglicht. Der enzymatisch hergestellte, aufgereinigte GOS-Sirup GOS90 (Hersteller: Friesland Campina Domo EMEA) wurde in einer Konzentration von 5 % - analog zur Lactose - analysiert.

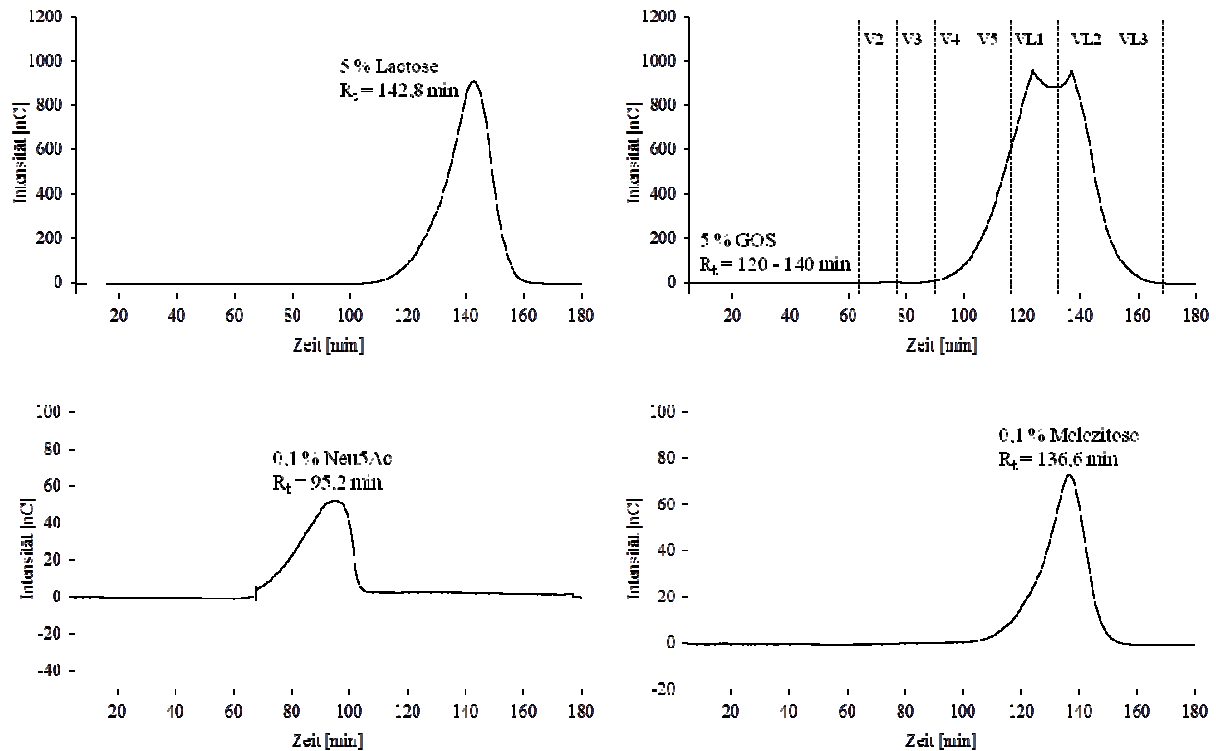


Abb. 4-2: Chromatographischer Verlauf der Standards Lactose (5 %), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, 0,1 %), Melezitose (0,1 %) und dem enzymatisch hergestellten GOS-Sirup GOS90 (5 %) während der Größenausschlusschromatographie mit Sephadex[®]G25 (0,25 ml/min für 180 min) zur Lactoseabtrennung (Fraktionen à 4 min, V = Vereinigung)

Die Standardsubstanzen eluieren in folgender Reihenfolge (siehe Abb. 4-2): N-Acetylneuraminsäure ($M = 309,3 \text{ g/mol}$, $R_t = 95,2 \text{ min}$) < Melezitose ($M = 504,4 \text{ g/mol}$, $R_t = 136,6 \text{ min}$) < Lactose ($M = 342,3 \text{ g/mol}$, $R_t = 142,8 \text{ min}$). Die sauren Verbindungen scheinen von der Säule am wenigsten zurückgehalten zu werden und eluieren zeitiger als neutrale Verbindungen. Substanzen mit hoher Molmasse werden tendenziell eher von der Säule gewaschen als Verbindungen mit niedriger Molmasse (Vergleich: Melezitose vs. Lactose). Die GOS-Mischung wird zwischen Minute 120 und Minute 140 detektiert und zeigt im Sephadex[®]-Chromatogramm nur einen breiten Peak. Über die Effektivität der Trennung mittels Sephadex[®] kann anhand dieser Chromatogramme daher keine Aussage getroffen werden. Deshalb wurden die gesammelten 4min-Fraktionen zu diversen Vereinigungen (siehe Abb. 4-2) zusammengefasst und im Vergleich zur Ausgangssubstanz mittels HPAEC-PAD (siehe Abb. 4-3) detaillierter untersucht. Die Vereinigung V1 enthält nach Analyse mittels Ninhydrin-Tüpfeltest viele Proteine und wird deshalb nicht mittels HPAEC-PAD untersucht.

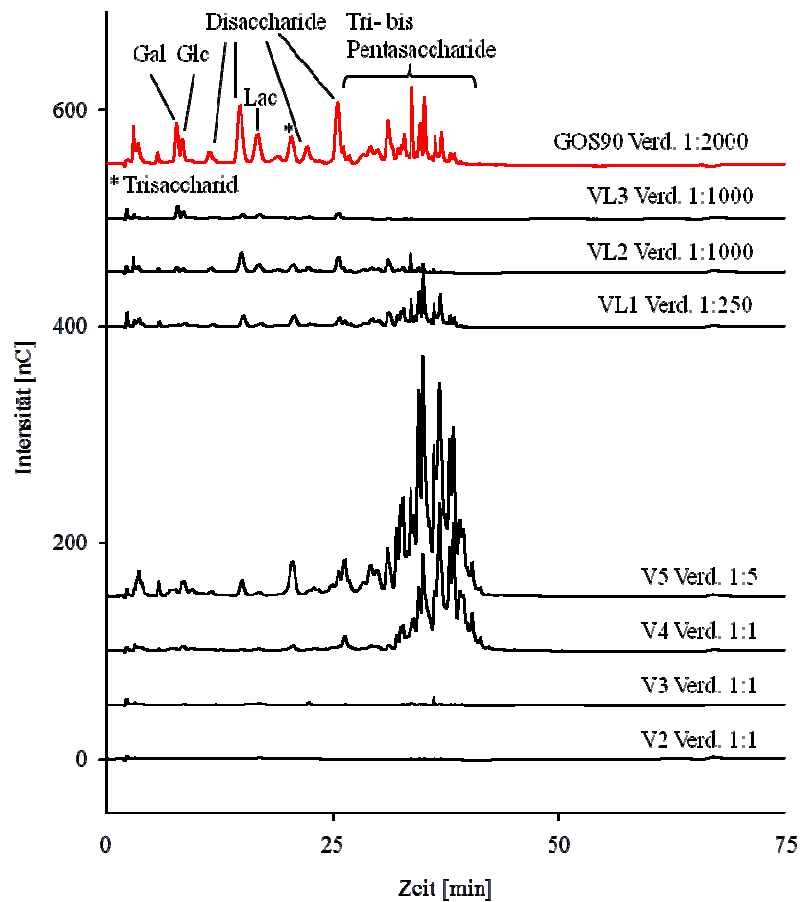


Abb. 4-3: HPAEC-Chromatogramme der Vereinigungen V2 bis VL3 des nach Sephadex[®] getrennten GOS90-Sirups sowie des unbehandelten GOS90-Sirups (75 % Trockenmasse)

In den Vereinigungen V2 und V3 sind wenige neutrale Verbindungen des GOS-Sirups detektierbar (siehe Abb. 4-2), wobei in diesen Vereinigungen v. a. saure Verbindungen erwartet worden. Ein Großteil der GOS-Substanzen (Tri- bis Pentasaccharide) ist in den Vereinigungen V4 und V5 sichtbar. Diese Vereinigungen enthalten nur sehr geringe Mengen an Monosacchariden und Lactose. Die Abtrennung der Monosaccharide und der Lactose von den GOS ist somit erfolgreich. Die Lactose eluiert v. a. in den Vereinigungen VL1 und VL2, wobei eine 250- bis 1000-fache Verdünnung im Vergleich zu V2 bis V5 nötig war, um analysierbare HPAEC-Chromatogramme zu erhalten. Zudem können Reste der GOS-Analyten in VL1 und VL2 detektiert werden, wodurch es zu Verlusten an GOS bei der Trennung zwischen Lactose und GOS kommt. Die Monosaccharide Glucose und Galactose können in der Vereinigung VL3 detektiert und nahezu vollständig von den GOS abgetrennt werden. Auf Grund der fehlenden Standardsubstanzen war eine weitere Quantifizierung der

Analyten im GOS-Sirup nicht möglich, so dass die Auswertung anhand der Flächenanteile im jeweiligen Chromatogramm erfolgte. Beim Zusammenfassen der Vereinigungen V2 bis V5 - folgend als V2-5 bezeichnet (siehe Tab. 6-7 im Anhang) - bestand die so erhaltene Mischung aus 92,6 HPAEC-Flächenprozent Tri- bis Pentasacchariden, 0,4 % Galactose, 0,8 % Glucose, 1,3 % Lactose und 4,9 % zu Lactose isomeren Disacchariden. Die Ausgangssubstanz bestand im Vergleich dazu aus 56,1 HPAEC-Flächenprozent Tri- bis Pentasacchariden, 4,7 % Galactose, 2,7 % Glucose, 6,5 % Lactose und 30,0 % isomeren Disacchariden. Demnach können Mono- und Disaccharide von den höhermolekularen GOS abgetrennt und die GOS aufgereinigt werden. Bei der Aufreinigung des 5%igen Lactosestandards mittels Sephadex[®] (siehe Abb. 4-2) und anschließender Analyse mittels HPAEC konnten 99,9 % der Lactose in den Fraktionen V2 bis VL3, aber nur 0,1 % der Lactose in V2-5 wiedergefunden werden. Die Elution der Lactose erfolgt v. a. in VL1 bis VL3. Die oligosaccharidreichen Fraktionen V2-5 enthalten nur einen geringen Anteil an Lactose. Der Melezitose-Standard - stellvertretend für N-Acetyl-galactosaminyl-lactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] - konnte zu 51,1 % in V2 bis VL3 und zu 0,7 % in V2-5 wiedergefunden werden. Die Elution der Melezitose ist daher nicht vollständig. Die Wiederfindung in V2-5 ist sehr gering, da der Analyt mit Lactose coeluiert. Die Abtrennung zwischen Lactose und Melezitose bzw. N-Acetyl-galactosaminyl-lactose scheint somit unter diesen Bedingungen nicht möglich. Der N-Acetylneuraminsäure-Standard - stellvertretend für die sauren Oligosaccharide - konnte zu 60 % in V2 bis VL3 und ebenfalls zu 60 % in V2-5 wiedergefunden werden. Dieser saure Standard wird vollständig in V2-5 eluiert, wobei ein Teil des Analyten durch die Aufarbeitung verloren geht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass v. a. saure und höher molekulare OS in den Fraktionen V2-5 eluieren. Lactose und Melezitose werden dagegen in den Fraktionen VL1 bis VL3 detektiert. Die Fraktion V2-5 kann daher als oligosaccharidreich und lactosearm angesehen werden. Diese Fraktion ist folglich für die HPAEC-Messung geeignet. Die Fraktionen VL1 bis VL3 sind dagegen lactosereich, haben aber bei der Analytik von Oligosacchariden eine untergeordnete Bedeutung. Diese Fraktionen müssten auf Grund des hohen Anteils an Lactose so verdünnt werden, dass die Oligosaccharid-Analyten nicht mehr detektierbar sind.

Zur Optimierung der Trennung mittels Sephadex[®] wurde die Trennzeit von 180 min mit einem Fluss von 0,25 ml/min durch ein schnelleres Verfahren mit 1,5 ml/min für 30 min ersetzt (siehe Abb. 4-4). Zur Entwicklung dieser Methode wurde Humanmilch genutzt, da diese Milch eine hohe Anzahl von Oligosacchariden mit einem vielfältigen OS-Muster

besitzt. Dadurch sind viele Peaks in dem HPAEC-Chromatogramm sichtbar, was einen Vergleich der beiden Methoden zulässt. Ein Vergleich mit einzelnen Standards oder Kuhmilch, die nur drei Haupt-Oligosaccharide (N-Acetyl-galactosaminyl-lactose, 3'-SL und 6'-SL) enthält, gestaltet sich dagegen schwierig, da bestimmte, höhermolekulare Analyten nicht erfasst werden können.

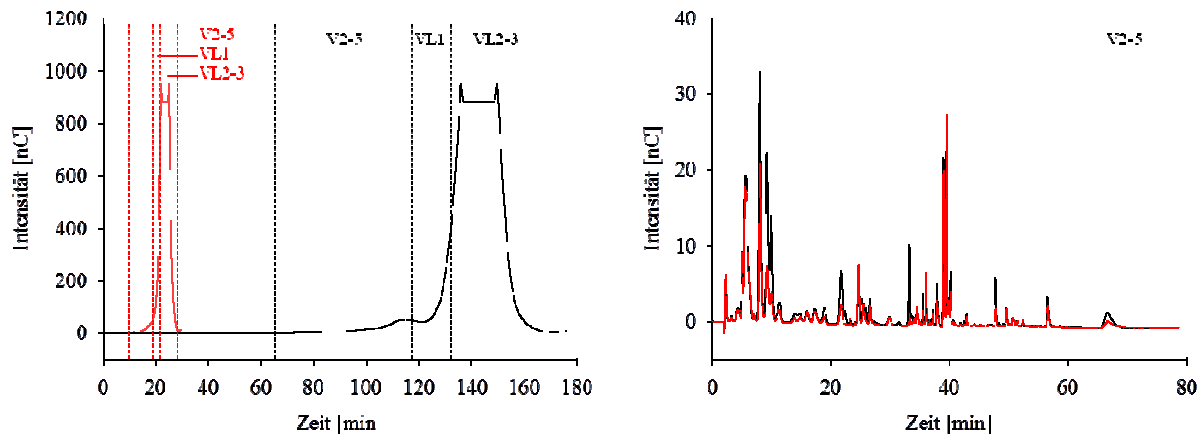


Abb. 4-4: Sephadex[®]-Chromatogramme (links) und HPAEC-Chromatogramme (rechts) von der Vereinigung V2-5 des 30min-Laufs (rot) und 180min-Laufs (schwarz) von Humanmilch (entfettet und weitgehend proteinfrei)

Die verkürzte Methode entspricht einer Zeitersparnis von 150 min je Probe. Bei dem Vergleich der beiden Sephadex[®]-Chromatogramme (30 min vs. 180 min, siehe Abb. 4-4, linkes Diagramm) sind bis auf die offensichtliche Stauchung des 30min-Chromatogramms im Vergleich zu dem 180min-Chromatogramm keine signifikanten Änderungen feststellbar. Das OS-Muster bleibt im HPAEC-Chromatogramm der Vereinigung V2-5 (siehe Abb. 4-4, rechtes Diagramm) weitgehend unverändert. Einige Peaks zeigen höhere oder geringere Flächen bei der 30min-Methode als bei der 180min-Methode. Entscheidend ist hierbei die Reproduzierbarkeit der einzelnen Analyten mit der gewählten Methode. Eine 100%ige Wiederfindung konnte für die meisten Analyten nicht erreicht werden, so dass zumindest die Reproduzierbarkeit möglichst konstant gehalten werden sollte. Die Verteilung der einzelnen Analyten in den drei Vereinigungen (V2-5, VL1 und VL2-3) ändert sich bei dem 30min- bzw. 180min-Lauf nur geringfügig. Lactose konnte zu 0,8 % in VL1 und zu 99,2 % in VL2-3 während des 30min-Laufs sowie zu 0,1 % in VL1 und 99,9 % in VL2-3 während des

180min-Laufs wiedergefunden werden. In den Vereinigungen V2-5 beider Methoden konnte keine Lactose gemessen werden. Die Verteilung der Analyten in den einzelnen Fraktionen blieb zwischen den beiden Methoden somit annähernd gleich. Aus Gründen der deutlich verringerten Analysezeit und der guten Vergleichbarkeit beider Methoden wurde die 30min-Methode für die weiteren Experimente genutzt.

Die Reproduzierbarkeit der Sephadex[®]-Größenausschlusschromatographie wurde durch das dreifache Aufarbeiten einer Kuhmilchprobe untersucht. Die Fraktion V2-5 (analog zu Abb. 4-4, Herstellung siehe Anhang, Tab. 6-7) der Sephadex[®]-Aufarbeitung wurde anschließend mittels HPAEC (siehe Abb. 4-5) gemessen.

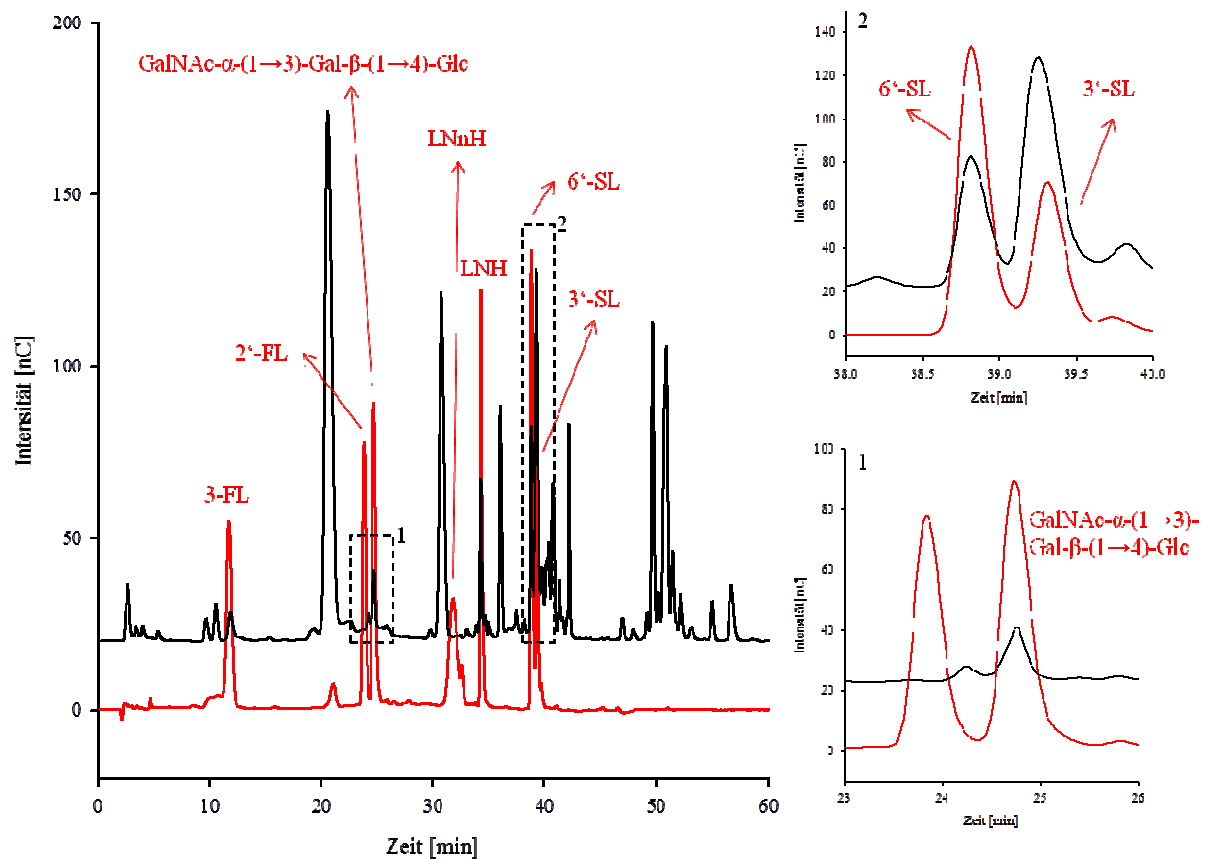


Abb. 4-5: HPAEC-Chromatogram einer Kuhmilch (schwarz, Proteinabtrennung durch 5kDa-Ultrafiltration, Lactoseabtrennung durch Sephadex[®] (30min-Lauf)-Größenausschlusschromatographie, Analytik der Fraktion V2-5) sowie eines OS-Standard-Mixes (rot)

In Kuhmilch können mittels HPAEC-PAD/IT-MS die Analyten N-Acetyl-galactosaminyl-lactose, 3'-SL und 6'-SL identifiziert und quantifiziert werden, so dass diese Substanzen auch zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit (siehe Tab. 4-1) herangezogen werden konnten.

Tab. 4-1: Reproduzierbarkeit (n = 3) einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilchprobe (Lactoseabtrennung durch Sephadex[®] (30min-Lauf)-Größenausschlusschromatographie, Analytik der Fraktion V2-5), Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Analyse durch HPAEC

OS	Gehalt [mg/l]	VarK [%]
GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	0,5 \pm 0,1	14,4
3'-SL	17,7 \pm 3,9	21,9
6'-SL	4,6 \pm 0,9	19,1

Die Variationskoeffizienten der drei Analyten lagen zwischen 14,4 % und 21,9 %. Dies deutet auf eine große Schwankung der Analysenwerte und eine damit verbundene geringe Reproduzierbarkeit der Analyten hin. Außerdem ist auffällig, dass der Analysenwert für N-Acetyl-galactosaminyl-lactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] sehr niedrig ist, was zusammen mit der oben dargestellten geringen Wiederfindung für Melezitose den Schluss zulässt, dass dieses Oligosaccharid bei der Sephadex[®]-Aufarbeitung verloren geht und nicht von der Lactose abgetrennt werden kann. Eine weitere Validierung der Sephadex[®]-Größenausschlusschromatographie hinsichtlich verschiedener Standardadditionen erweist sich als schwierig, da die OS-Standards sehr kostenintensiv sind und zur Sephadex[®]-Aufreinigung in großen Mengen vorliegen müssten.

Zusammenfassend wird sichtbar, dass das neutrale Oligosaccharid N-Acetyl-galactosaminyl-lactose scheinbar nicht von Lactose abgetrennt werden kann und die Reproduzierbarkeit der verfügbaren OS-Analyten relativ gering ist.

4.1.1.2.2 Größenausschlusschromatographie mit dem Material BioGel[®] zur Lactoseabtrennung

Die Lactoseabtrennung mittels Größenausschlusschromatographie wurde neben dem Sephadex[®]-Material auch mit dem BioGel[®]P2-Material (Polyacrylamid) getestet [[Hernández et al., 2009] und [Leo et al., 2009]]. Die theoretischen Trennungsvorgänge entsprechen denen der Sephadex[®]-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.4.1).

Im ersten Schritt der Methodenentwicklung wurde die optimale Fließgeschwindigkeit des Eluenten für eine effektive Trennleistung der einzelnen Analyten bestimmt, da hierzu keine einheitliche Literaturmeinung vorliegt. Der GOS90-Sirup wurde mit verschiedenen Fließgeschwindigkeiten des Eluenten auf dessen Trennung untersucht (siehe Abb. 4-6).

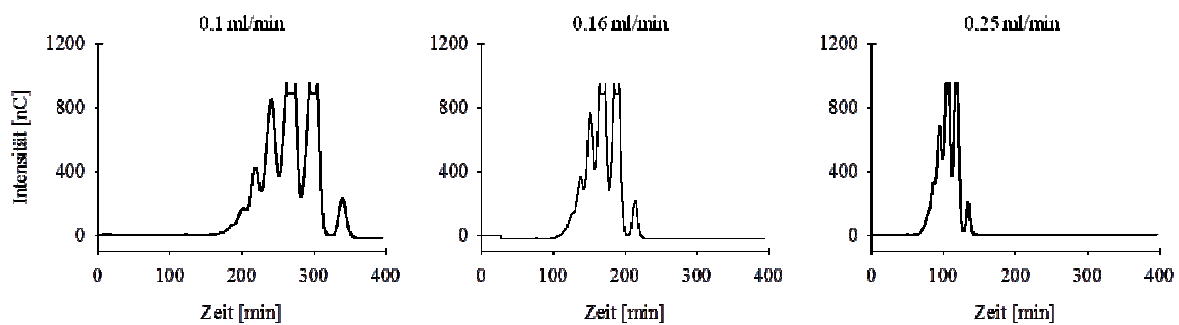


Abb. 4-6: BioGel[®]-Chromatogramme von GOS90 der Firma Friesland Campina Domo EMEA mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten des Eluats

Eine Fließgeschwindigkeit des Wassereluenten von 0,1 ml/min ist optimal, da die Trennung der einzelnen Peaks im Vergleich zu den Fließgeschwindigkeiten von 0,16 ml/min und 0,25 ml/min am schärfsten ist (siehe Abb. 4-6). Eine geringere Fließgeschwindigkeit als 0,1 ml/min würde die Analysezeit deutlich verlängern, worunter die Wirtschaftlichkeit leiden würde.

Analog zur Methodenentwicklung der Sephadex[®]-Aufreinigung wurden bei der BioGel[®]-Größenausschlusschromatographie vor einer Messung der Milchproben diverse Standards analysiert. Dazu wurde eine 20%ige Lactoselösung, eine 5%ige Lösung des GOS90-Sirups sowie ein Gemisch aus beiden Substanzen (je 5 %) mittels BioGel[®] aufgereinigt (siehe Abb. 4-7) und anschließend nach entsprechender Fraktionierung mittels Zucker-DC (siehe Abb. 4-8) untersucht. Es wird deutlich, dass zuerst die höhermolekularen Oligosaccharide von

der BioGel[®]-Säule eluieren, gefolgt von niedermolekularen OS sowie Di- und Monosacchariden. Lactose ist v. a. in V7 sowie V8 messbar; Monosaccharide v. a. in V8 (siehe Abb. 4-7). Zur GOS-Aufreinigung müssen diese Fraktionen von den GOS-haltigen Fraktionen (V1 bis V6) abgetrennt werden. Jedoch sind Verluste an GOS durch die DC-Auswertung erkennbar, da einige GOS-Analyten in V7 detektierbar sind (siehe Abb. 4-8). Die Vereinigung V7 besteht aus GOS-Analyten (überwiegend niedermolekulare Verbindungen) und einem hohen Anteil an Lactose. Die Trennung der Mono- und Disaccharide von den Oligosacchariden mittels BioGel[®]-Größenausschlusschromatographie war erfolgreich und wurde mittels HPAEC weiter überprüft (siehe Abb. 4-9).

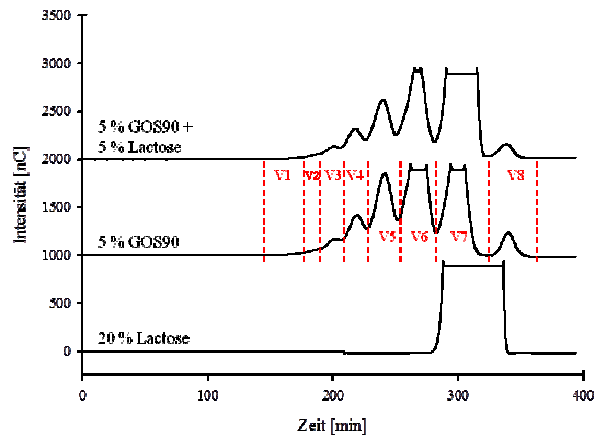


Abb. 4-7: BioGel®-Chromatogramme einer 20%igen Lactoselösung, einer 5%igen GOS90-Lösung sowie einer Mischung aus beiden Substanzen (5 % GOS90 + 5 % Lactose)

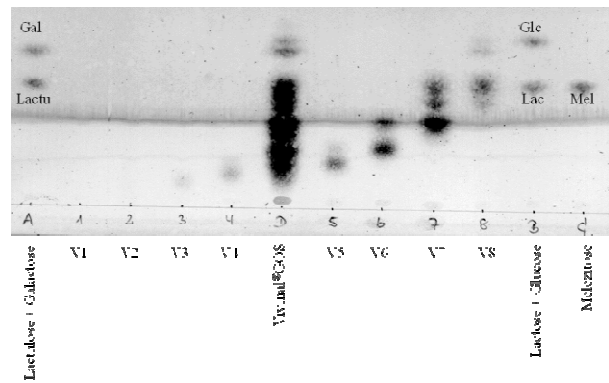


Abb. 4-8: Zucker-DC der nach BioGel®-Aufreinigung (zur Lactose-abtrennung) gewonnenen Fraktionen einer 5%igen GOS90-Lösung

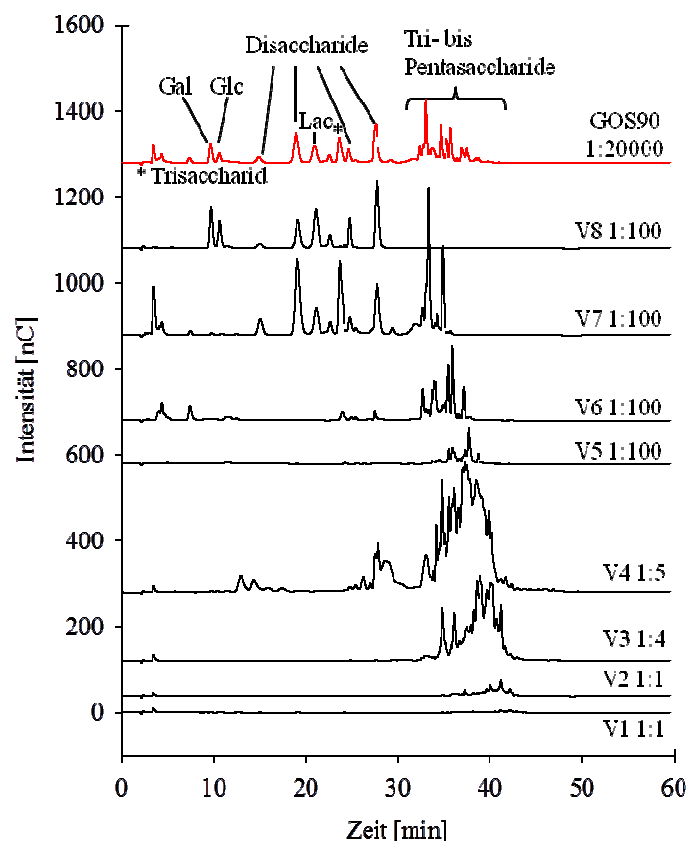


Abb. 4-9: HPAEC-Chromatogramme der Vereinigungen V1 bis V8 des nach BioGel® aufgereinigten 5%igen GOS90-Sirups (schwarz) sowie des nicht aufgereinigten GOS90-Sirups (rot)

Beim Vergleich des unbehandelten GOS90-Sirups mit den nach der BioGel[®]-Aufreinigung erzielten Fraktionen V1 bis V8 des GOS90-Sirups wird deutlich, dass v. a. in V3 und V4 Peaks detektierbar sind, die in der unbehandelten Ausgangssubstanz nicht vorhanden sind. Nach Überprüfung der HPAEC-Säule und des gesamten analytischen Detektionssystems durch verschiedene Kohlenhydratstandards kann eine Verunreinigung des Messsystems ausgeschlossen werden. Ähnliche Peaks sind auch bei dem Gemisch aus 5 % GOS90 und 5 % Lactose detektierbar. Die BioGel[®]-Aufreinigung wurde mit einer neu angesetzten 5%igen GOS-Lösung wiederholt. Im HPAEC-Chromatogramm konnten ähnliche Peaks wie im vorangegangenen Versuch gemessen werden. Diese neu hergestellte GOS-Lösung wurde über Sephadex[®] aufgereinigt, um eine Probenverunreinigung auszuschließen. Da die HPAEC-Chromatogramme der durch Sephadex[®] erhaltenen Fraktionen keine unerklärlichen Peaks zeigen, kann eine Probenverunreinigung ausgeschlossen werden. Somit scheinen die unerwünschten Peaks vom BioGel[®] zu eluieren und durch eine Überlagerung mit den GOS-Analyten die analytische Trennung zu stören.

Dennoch wurde eine entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch mit Hilfe der BioGel[®]-Größenausschlusschromatographie aufgearbeitet und mittels HPAEC analysiert (siehe Abb. 4-10). In den Milchproben liegt ein signifikant anderes Verhältnis von Oligosacchariden zu Lactose (ca. 1:1000) als im GOS90-Sirup (ca. 1:20) vor. Dadurch könnte die Trennung maßgebend beeinflusst werden. Außerdem sind bei der Kuhmilch keine GOS-Derivate wie bei dem GOS90-Sirup, sondern v. a. die Analyten GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL enthalten.

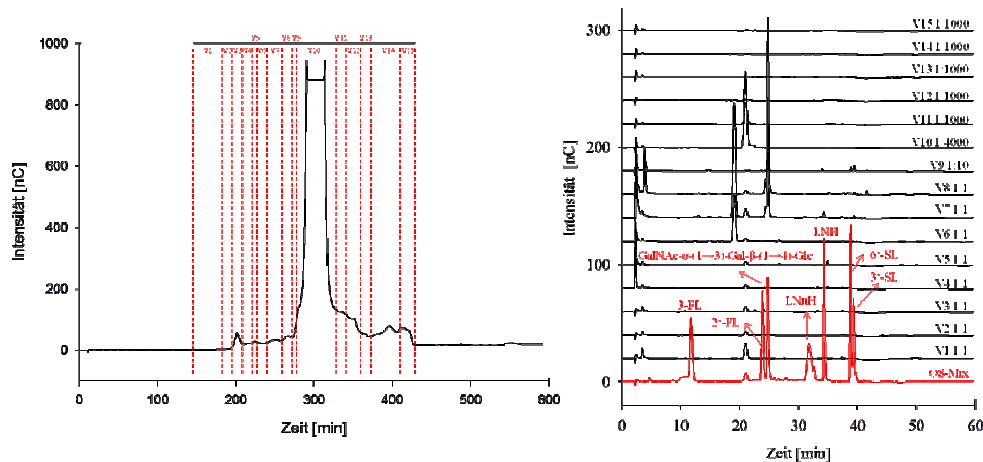


Abb. 4-10: BioGel®-Chromatogramm (links) einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilchprobe sowie den eingeteilten Fraktionen entsprechende HPAEC-Chromatogramme (rechts) inklusive eines OS-Standard-Mixes

Im Gegensatz zu dem GOS90-Sirup zeigt die Kuhmilch nach der BioGel®-Aufarbeitung keine undefinierten Peaks im HPAEC-Chromatogramm im Bereich von 30 min bis 45 min (siehe Abb. 4-10, links). Somit scheint eine spezifische Reaktion des GOS-Sirups mit dem BioGel®-Material für diese Peaks verantwortlich zu sein. Das HPAEC-Chromatogramm der BioGel®-Aufreinigung von Kuhmilch weist jedoch im Vergleich zur Sephadex®-Aufreinigung (siehe Abb. 4-5) weniger Peaks auf. Auffallend ist, dass die Analyten 3'-SL und 6'-SL, welche die Haupt-Oligosaccharide in Kuhmilch darstellen, in der aufgereinigten Kuhmilchprobe fehlen (siehe Abb. 4-10, rechts). Im Gegensatz zur Sephadex®-Aufreinigung ist mit der BioGel®-Größenausschlusschromatographie die N-Acetyl-galactosaminyl-lactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] im erhöhten Maß detektierbar. Um Probenverunreinigungen auszuschließen, wurde dieselbe Kuhmilchprobe, die zur BioGel®-Größenausschlusschromatographie eingesetzt wurde, mittels Sephadex® aufgereinigt. Das HPAEC-Chromatogramm der Sephadex®-Aufreinigung ist ähnlich zu den Sephadex®-Chromatogrammen in Kapitel 4.1.1.2.1 (siehe Abb. 4-5) und enthält nur sehr geringe Mengen an N-Acetyl-galactosaminyl-lactose, dafür deutlich sichtbare Peaks für 3'-SL und 6'-SL. Eine Probenverunreinigung kann somit ausgeschlossen werden. Das Fehlen der Analyten 3'-SL und 6'-SL bei der BioGel®-Aufreinigung kann nicht auf deren Fehlen in der Probe zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist es, dass diese Analyten während der Aufreinigung auf der BioGel®-Säule hängen bleiben und nicht mit Wasser eluieren. Durch den Einsatz einer geeigneten Puffer-Lösung, die diese Wechselwirkung zwischen Analyt und Trennmatrix unterbindet, könnte dieses Problem behoben werden.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die BioGel®-Größenausschlusschromatographie zur Trennung zwischen Oligosacchariden und Lactose ungeeignet ist. Dies liegt v. a. darin begründet, dass bei der Aufreinigung des GOS90-Sirups im HPAEC-Chromatogramm undefinierbare, die Analytik störende Peaks detektierbar sind und die sauren Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL der Kuhmilch in den BioGel®-Fraktionen nicht wiedergefunden werden können. Fehler durch eine Verunreinigung des Messsystems bzw. einer Probenverunreinigung können ausgeschlossen werden.

4.1.1.2.3 Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE) zur Lactoseabtrennung

Eine weitere Methode zur Lactoseabtrennung und der damit verbundenen Oligosaccharidaufreinigung stellt die Festphasenextraktion an Aktivkohle (siehe Kapitel 2.4.1) dar [[Packer et al., 1998] und [Redmond and Packer, 1999]]. Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um die Ausführung der SPE zu optimieren. Im ersten Schritt wurden die Eluate der SPE auf die Anwesenheit von Proteinen und Zuckern getestet (siehe Abb. 4-11). Dazu wurden 100 µl einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilch auf die GCC-SPE-Säule gegeben und die Analyten mit 3 ml Wasser (E1a), 3,3 ml Wasser (E1b), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4) eluiert.

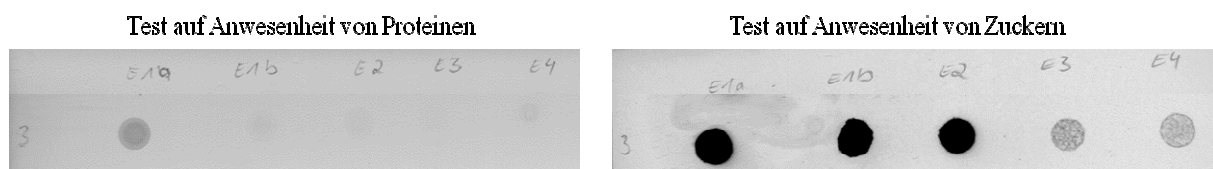


Abb. 4-11: Tüpfeltests zum Überprüfen der Anwesenheit von Proteinen (links) und Zuckern (rechts) in den verschiedenen Eluaten der GCC-SPE (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina auf die GCC-SPE: 100 µl, Eluation: 3 ml Wasser (E1a), 3,3 ml Wasser (E1b), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4))

Der Tüpfeltest zum Nachweis von Proteinen zeigt eine deutlich positive Reaktion im Eluat E1a. In den Eluaten E1b bis E4 ist diese positive Reaktion deutlich schwächer (siehe Abb. 4-11, links). Die Restproteine der entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilch

eluieren somit überwiegend in E1a. Die Anwesenheit von Kohlenhydraten ist durch den Tüpfeltest in den fünf Eluaten nachweisbar. Die Lactose scheint auf Grund der dunklen Spots in E1a, E1b und E2 zu eluieren (siehe Abb. 4-11, rechts). Nach Packer et al. [1998] handelt es sich bei E3 um neutrale und bei E4 um saure Oligosaccharide.

Im nächsten Schritt wurde das Volumen des Wasserschnitts von 6,3 ml auf 20 ml erhöht, damit die Lactose möglichst ausschließlich in E1 eluiert. Nach HPAEC-Messung der Eluate konnten 92,6 % der Lactose in E1 wiedergefunden werden. Der Großteil an Galactose, Glucose und Lactulose eluieren im Eluat E1.

Entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch wurde mit GOS aufgestockt, um das Lactose-MOS-Verhältnis von ca. 1000:1 auf 5:1 zu verändern. Diese Proben wurden zusammen mit entfetteter und weitgehend proteinfreier Humanmilch mittels GCC-SPE aufgearbeitet. Die GCC-SPE-Eluation der Analyten erfolgte mit 20 ml Wasser (E1), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4). Die Fraktionen E2 bis E4 wurden mit Hilfe von Tüpfeltests und Zucker-DC (siehe Abb. 4-12) sowie HPAEC-PAD (siehe Abb. 4-13) untersucht. Eine Untersuchung der Fraktion E1 entfiel, da diese Fraktion Lactose im hohen Überschuss beinhaltet und bei der für Lactose benötigten Verdünnung keine OS mehr detektierbar sind.

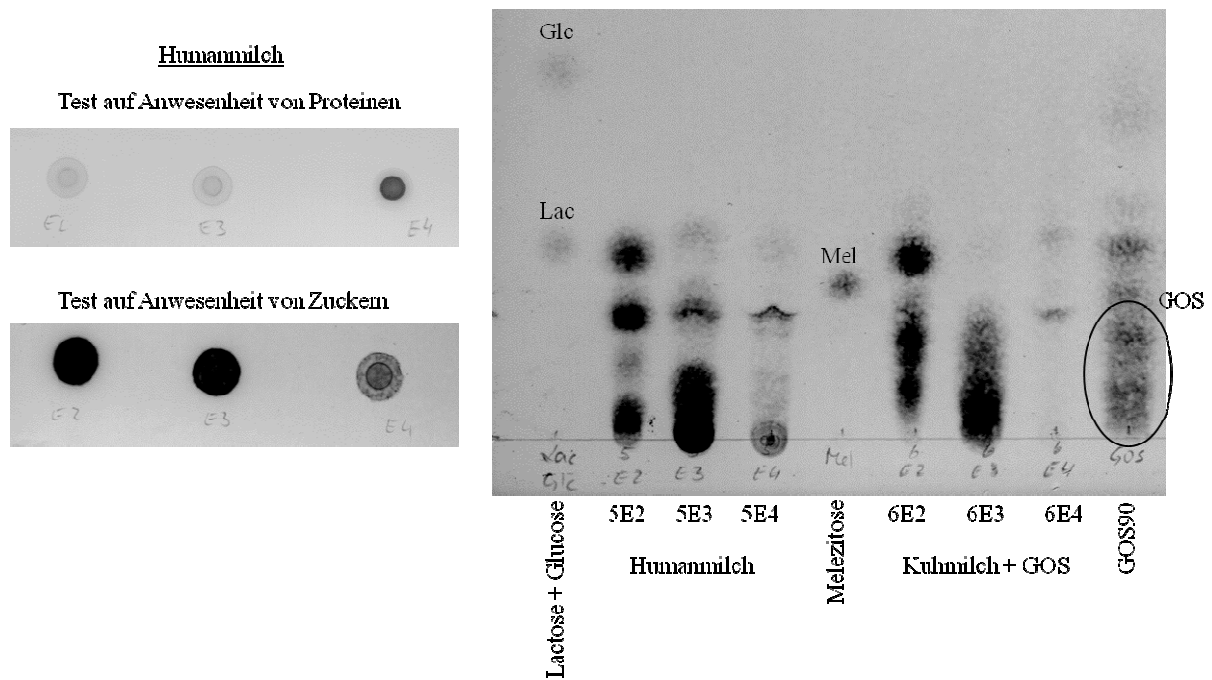


Abb. 4-12: Links: Tüpfeltests zum Nachweis von Proteinen (oben) und Zucker (unten), rechts: Zucker-DC der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Humanmilch (5) sowie mit GOS aufgestockte (ca. 1 g auf 100 ml Milch), entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch (6), Aufgabevolumina: je 100 μ l, Eluation: 20 ml Wasser (E1), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4))

Die nach GCC-SPE-Aufarbeitung von Humanmilch erhaltenen Eluate E2 bis E4 zeigen mit Hilfe der Tüpfeltests eine deutlich positive Reaktion auf Zucker und eine eher schwache Reaktion auf Proteine. Die erhöhte positive Reaktion auf Proteine in E4 kann auf eventuell vorhandene Glycoproteine oder sialinsäurehaltige Verbindungen zurückzuführen werden. Mit Hilfe der Zucker-DC können die unterschiedlichen Zuckerszusammensetzungen der einzelnen Eluate näher charakterisiert werden. Das Eluat E2 der Humanmilch (5E2) besteht v. a. aus Disacchariden - zum Großteil Lactose - und höhermolekularen OS. Geringe Mengen an Disacchariden sind in E3 und E4 detektierbar. Der Anteil an höhermolekularen OS ist in E3 am höchsten, gefolgt von E2 und E4. Nach Packer et al. [1998] eluieren in E4 überwiegend saure OS. Eine genauere Analyse mittels HPAEC-PAD zeigt, dass die Zuckerverteilung in E2 bis E4 bei der mit GOS aufgestockten Kuhmilch (6E2 bis 6E4) ähnlich zur Humanmilch ist (siehe Abb. 4-13).

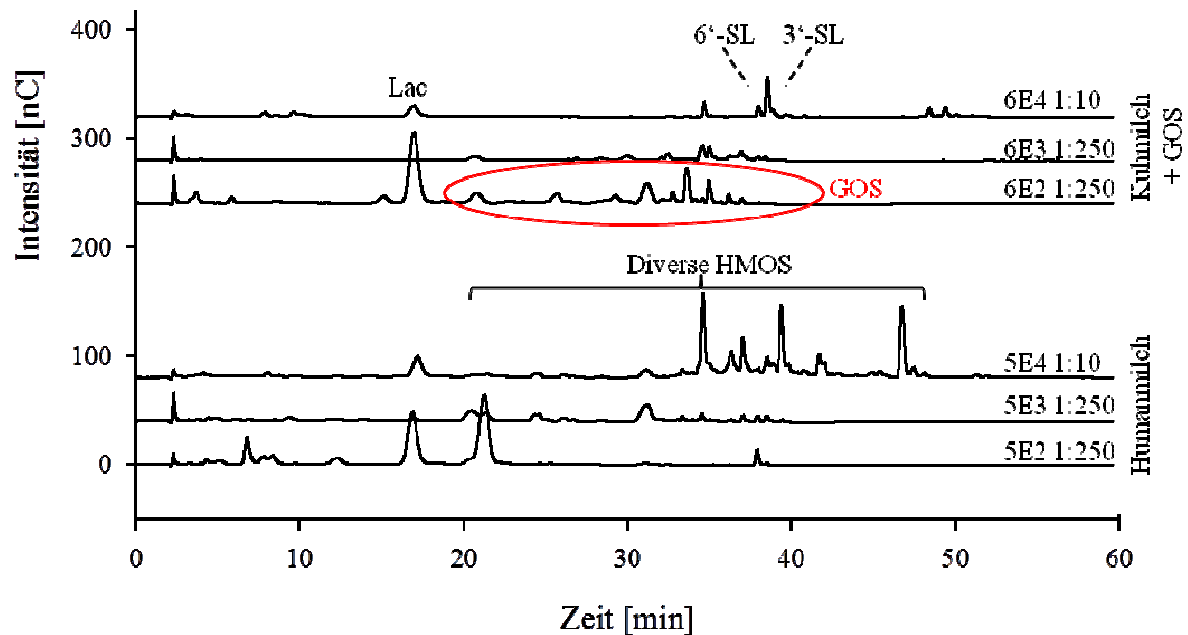


Abb. 4-13: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Humanmilch (5) sowie mit GOS aufgestockte (ca. 1 g auf 100 ml Milch), entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch (6), Aufgabevolumina: je 100 μ l, Eluation: 20 ml Wasser (E1), 1,5 ml 10 % Acetonitril (E2), 1,5 ml 20 % Acetonitril (E3) und 1,5 ml 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA (E4))

Die HPAEC-Analyse der nach GCC-SPE erhaltenen Eluate zeigt, dass die neutralen OS wie GOS in E2 und E3 eluieren. Der Lactosegehalt betrug in E2 nur noch ca. 2 % bis 4 % des Ausgangslactosegehalts (5: 0,13 g/100ml; 6: 0,18 g/100ml) bzw. ca. 0,02 % in E3 (5: 1,67 mg/100g; 6: 0,91 mg/100g). Die sauren OS wie 3'-SL und 6'-SL eluieren in E4, wobei der Lactosegehalt auf ca. 0,02 % des Ausgangslactosegehalt (5: 1,96 mg/100g; 6: 0,99 mg/100g) reduziert werden konnte (siehe Abb. 4-13). Mit dieser Methode ist eine Trennung von Oligosacchariden und Lactose möglich. Dabei gehen weder neutrale OS - wie bei der Sephadex[®]-Aufreinigung - noch saure OS - wie bei der BioGel[®]-Größenausschlusschromatographie - verloren. Dennoch ist eine weitere Optimierung der Methode notwendig, da einige neutrale OS in E4 und saure OS in E3 eluieren.

Um eine schärfere Trennung zwischen neutralen und sauren OS bzw. zwischen OS und Lactose zu erreichen, wurde der Anteil am organischen Lösungsmittel im Eluationsmittel schrittweise erhöht und das Eluationsvolumen pro Eluat auf 4 ml festgesetzt. Dabei wurde deutlich, dass Lactose mit einem geringen Anteil am organischen Lösemittel in

Eluationsmittel effektiver abgetrennt werden kann als durch die alleinige Eluation mit Wasser. Die Eluation der Lactose erfolgte in drei Schritten: 1.) 4 ml Wasser, 2.) 4 ml 2 % Acetonitril, 3.) 4 ml 4 % Acetonitril. In diesen drei Schritten konnten 99,0 % der Lactose wiedergefunden werden. Die OS-Standards GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL ist nicht messbar. Das wichtigste neutrale OS der Kuhmilch - N-Acetyl-galactosaminyllactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] - eluiert ab 6 % Acetonitril gefolgt von den sauren Oligosacchariden, die von 8 % bis 40 % Acetonitril mit 0,1 % TFA detektiert werden können. Der größte Anteil der sauren OS kann dabei in dem Eluat wiedergefunden werden, das mit Säure versetzt wurde.

Nach Zusammenfassung der Eluationsschritte ergibt sich folgende Reihenfolge: 1.) 4ml Wasser (A1), 2.) 4 ml 2 % Acetonitril (A2), 3.) 4 ml 4 % Acetonitril (A3), 4.) 4ml 20 % Acetonitril (A4), 5.) 4 ml 40 % Acetonitril + 0,1 % TFA (A5). Für spätere HPAEC-Messungen werden die letzten beiden Eluate vereinigt und zusammen als A4+5 gemessen. Diese Vereinigung ist lactosearm und reich an neutralen und sauren OS. Das neutrale Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc eluiert in A4 und die sauren OS 3'-SL und 6'-SL in A5.

Um eine unvollständige Eluation der neutralen und sauren OS im letzten Eluationsschritt zu vermeiden, wurde der letzte Schritt (A5) zweimal ausgeführt. Dabei waren keine sauren oder neutralen Analyten in dem wiederholten Eluationsschritt detektierbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Eluation der Analyten vollständig ist.

Das Aufgabevolumen wurde von 100 μ l auf 200 μ l verdoppelt. Durch diese Erhöhung wurde die Aktivkohle-Säule überladen und die Trennung verschlechtert. Die Wiederfindung der Lactose wurde in den ersten drei Eluationsschritten verringert; ebenso die Wiederfindung der sauren und neutralen OS der Kuhmilch in den letzten beiden Eluationsschritten. Eine Erhöhung der Probenaufgabe auf 200 μ l ist daher nicht empfehlenswert.

Im Anschluss an die erfolgreiche Methodenentwicklung bezüglich des Acetonitril-Fließmittels wurde Ethanol als Eluansmittel getestet. Das Eluationsverhalten der Oligosaccharide wurde bei beiden Eluationssystemen (Ethanol vs. Acetonitril) anhand einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilch untersucht. Folgende Eluationsschritte wurden unter Verwendung von Ethanol als Fließmittel durchgeführt: 1.) 4 ml Wasser (E1), 2.) 4 ml 2 % Ethanol (E2), 3.) 4 ml 4 % Ethanol (E3), 4.) 4ml 50 % Ethanol (E4),

5.) 4 ml 50 % Ethanol + HCOOH (pH2) (E5). Die weitere Analytik erfolgte wie bei der Acetonitril-Eluation mittels HPAEC-PAD (siehe Abb. 4-14).

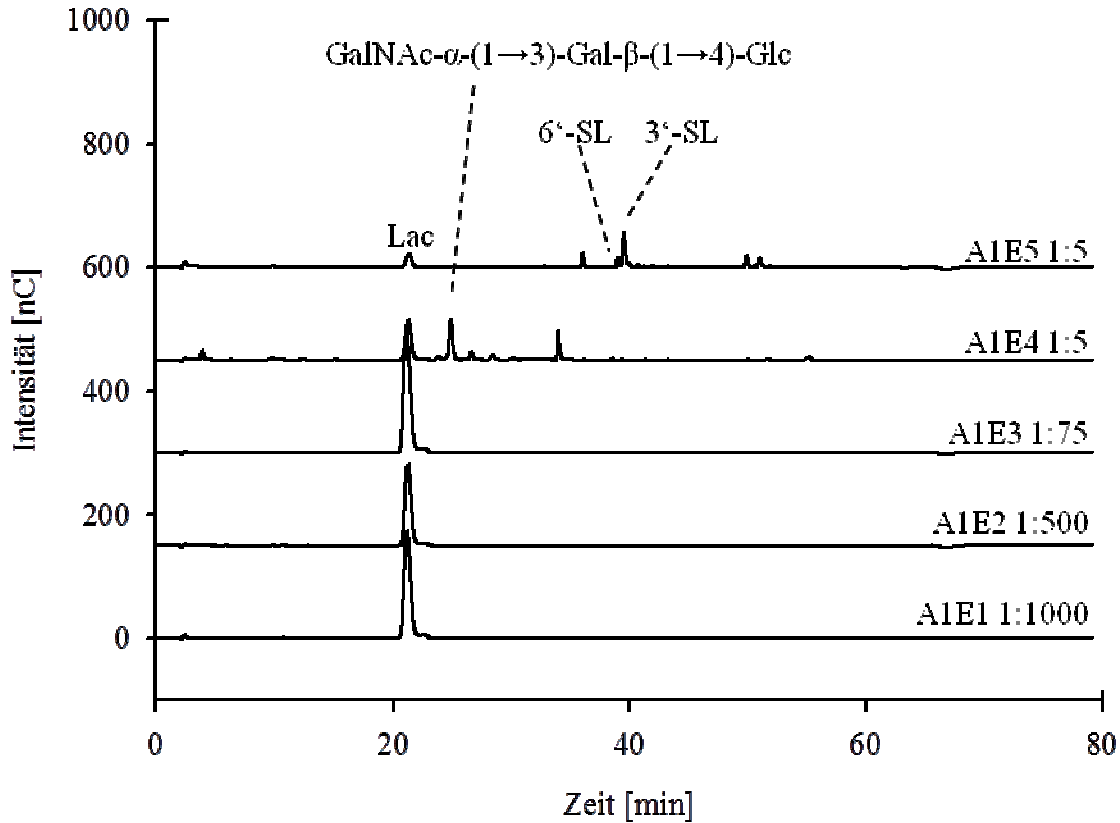


Abb. 4-14: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 μ l, Eluation: 4 ml Wasser (E1), 4 ml 2 % Ethanol (E2), 4 ml 4 % Ethanol (E3), 4 ml 50 % Ethanol (E4) und 4 ml 50 % Ethanol mit HCOOH (pH 2) (E5))

Wie bei dem Acetonitril-Fließmittelsystem wird auch mit dem Ethanolssystem der Großteil der Lactose in den ersten drei Eluationsschritten (E1 bis E3) detektiert. Das neutrale Haupt-OS der Kuhmilch - N-Acetyl-galactosaminyllactose [GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc] - eluiert in der Fraktion E4 bei einer Fließmittelzusammensetzung von 50 % Ethanol. Der Restlactosegehalt lag in dieser Fraktion bei 38,0 mg/l (ca. 0,08 % bezogen auf den Ausgangslactosegehalt). In der Fraktion E5 konnte 12,3 mg/l (ca. 0,02 % bezogen auf den Ausgangslactosegehalt) Restlactose sowie die sauren Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL detektiert werden. Wie bei der Acetonitril-Eluation ist auch mit Ethanol als Eluationsmittel

eine Trennung zwischen Lactose und OS möglich. Für spätere HPAEC-Messungen werden die Fraktionen E4 und E5 vereinigt und folgend als E4+5 bezeichnet.

Mit beiden Elutionssystemen wurde die Reproduzierbarkeit und die Wiederfindung nach Standardaddition mit den drei Haupt-OS der Kuhmilch sowie die Wiederfindung eines reinen OS-Standard-Mixes analysiert (siehe Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Ermittlung der Reproduzierbarkeit (n = 2 für Ethanol, n = 5 für Acetonitril) und Wiederfindung nach Standardaddition (n = 4 für Ethanol, n = 3 für Acetonitril) der nach GCC-SPE-Aufarbeitung (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 µl), sowie Ermittlung der Wiederfindung von reinen OS-Mix (n = 3 für Ethanol und Acetonitril) mit dem Elutionssystem Acetonitril und dem Elutionssystem Ethanol, Analyse durch HPAEC-PAD, Quantifizierung mittels externer OS-Standards

	MOS	Reproduzierbarkeit	Standardaddition	OS-Mix
Ethanol	3'-SL	(30,67 ± 1,33) mg/l [VarK = 4,35 %]	WDF: 77,22 % ± 11,52 % [VarK = 14,92 %]	WDF: 64,04 % ± 2,71 % [VarK = 4,23 %]
	6'-SL	(5,22 ± 0,25) mg/l [VarK = 4,85 %]	WDF: 81,37 % ± 8,44 % [VarK = 10,37 %]	WDF: 79,79 % ± 2,72 % [VarK = 3,41 %]
	GalNAc-α-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc	(14,96 ± 0,01) mg/l [VarK = 0,09 %]	WDF: 97,52 % ± 9,30 % [VarK = 9,54 %]	WDF: 88,97 % ± 4,12 % [VarK = 4,63 %]
Acetonitril	3'-SL	(21,13 ± 0,41) mg/l [VarK = 1,95 %]	WDF: 50,41 % ± 0,76 % [VarK = 1,51 %]	WDF: 40,32 % ± 0,41 % [VarK = 1,02 %]
	6'-SL	(3,82 ± 0,09) mg/l [VarK = 2,24 %]	WDF: 66,40 % ± 1,51 % [VarK = 2,27 %]	WDF: 45,70 % ± 0,71 % [VarK = 1,55 %]
	GalNAc-α-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc	(16,24 ± 0,20) mg/l [VarK = 1,26 %]	WDF: 114,49 % ± 0,07 % [VarK = 0,06 %]	WDF: 87,30 % ± 3,91 % [VarK = 4,48 %]

Die Gehalte der OS-Analyten in der Kuhmilchprobe weisen bei der Ethanol-Eluation für 3'-SL und 6'-SL höhere Werte auf als bei der Acetonitril-Eluation (3'-SL: 30,67 mg/l vs. 21,13 mg/l; 6'-SL: 5,22 mg/l vs. 3,82 mg/l). Bei dem Trisaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc werden unter Verwendung der Acetonitril-Eluation geringfügig höhere Werte gemessen als bei der Ethanol-Eluation (16,24 mg/l vs. 14,96 mg/l). Entscheidend für beide Systeme ist die Reproduzierbarkeit der Analyten. Der Variationskoeffizient der drei OS-Analyten schwankte im Ethanolssystem von 0,09 % bis 4,85 % und im Acetonitrilsystem von 1,26 % bis 2,24 %. Die Messungen mittels Eluation durch Acetonitril scheinen somit geringere, aber stabilere Analysenwerte zu liefern. Dies kann durch die Analyse der mit OS-Standard aufgestockten Kuhmilch-Proben bestätigt werden. Für die beiden sauren Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL können deutlich höhere Wiederfindungen im Ethanolssystem gemessen werden als im Acetonitrilsystem. Jedoch liegen die Variationskoeffizienten bei dem Ethanol-Eluationssystem deutlich höher (3'-SL: WDF: 77,22 % vs. 50,41 %, VarK: 14,92 % vs. 1,51 %; 6'-SL: WDF: 81,37 % vs. 66,40 %, VarK: 10,37 % vs. 2,27 %). Durch die oben dargestellte Wiederholung des letzten Eluationsschritts (bei beiden Systemen) und dem Fehlen der Analytenpeaks in den Fraktionen A1 bis A3 bzw. E1 bis E3 kann eine Verschleppung der sauren OS-Analyten in die vorherige und nachfolgende Fraktion ausgeschlossen werden. Ein konstanter Teil der sauren Analyten scheint auf der Säule hängen zu bleiben und ist durch das genutzte Eluationssystem nicht vollständig detektierbar. Die Wiederfindung von GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc liegt bei beiden Systemen bei circa 100 %, wobei mit dem Acetonitrilsystem ein deutlich geringerer Variationskoeffizient (0,06 %) als beim Ethanolssystem (9,54 %) messbar ist. Ähnliche Tendenzen sind auch bei der Analyse eines reinen OS-Standardmixes sichtbar. Auffallend ist hierbei, dass die Wiederfindungen der Analyten des reinen OS-Mixes geringer als die Wiederfindungen in der aufgestockten Kuhmilch sind. Anscheinend beeinflusst die Milchmatrix die Eluation der OS durch die GCC-SPE positiv.

Die Fraktionen A4+5 bzw. E4+5 nach Acetonitril- bzw. Ethanol-Aufreinigung wurden mittels HPAEC-PAD gegenübergestellt (siehe Abb. 4-15).

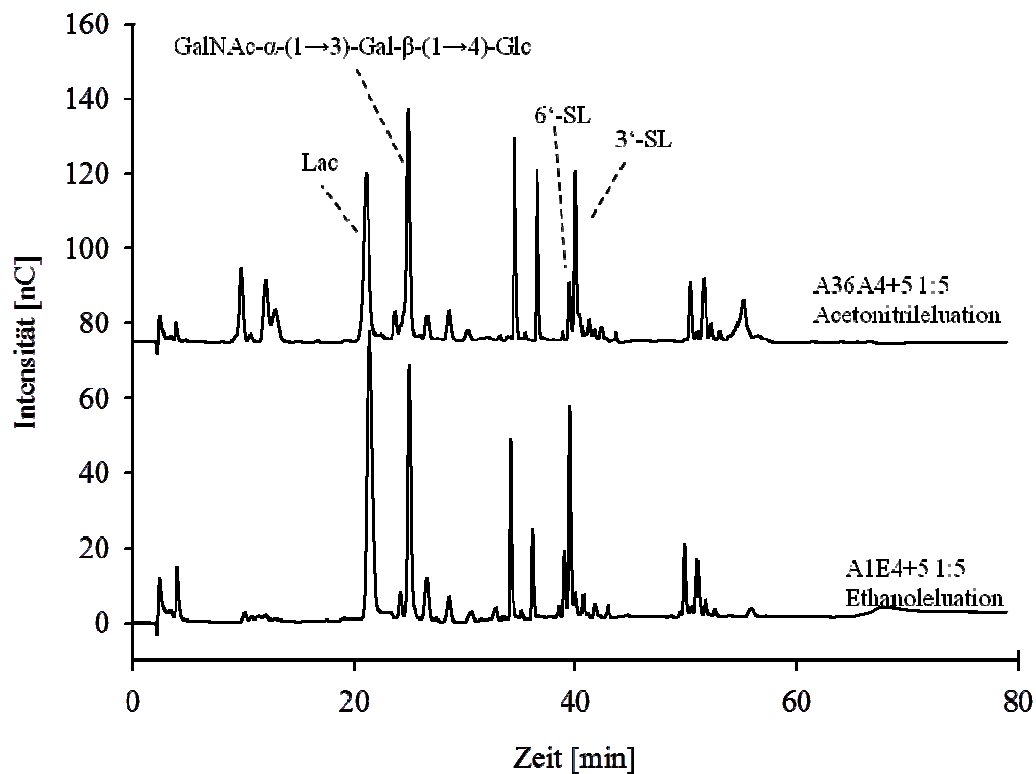


Abb. 4-15: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE erhaltenen Fraktionen 4 und 5 nach Acetonitril- oder Ethanol-Elution (Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, Aufgabevolumina: 100 μ l)

Die OS-Muster der mittels HPAEC analysierten Fraktionen der beiden GCC-SPE-Aufarbeitungssysteme (Acetonitril und Ethanol) weisen keine Peaks auf, die nur in einem der beiden Aufarbeitungssysteme enthalten sind. Mittels Acetonitril- und Ethanol-Aufarbeitung können dementsprechend vergleichbare OS-Muster detektiert werden (siehe Abb. 4-15), wodurch die Vorziehungswürdigkeit eines Elutionssystems anhand anderer Faktoren getroffen werden muss. Das Acetonitril-Elutionssystem bietet den Vorteil, dass kleinere Variationskoeffizienten und damit verbundene bessere Reproduzierbarkeiten als beim Ethanol-Elutionssystem erzielt werden können. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Analyten nicht vollständig in dem Eluat wiedergefunden werden können. Da die Verluste der Analyten nach Ermittlung der Variationskoeffizienten stabil sind, fällt dieser Nachteil weniger ins Gewicht. Die GCC-SPE mit Acetonitril-Aufarbeitung scheint daher zur Trennung von Lactose und Oligosacchariden besser geeignet und wird im Folgenden angewendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die GCC-SPE die in der Kuhmilch vorhandenen Oligosaccharide (3'-SL, 6'-SL und GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc) von

Lactose abtrennbar sind. Beim Vergleich des Ethanol- und des Acetonitril-Elutionssystems hat sich letzteres auf Grund der stabileren Reproduzierbarkeiten der Analyten als geeigneter herausgestellt.

4.1.1.2.4 Vergleich der verschiedenen Methoden zur Lactoseabtrennung

Die zur Trennung von Lactose und Oligosacchariden geeigneten Methoden - Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex[®] und Festphasenextraktion an Aktivkohle - werden in diesem Kapitel gegenübergestellt. Für beide Methoden wurde die gleiche entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch verwendet, so dass eine Schwankung auf Grund verschiedener Probenzusammensetzung ausgeschlossen werden konnte. Die Analyse erfolgte mittels HPAEC-PAD (siehe Abb. 4-16).

Die Größenausschlusschromatographie mit BioGel[®] wurde auf Grund der mangelnden Trennung zwischen Lactose und Oligosaccharide nicht betrachtet.

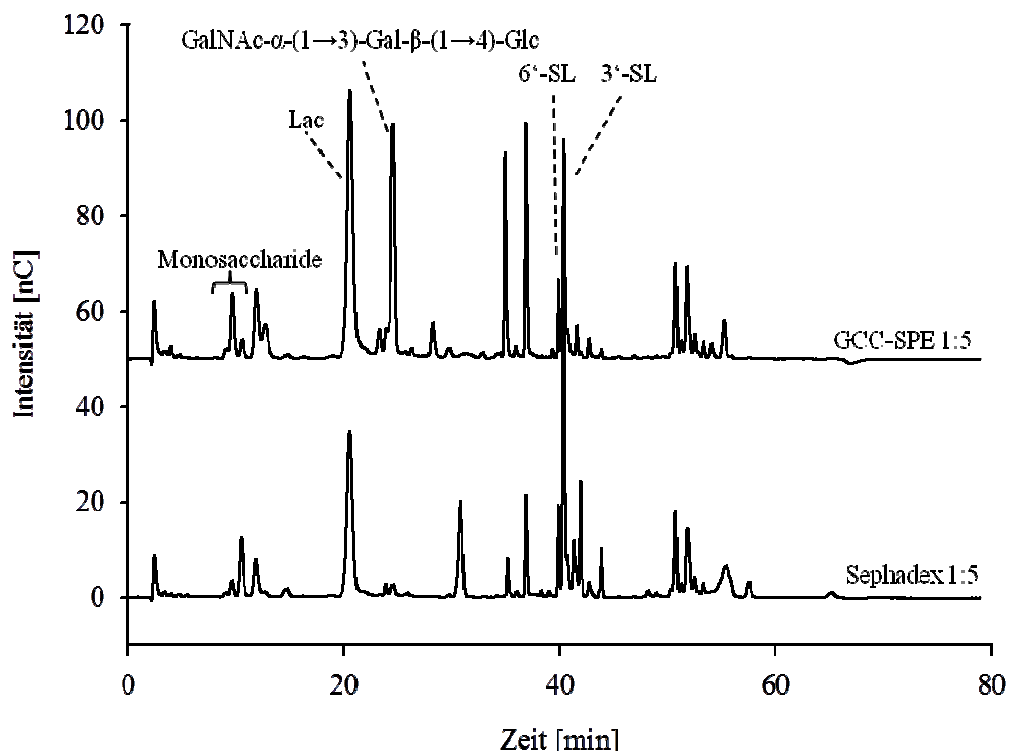


Abb. 4-16: HPAEC-Chromatogramme der nach GCC-SPE bzw. Sephadex[®] erhaltenen Fraktionen (A4+5-Fraktion der GCC-SPE, V2-5-Fraktion der Sephadex[®], Probe: entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch, GCC-SPE-Elution: Acetonitril, Sephadex[®] Elution: Wasser)

Das OS-Muster der Kuhmilch beider Aufarbeitungsmethoden ist relativ ähnlich. Auffallend ist, dass der Analyt GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc mit Hilfe der Sephadex[®]-Aufreinigung fast vollständig verloren geht und im HPAEC-Chromatogramm nur ein kleiner Peak sichtbar ist (siehe Abb. 4-16). Peaks bei 23,5 min und 28,2 min sind nur in dem HPAEC-Chromatogramm mit vorheriger GCC-SPE-Aufarbeitung detektierbar, wohingegen der Peak bei 30,9 min nur bei der Sephadex[®]-Aufreinigung sichtbar ist. Die Analyten bei 34,3 min und 36,3 min sind nach beiden Aufarbeitungsmethoden in den Chromatogrammen sichtbar, besitzen jedoch nach der GCC-SPE-Aufarbeitung eine deutlich höhere Peakfläche. Nach LC/MS-Untersuchungen (siehe Kapitel 4.2.1.1) handelt es sich bei den Peaks mit den Retentionszeiten von 23,5 min, 28,2 min und 34,3 min um Trisaccharide mit Molmassen von ca. 504 g/mol. Der Peak bei 36,3 min ist nach LC/MS-Untersuchungen als N-Acetylneuraminsäure identifiziert worden. Dem Analyten bei 30,9 min kann bisher keinem bekannten Kohlenhydrat zugeordnet werden. Alle weiteren Peaks (ab Minute 37) sind in beiden Chromatogrammen ähnlich - insbesondere im Vergleich der Peakflächen - und sind wenn möglich nach LC/MS-Analyse als Sialyllactosen oder Disaccharidphosphat (Minute 50 bis Minute 60) identifizierbar. Den Peaks zwischen Minute 12 und Minute 15 sowie zwischen Minute 42 und Minute 50 sind bisher keine bekannten Zuckersubstanzen zuordenbar.

Die Wiederfindungen der sauren Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL betragen nach GCC-SPE-Aufarbeitung 50,4 % bzw. 66,4 % (siehe Kapitel 4.1.1.2.3). Der Standard N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) - eine saure Vorstufe dieser OS - konnte nach Sephadex[®]-Aufreinigung zu 60 % wiedergefunden werden (siehe Kapitel 4.1.1.2.1). Ein Teil der sauren OS geht somit bei beiden Methoden verloren, jedoch liefert die Aufarbeitung mittels GCC-SPE deutlich konstantere Werte (siehe Kapitel 4.1.1.2.3, VarK (3'-SL): 1,9 %, VarK (6'-SL): 2,2 %) als bei der Sephadex[®]-Aufreinigung (siehe Kapitel 4.1.1.2.1, VarK (3'-SL): 21,9 %, VarK (6'-SL): 19,1 %). Des Weiteren wird das Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc mittels Sephadex[®]-Aufreinigung nur ungenügend von Lactose abgetrennt, wodurch eine Quantifizierung unmöglich ist. Mittels GCC-SPE kann dieser Analyt hingegen von Lactose abgetrennt werden. Die Wiederfindung von GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc liegt bei nahezu 100 %. Aus den hier aufgeführten Gründen und der einfacheren Durchführung hat sich die GCC-SPE als die effektivere Methode zur Trennung von Lactose und Oligosacchariden herauskristallisiert. In den nachfolgenden Probenaufarbeitungen wird dementsprechend die Festphasenextraktion an Aktivkohle - nach der Entfettung und Proteinabtrennung - zur Lactoseabtrennung genutzt.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass durch die GCC-SPE die Kuhmilch-Oligosaccharide von Lactose - im Gegensatz zur Sephadex®-Größenausschlusschromatographie - abtrennbar sind.

4.1.1.3 Identifizierung und Quantifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/IT-MS

4.1.1.3.1 HPAEC-PAD

Für die Messung der OS-Analyten mittels HPAEC wurde der Gradient zur Zuckertrennung optimiert. Die diversen Gradienten und die damit gemessenen Chromatogramme sind im Anhang in Abb. 6-3 dargestellt. Zur Optimierung des Gradienten wurde der 6er-Standard-Mix (bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose) sowie der GOS90-Sirup analysiert. Der Gradient M1 (siehe Abb. 6-3) zeigt eine nicht ausreichende Trennung des 6er-Standard-Mixes, da von den sechs vorhandenen Standardsubstanzen nur fünf Peaks im HPAEC-Chromatogramm sichtbar sind. Diese sind zudem teilweise schlecht voneinander differenzierbar. Da alle Analyten des 6er-Standard-Mixes gut trennbar sein sollten, wurde der erste Teil des Gradienten von 5 auf 20 Minuten verlängert. In den ersten 20 Minuten war die Fließmittelzusammensetzung somit ausschließlich auf die Laufmittel A und D beschränkt. Der Anteil an Laufmittel D im vorderen Bereich des Gradienten wurde von 5 auf 10 % angehoben. Im Gegenzug wurde der mittlere Teil des Gradienten - Zeitpunkt des Einsatzes der Laufmittel B und C - verkürzt, um eine durchführbare Analysedauer zu gewährleisten. Mit dem so gestalteten Gradienten (Gradient M2) erfolgt eine gute Trennung der sechs Analyten des 6er-Standard-Mixes. Die Trennung der Analyten im GOS90-Sirup verläuft bis zu Minute 40 erfolgreich. Nach Minute 40 sind die Peaks nicht basisliniengetrennt. Im Anschluss wurde ein Drei-Komponenten-System ohne Laufmittel D getestet, da dies zu einer erheblichen Ersparnis an Chemikalien und Herstellungszeit führt. Durch diesen Gradienten (Gradient M3) ist eine Trennung der Komponenten des 6er-Standard-Mixes sichtbar, jedoch weisen die Peaks eine sehr hohe Retentionszeit auf. Bei weiterer Verwendung des Gradienten M3 wäre eine sehr große Analysedauer notwendig, um OS von der Säule eluieren zu können. Aus diesem Grund erfolgte die Trennung mit einem geringen Anteil des Laufmittels D an der Fließmittelzusammensetzung. Für den nächsten Gradienten (Gradient M4) wurde das Eintreten des Laufmittels B im Fließmittelgradienten von 20 min (im Vergleich zu M2) auf 15 min vorverlegt, um eine bessere Trennung der

neutralen Zucker im GOS90-Sirup zu erzielen. Mit dem Gradienten M4 kann eine gute Trennung des 6er-Standard-Mixes sowie des GOS90-Sirups erreicht werden. Dieser Gradient wurde verkürzt, in dem die Umstellung von Laufmittel A auf Laufmittel B nicht mit Hilfe eines Gradienten erfolgte, sondern sprunghaft durchgeführt wurde. Der so entstandene Gradient M5 zeigt eine gute Trennung des 6er-Standard-Mixes, aber eine ungenügende Trennung des GOS90-Sirups, da die Peaks ab Minuten 25 nicht basisliniengetrennt sind. Ein Gradient zum Wechsel zwischen Laufmittel A und B scheint somit zwingend notwendig. In den nächsten beiden Gradienten wurden unterschiedliche Ausgangsbedingungen (M6: Laufmitteln A, B und D, M7: Laufmittel B und D) getestet. Auf Grund einer unzureichenden Trennung der Analyten des 6er-Standard-Mixes wurden die Gradienten M6 und M7 verworfen. Ausgehend von Gradient M4 wurde ein neuer Gradient mit der Maßgabe entwickelt, die Eluationszeit der Analyten im 6er-Standard-Mix möglichst niedrig zu halten. Dazu wurde der 5%ige Anteil von Laufmittel D an der Fließmittelzusammensetzung von 30 auf 20 min reduziert. Zudem wurde der Wechsel von Laufmittel A auf Laufmittel B mit einem steileren Gradienten versehen. Die Analyten des 6er-Standard-Mixes und des GOS90-Sirups sind mit diesem Gradienten (Gradient M8) gut trennbar. Melezitose, Lactose und Lactulose sind jedoch nicht basisliniengetrennt, was v. a. bei der Lactose wünschenswert wäre, damit diese quantifiziert werden kann. Aus diesem Grund wurde der Anteil des Laufmittels D während der ersten 20 min des Gradienten von 5 % auf 10 % erhöht. Durch diesen Gradienten (Gradient M9) ist eine leichte Verbesserung der Basislinientrennung sichtbar, die jedoch nicht ausreichend ist. Deshalb wurde der Anteil des Laufmittels D im Gradienten M10 auf 20 % erhöht (siehe Abb. 4-17 und Abb. 4-18).

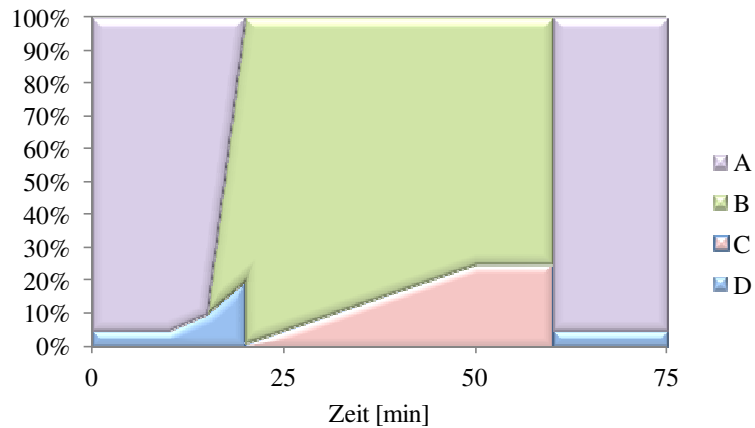


Abb. 4-17: Gradient M10 für die HPAEC-Trennung der Kohlenhydrate (A: 10 mM Natriumhydroxid, B: 100 mM Natriumhydroxid, C: 100 mM Natriumhydroxid + 1000 mM Natriumacetat, D: 100 mM Natriumhydroxid + 50 mM Natriumacetat)

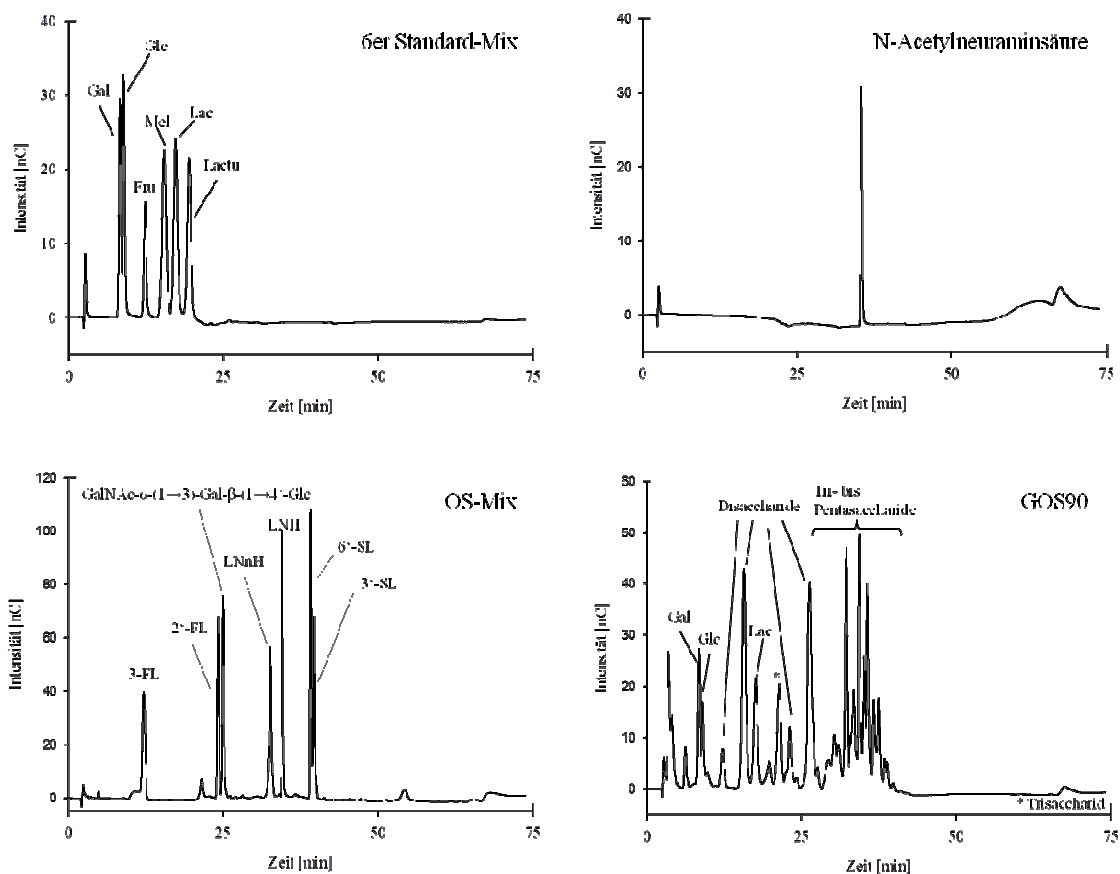


Abb. 4-18: Chromatographische Trennung (HPAEC-PAD) des 6er Standard-Mixes (bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), OS-Mixes (bestehend aus 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNH, LNH, 6'-SL und 3'-SL) sowie des GOS90-Sirups mit Hilfe des Gradienten M10

Mit dem Gradienten M10 kann eine Basislinientrennung der Analyten Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose des 6er-Standard-Mixes erzielt werden. Die Analyten 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH und LNH des OS-Mixes können ebenfalls basisliniengetrennt werden. Zudem kann eine gute Trennung der zahlreichen Analyten des GOS90-Sirups erreicht werden. Für alle weiteren Messungen mittels HPAEC-PAD wird der Gradient M10 zur Kohlenhydrat-Analyse eingesetzt.

Es lässt sich festhalten, dass mit dem Gradienten M10 (siehe Abb. 4-17 und Tab. 3-8) die Trennung der einzelnen Komponenten des 6er-Standard-Mixes, des OS-Mixes und des GOS-Sirups am erfolgreichsten ist und für alle weiteren Analysen eingesetzt wird.

4.1.1.3.2 LC/MS

Nach der chromatographischen Trennung der Kohlenhydratanalyten ist ein zweites Detektionssystem zur weiteren Analyse mittels LC/MS anwendbar. Dazu wurden für die LC/MS-Analysen diverser Parameter (Ionisierungshilfe der ESI, positiver vs. negativer Messmodus, spray voltage und Kapillartemperatur) optimiert. Zur Verbesserung der Elektronensprayionisierung wurden die Parameter der Ionisierungshilfe untersucht. Dazu wurden die Standards Lactose, Melezitose und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) unter verschiedenen Bedingungen (Zusammensetzung der Ionisierungshilfe, Zugabe von organischem Lösungsmittel zur Ionisierungshilfe, Konzentrationen der Ionisierungshilfe) analysiert. Bei den Untersuchungen zur Zusammensetzung der Ionisierungshilfe ist mit Seralwasser ein starkes Peaktailing der Standards sichtbar, was bei komplexen OS-Zusammensetzungen - wie in Milchproben - nicht basisliniengetrennte Analyten zur Folge hätte. Durch den Einsatz von Natriumchlorid als Ionisierungshilfe bilden sich in regelmäßigen Abständen zahlreiche NaCl-Cluster. Dabei lässt sich die Probe zum Teil nicht von den Clustern unterscheiden, wodurch eine Verwendung von Natriumchlorid als Ionisierungshilfe nicht ratsam ist. Mit Lithiumchlorid als Ionisierungshilfe ist weder ein starkes Peaktailing noch eine Clusterbildung sichtbar, weshalb in den weiteren Versuchen Lithiumchlorid als Ionisierungshilfe genutzt wurde. Durch die Zugabe von organischem Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol zur Lithiumchloridlösung ist bei der Messung des Sialinsäurestandards eine Vielzahl von Masse-Ladungs-Verhältnissen sichtbar. Im Regelfall sollte eine Standardsubstanz exakt ein Masse-Ladungs-Verhältnis aufweisen, das Rückschlüsse auf die Molekülmasse des eingesetzten Standards zulässt. Auf den Einsatz eines

organischen Lösungsmittels zur Ionisierungshilfe wird daher verzichtet. Bei dem Vergleich verschiedener Konzentrationen (0,3 mM bis 0,7 mM) an Lithiumchlorid ist eine 0,5mM-Lösung optimal, da das Peaktailing der untersuchten Standards bei dieser Konzentration am geringsten ausfiel. Für alle weiteren LC/MS-Messungen wird eine 0,5mM-LiCl-Lösung ohne Zusatz an organischem Lösungsmitteln als Ionisierungshilfe genutzt.

Neben der Ionisierungshilfe wurden diverse Parameter der MS-Messung optimiert. So erfolgte eine Gegenüberstellung der Analyse der Standards Lactose, Melezitose und N-Acetylneuraminsäure im positiven und negativen Messmodus der Massenspektrometrie. Dabei stellte sich der positive Modus auf Grund eines deutlich niedrigeren Peak-Rausch-Verhältnisses als geeigneter Messmodus heraus.

Des Weiteren wurde die spray voltage zwischen 2,5 kV und 5 kV getestet. Mit Hilfe des Lactosestandards sind nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Einstellungen der spray voltage messbar. Einzig von der Nutzung mit 2,5 kV ist abzuraten, da hierbei ein Masse-Ladungs-Verhältnis von ca. 205 Da detektiert wurde. Dies deutet auf das Vorhandensein von Monosacchariden (m/z von 205 Da = 180 Da (Monosaccharid) + 7 Da (Lithium) + 18 Da (Wasser)) hin, die beim unerwünschten Abbau von Lactose entstehen können. Für alle weiteren Versuche wird eine spray voltage von 4,0 kV gewählt.

Die Kapillartemperatur wurde zwischen 250 °C und 450 °C getestet. Bei den Messungen zwischen 250 °C und 350 °C kann keine Einwirkung auf die Signalhöhe oder auf eine eventuelle Clusterbildung festgestellt werden. Ab einer Temperatur von circa 350 °C steigt die Signalhöhe an und die Bildung von Acetataddukten - ermöglicht durch das acetathaltige Fließmittel - verringert sich. Temperaturwerte ab 425 °C sollten zur Kohlenhydratmessung nicht genutzt werden, da es sonst zur vorzeitigen Fragmentierung der Zucker kommen kann. Eine Kapillartemperatur von 400 °C - als Kompromiss zwischen steigender Signalhöhe und noch nicht eintretender Fragmentierung - wird für alle weiteren Versuche gewählt.

Mit den optimierten Parametern (Ionisierungshilfe der ESI: 0,5 mM LiCl, Messmodus: positiv, spray voltage: 4,0 kV, Kapillartemperatur: 400 °C) und den in Kapitel 3.5.2 angegebenen Parametern wurden Standardsubstanzen untersucht. Mit Hilfe der MS- und MS²-Messungen kann die Anwesenheit von drei Monosacchariden, chromatographisch gefolgt von einem Trisaccharid und zwei Disacchariden im 6er-Standard-Mix detektiert werden. Die Analyten des 6er-Standard-Mixes, bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose (aufgeführt in chromatographischer Elutionsfolge), können bestätigt

werden. In dem GOS90-Sirup können mittels LC/MS zwei Mono-, fünf Di-, vier Tri- und vier Tetrasaccharide sowie ein Pentasaccharid eindeutig detektiert werden. Die Anwesenheit der Analyten 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH, LNH, 6'-SL und 3'-SL (Strukturen, Molmassen und chemische Beschaffenheiten: siehe Tab. 2-3 in Kapitel 2.2.2.2.1) im OS-Mix wurde mittels HPAEC-PAD sowie den entsprechenden MS²-Spektren (siehe Abb. 4-19) untersucht.

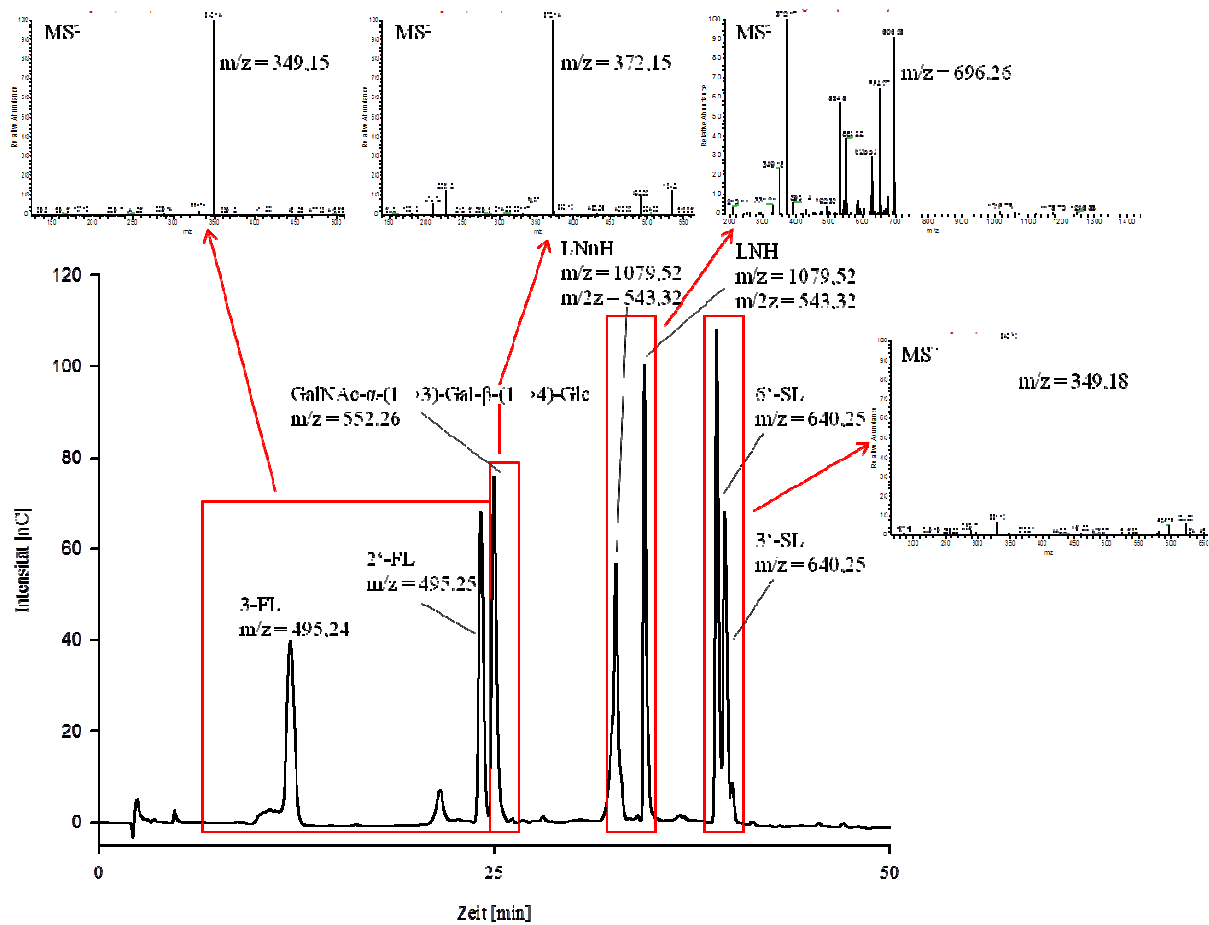


Abb. 4-19: HPAEC-Chromatogramm des OS-Mixes (bestehend aus 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH, LNH, 6'-SL und 3'-SL) sowie entsprechenden MS²-Spektren der einzelnen Analyten (gemessen als Li-Addukte)

Mit Hilfe der MS- und MS²-Messungen können im OS-Mix zwei Fucosyllactosen, ein Trisaccharid (bestehend aus zwei Monosacchariden und einem N-Acetyl-hexosamin-Monomer), zwei Hexosen (bestehend aus vier Monosacchariden und zwei N-Acetyl-hexosamin-Monomeren) und zwei Sialyllactosen identifiziert werden. Da die oben

aufgeführten Substanzen als Kernstruktur Lactose besitzen, kann im MS²-Spektrum ein Disaccharid mit der Masse von ca. 349 Da detektiert werden.

Bei dem Trisaccharid kann im MS²-Spektrum ein Fragment mit einer Masse von 372,15 Da detektiert werden, was auf eine Verbindung eines Monosaccharid mit einer N-Acetylhexosamin-Einheit hindeutet. Diese Verbindung und die Molekülmasse von 552,26 Da bestätigen die Annahme, dass das gemessene Trisaccharid aus zwei Monosacchariden und einem N-Acetylhexosamin-Monomer besteht.

Bei den beiden Hexosen können im MS-Spektrum Peaks bei 543,45 Da und 1079,52 Da detektiert werden. Der Peak bei 1079,52 Da stellt den Molekülmassenpeak dar. Der Peak bei 543,45 Da (Basispeak) deutet auf eine Masse mit doppelter Ladung ($m/2z$). Die Hexose ist demnach mit zwei Lithiummolekülen im Analytenmolekül messbar. Das MS²-Spektrum dieser Analyten weist eine Masse von 696,26 Da auf. Hierbei ist von einer Verbindung mit drei Monosacchariden und einem N-Acetylhexosamin-Monomere mit zusätzlichem Wasserverlust auszugehen. Dies bestätigt, dass die Hexose aus vier Monosacchariden und zwei N-Acetylhexosamin-Einheiten besteht.

Durch die MS-Analyse kann die Anwesenheit von zwei Fucosyllactose, einer Substanz (Hex)₂-HexNAc, zwei Substanzen mit der Struktur (Hex)₄-(HexNAc)₂ und zwei Sialyllactosen im OS-Mixes (bestehend aus 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, LNnH, LNH, 6'-SL und 3'-SL) bestätigt werden. Mit Hilfe der MS- und MS²-Spektren lassen sich einzelne Monomere der Analyten, jedoch nicht glycosidische Verknüpfungen dieser Monomere, identifizieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach erfolgreicher Optimierung der Ionisierungshilfe der ESI (0,5 mM LiCl), des Messmodus (positiv), der spray voltage (4,0 kV) und der Kapillartemperatur (400 °C) eine Bestimmung der Molekülmasse des Analyten möglich. Weiterhin ist nach Fragmentierung eine Analytik der Monomere des Analyten durchführbar.

4.1.1.4 Validierung der entwickelten Methoden

4.1.1.4.1 Validierung der HPAEC/PAD

Für die Validierung (siehe Kapitel 2.4.3) der HPAEC-PAD wurden die Standards des 6er-Standard-Mixes Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose sowie die Standards des OS-Mixes 3-FL, 2'-FL, GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, LNnH, 6'-SL

und 3'-SL direkt einzeln analysiert. LNnH kann in den Milchproben verschiedener Nutztierarten (siehe Kapitel 4.2.1) nicht identifiziert werden und wurde folglich nicht validiert. Die Analysenwerte der Validierung sind in Tab. 4-3, Tab. 4-4 und Tab. 4-5 angegeben.

Tab. 4-3: Analysenwerte für die Mess-/Methodenpräzision sowie Wiederholbarkeit der Zuckerstandards nach der Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“ zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC, n = 10 für Messpräzision, n = 6 für Methodenpräzision, je 10 mg/l)

Standard	Messpräzision		Methodenpräzision		Wiederholbarkeit	
	[mg/l]	Rel. [%]	[mg/l]	Rel. [%]	[mg/l]	Rel. [%]
Galactose	0,08	4,28	0,04	2,07	0,06	2,90
Glucose	0,11	5,41	0,04	2,03	0,06	3,25
Fructose	0,13	7,21	0,03	1,68	0,12	6,09
Melezitose	0,16	2,73	0,14	2,34	0,19	3,10
Lactose	0,12	2,91	0,09	2,19	0,12	2,90
Lactulose	0,10	2,55	0,11	2,69	0,13	3,23
3-FL	0,30	3,05	0,19	1,87	0,23	2,31
2'-FL	0,27	2,71	0,15	1,47	0,21	2,10
GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	0,22	2,21	0,17	1,73	0,21	2,13
LNnH	0,65	5,82	0,11	1,11	0,44	4,47
6'-SL	0,75	7,67	0,09	0,93	0,40	4,00
3'-SL	0,88	9,10	0,16	1,60	0,48	4,82

Tab. 4-4: Linearität der Zuckerstandards nach der Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“ zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC, Fünf-Punkt-Kalibrierung)

Standard	Anstieg der Kalibriergeraden	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden	Bestimmtheitsmaß R ²	Messbereich [mg/l]
Galactose	6,43	0,10	99,94	0,4 - 2,0
Glucose	6,79	0,09	99,98	0,4 - 2,0
Fructose	3,51	-0,09	99,92	0,4 - 2,0
Melezitose	2,87	0,23	99,98	1,2 - 6,2
Lactose	4,62	-0,02	99,97	0,8 - 4,0
Lactulose	4,23	-0,04	99,95	0,8 - 4,0
3-FL	3,63	-0,07	99,93	1,25 - 10,0
2'-FL	2,48	0,03	99,98	1,25 - 10,0
GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	6,51	0,57	99,91	1,25 - 10,0
LNnH	1,79	0,05	99,99	1,25 - 10,0
LNH	2,27	0,04	99,99	1,25 - 10,0
6'-SL	2,81	0,50	99,72	1,25 - 10,0
3'-SL	2,22	0,48	99,51	1,25 - 10,0

Tab. 4-5: Nachweis (NWG)- und Bestimmungsgrenze (BG) der Zuckerstandards nach DIN 32645 zur Validierung der HPAEC/PAD (Analytik mittels HPAEC)

Standard	NWG [mg/l]	BG [mg/l]
Gal	0,011	0,041
Glc	0,012	0,043
Fru	0,013	0,049
Mel	0,043	0,159
Lac	0,022	0,082
Lactu	0,017	0,066
3-FL	0,026	0,092
2'-FL	0,039	0,140
GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	0,022	0,078
LNnH	0,097	0,328
LNH	0,022	0,081
6'-SL	0,019	0,068
3'-SL	0,016	0,058

Die Wiederholbarkeiten der Zuckerstandards liegen zwischen 2,1 % und 6,1 % (siehe Tab. 4-3), d. h. bei einer wiederholten Messung eines Analyten darf die Abweichung des Messwerts nicht größer sein als dessen spezifische Wiederholbarkeit. Die Linearität der Standardkalibrierungen liegen stets über 99,5 % (siehe Tab. 4-4) und die Achsenabschnitte befinden sich nahe dem Nullpunkt. Die so erhaltenen Kalibriergeraden werden zur Quantifizierung der Analyten in den Milchproben genutzt. Die Nachweisgrenzen der Zuckerstandards liegen zwischen 0,011 mg/l und 0,097 mg/l (siehe Tab. 4-5), die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,041 mg/l und 0,328 mg/l (siehe Tab. 4-5). Analysenwerte, die mit ihren Gehalten oberhalb der Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze liegen, können somit qualitativ bzw. quantitativ ausgewertet werden.

4.1.1.4.2 Validierung der Milchprobenaufarbeitung (Entfettung, Proteinabtrennung und Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE)

Neben der Validierung der HPAEC-PAD (siehe Kapitel 4.1.1.4.1) wurde die Milchprobenaufarbeitung analysiert. Für diese Validierung wurde Kuhmilch entfettet, Proteine weitgehend entfernt und die Oligosaccharide (GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL) mittels GCC-SPE aufgearbeitet (siehe Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Analysenwerte für die Mess-/Methodenpräzisionen sowie Wiederholbarkeiten der Zuckeranalyten einer entfetteten, weitgehend proteinfreien, OS-aufgereinigten zur Validierung der Milchprobenaufarbeitung (mittels GCC-SPE) Kuhmilch nach Definition der „Leitlinie zur Methodvalidierung“, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Analytik mittels HPAEC, n = 10 für Messpräzision, n = 6 für Methodenpräzision)

Standard	Messpräzision		Methodenpräzision		Wiederholbarkeit	
	[mg/l]	Rel. [%]	[mg/l]	Rel. [%]	[mg/l]	Rel. [%]
GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	0,40	2,67	0,40	2,41	0,44	2,68
6'-SL	0,20	2,80	0,07	1,83	0,20	5,21
3'-SL	1,15	4,00	0,41	1,97	1,15	5,52

Die Wiederholbarkeiten der Milchprobenaufarbeitung liegen zwischen 2,68 % und 5,52 % (siehe Tab. 4-6). Diese Werte befinden sich in einem ähnlichen Bereich wie die Validierungswerte der Standardsubstanzen für die HPAEC-PAD (2,1 % bis 6,1 %). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Analysenfehler von HPAEC-PAD und Milchprobenaufarbeitung gering sind.

4.1.1.4.3 Validierung der Carrez-Fällung

Eine weitere Probenaufarbeitungsmethode stellt die Carrez-Fällung dar. Diese wird v. a. eingesetzt, um die enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (siehe Kapitel 4.3) mittels HPAEC-PAD untersuchen zu können. Auf Grund des - im Vergleich zu Milchproben - besseren Lactose-Oligosaccharid-Verhältnisses der GOS-haltigen Lösungen (ca. 1:1) ist keine weitere Trennung zwischen Lactose und Oligosacchariden mittels GCC-SPE nötig. Die nach der GOS-Synthese inaktiven Enzyme und evtl. vorhandenen Restproteine aus der ursprünglichen Milchmatrix werden durch die Carrez-Fällung entfernt. Die Daten der Methodenpräzision für die Carrez-Fällung sind in Tab. 4-7 dargestellt. Die Quantifizierung der Analyten Galactose, Glucose und Lactose erfolgte mittels externen Standardkalibrierungen. Analyten bei denen keine externen Standards verfügbar sind, wurden anhand ihrer Peakfläche im Chromatogramm ausgewertet.

Tab. 4-7: Analysenwerte für die Methodenpräzision der Zuckeranalyten einer enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösung zur Validierung der Carrez-Fällung (chromatographische Reihenfolge, β -Galactosidase aus *K. lactis*, Lactozym, T = 40 °C, pH 7, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose), Quantifizierung mittels externer OS-Standards oder Auswertung anhand der Peakflächen im HPAEC-Chromatogramm, Analytik mittels HPAEC, n = 6

Standard	Methodenpräzision		
	[g/100ml]	[nC*min]	Rel. [%]
Galactose	0,05		0,70
Glucose	0,09		0,73
Disaccharid (14,9 min)		0,13	2,47
Disaccharid (18,9 min)		0,18	1,71
Lactose	0,21		2,65
Trisaccharid (23,5 min)		0,52	3,80
Disaccharid (27,4 min)		0,02	0,73

Die Methodenpräzision der Carrez-Fällung liegt zwischen 0,70 % und 3,80 % (siehe Tab. 4-7) und damit in ähnlichen Bereichen wie die Methodenpräzision der Milchprobenaufarbeitung (1,83 % bis 2,41 %) und der HPAEC-PAD (0,93 % bis 2,69 %). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die Carrez-Fällung keine signifikanten Messfehler in das System eingebracht werden.

4.1.2 Entwicklung von Schnellmethoden zur Analyse von milcheigenen Oligosacchariden

4.1.2.1 Photometrischer Test zur Bestimmung der neutralen Zuckerverbindungen (Resorcinol-Schwefelsäure-Test)

Mit Hilfe des Resorcinol-Schwefelsäure-Tests können neutrale Zuckerverbindungen detektiert werden. Neben Monosacchariden und Disacchariden sind mit diesem Test neutrale Oligosaccharide detektierbar.

Saure Zuckerverbindungen wie N-Acetylneuraminsäure zeigen bis zu einer Konzentration von 3,7 g/100ml keine positive Reaktion. Die gewählte Konzentration übersteigt den Gehalt an N-Acetylneuraminsäure und 3'-SL bzw. 6'-SL in Milch (siehe Tab. 6-2 im Anhang) deutlich, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die sauren MOS in den Milchproben keine positiven Reaktionen hervorrufen würden.

Zur Optimierung des photometrischen Tests wurde ein Wellenlängenscan (siehe Abb. 4-20) mit einem Lactosestandard, der mit Hilfe des Resorcinol-Schwefelsäure-Tests aufgearbeitet wurde, durchgeführt.

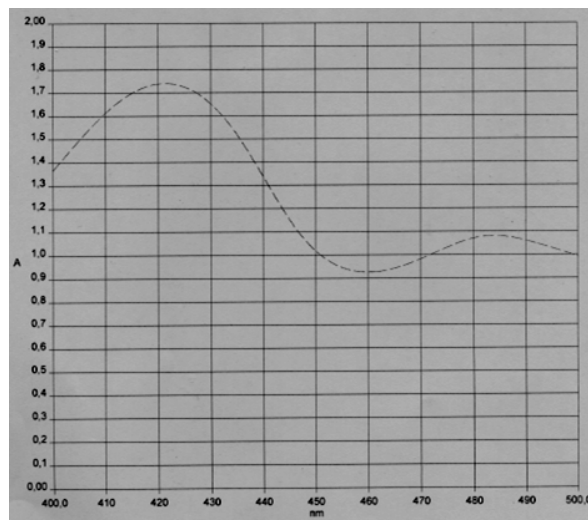


Abb. 4-20: Photometrischer Wellenlängenscan eines Lactosestandards nach Reaktion im Resorcinol-Schwefelsäure-Test (A = Extinktion, nm = Einheit der Wellenlänge)

Das Extinktionsmaximum des Schnelltestes liegt zwischen 420 nm und 430 nm. In Anlehnung an Monsigny et al. [1988] wird für alle weiteren Versuche eine Wellenlänge von 430 nm genutzt.

Die Kalibrierung (siehe Abb. 4-21) erfolgte mit Lactose-Monohydrat, da dies der höchstkonzentrierte, neutrale Zucker in Milch ist und der Schnelltest v. a. auf die Messung von Lactose ausgelegt ist.

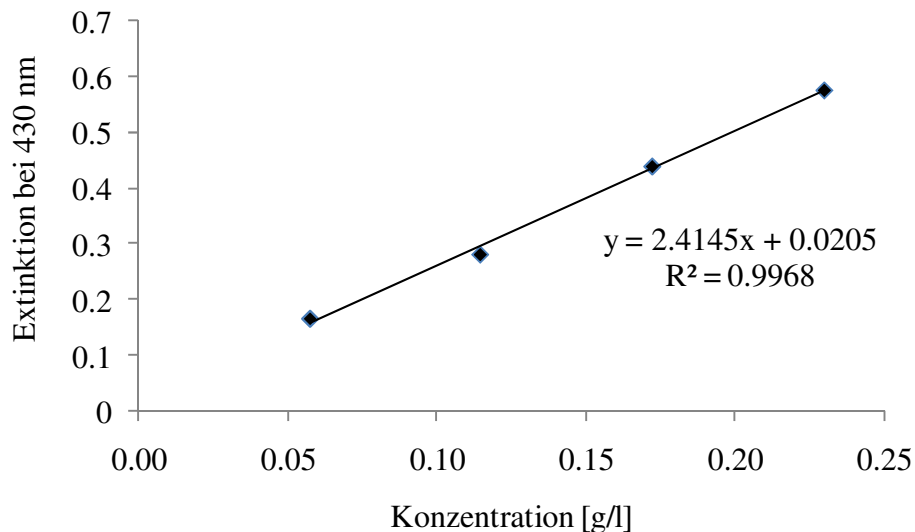


Abb. 4-21: Kalibriergerade des Resorcinol-Schwefelsäure-Tests mit Lactose-Monohydrat

Die Kalibrierung erfolgt in einem Bereich von 0,06 g/l bis 0,23 g/l Lactose und verläuft linear. Die Gerade weist ein Bestimmtheitsmaß von 99,7 % auf und schneidet die x-Achse nahe dem Nullpunkt ($n = 0,0205$) (siehe Abb. 4-21). Die Kalibriergerade ist somit zum Auswerten neutraler Zuckeranalyten geeignet. Um eine fehlerfreie Auswertung sicherzustellen, sollte sich der Analysenwert der Probe innerhalb der Kalibrierung befinden.

In Vorversuchen wurden Lactose- und Glucoselösungen gemessen, um deren Wiederfindung - berechnet mit der Lactose-Kalibrierung - zu überprüfen. Die Wiederfindung von Lactose bzw. Glucose lag bei 97,9 % bzw. 99,6 %. In einem nächsten Schritt wurde die Wiederfindung der Lactose nach Standardaddition in verschiedenen Tiermilchproben getestet. In Kuh-, Stuten- und Humanmilch konnten 98,5 % bis 110,4 % der zugesetzten Lactose wiedergefunden werden. Die Standardadditionen von GOS90 zu Kuhmilch in den Verhältnissen 0,25:1 bis 3:1 ergaben Wiederfindungsraten des GOS90 von 92,9 % bis 103,9 %. Es scheint somit zu keinen Verlusten der Analyten während der Reaktion im Resorcinol-Schwefelsäure-Test zu kommen.

Mit Hilfe von Kuhmilch wurden Messpräzision, Methodenpräzision und Wiederholbarkeit (siehe Kapitel 2.4.3) der Methode bestimmt. Die Messpräzision beträgt 0,52 g/100ml

bzw. 9,98 %, die Methodenpräzision 0,22 g/100ml bzw. 6,09 % und die Wiederholbarkeit 0,42 g/100ml bzw. 11,47 %. Im Vergleich zu den Validierungsdaten der Lactose mittels HPAEC-PAD (siehe Tab. 4-3) sind diese Validierungsdaten um das drei- bis fünffache höher. Die Analyse mit dem Resorcinol-Schwefelsäure-Test ist somit weniger zeitaufwendig, aber im Vergleich zur Analyse mittels HPAEC-PAD ungenauer. Der photometrische Schnelltest ist für eine erste Beurteilung der Analyten dennoch hinreichend genau.

Die mittels Resorcinol-Schwefelsäure-Test berechneten Lactosekonzentrationen verschiedener Nutztierarten wurden mit den Analysendaten der HPAEC-PAD (siehe Tab. 4-8) verglichen.

Tab. 4-8: Lactosekonzentration verschiedener Nutztierarten nach Bestimmung mittels Resorcinol-Schwefelsäure-Test (n = 4) oder HPAEC-PAD (n = 3, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Milchprobe	Resorcinol-Schwefelsäure-Test	HPAEC-PAD
Kuhmilch	(4,96 ± 0,59) g/100g VarK = 11,85 %	(4,64 ± 0,08) g/100g VarK = 1,72 %
Stutenmilch	(7,48 ± 0,23) g/100g VarK = 3,13 %	(6,84 ± 0,01) g/100g VarK = 0,12 %
Ziegenmilch	(3,88 ± 0,66) g/100g VarK = 17,08 %	(3,75 ± 0,16) g/100g VarK = 4,16 %
Humanmilch	(7,34 ± 0,40) g/100g VarK = 5,41 %	(5,92 ± 0,05) g/100g VarK = 0,76 %

Die Analysenwerte für Lactose der beiden Methoden sind gut miteinander vergleichbar. Auf Grund der höheren Genauigkeit der HPAEC-PAD sind im Vergleich zum Schnelltest geringere Standardabweichungen und Variationskoeffizienten messbar (siehe Tab. 4-8). Trotz der höheren Varianz des Schnelltests sind die Messergebnisse verwertbar.

Der Resorcinol-Schwefelsäure-Test stellt somit eine einfache und zeitsparende Methode zur ersten Beurteilung der neutralen Zuckeranalyten dar.

4.1.2.2 Photometrische Tests zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen (Perjodat-Resorcinol-Test und Resorcinol-Salzsäure-Test)

Sialinsäurehaltigen Zucker, d.h. die Kohlenhydrate, die entweder N-Acetylneuraminsäure oder N-Glycolylneuraminsäure beinhalten, können mit Hilfe des Perjodat-Resorcinol- oder des Resorcinol-Salzsäure-Tests bestimmt werden. Dabei werden im Fall des Perjodat-Resorcinol-Tests die sialinsäurehaltigen Verbindungen mittels Perjodat oxidiert [Jourdian et al., 1971]. Anschließend erfolgt bei beiden Testsystemen durch die Zugabe von Resorcinol und nachfolgender Erhitzung der entstandenen Mischung eine Farbreaktion. Durch Butylalkohol kann die Farbreaktion intensiviert werden [[Jourdian et al., 1971] und [Svennerholm, 1957]]. Vor der Farbreaktion muss bei der Untersuchung von Milchproben die überschüssige Lactose von den sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen getrennt werden. Die Anwendung der Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex[®] oder der GCC-SPE ist nicht möglich, da nach der Aufarbeitung nicht genügend Probevolumen für den photometrischen Test zur Verfügung steht. Aus diesem Grund soll eine Lactoseabtrennung durch einen Ionenaustauscher, gefüllt mit Dowex-Material, entwickelt werden.

Die sialinsäurehaltigen Verbindungen zeigen eine Blaufärbung nach den Reaktionen des Schnelltests. Lactose weist hingegen eine Rotfärbung auf und kann als Negativkontrolle mitgeführt werden. Für den Schnelltest wird N-Acetylneuraminsäure als Kalibrierstandard genutzt, da dieser kommerziell erhältlich ist. Auf eine Kalibrierung mit 3'-SL oder 6'-SL wird aus Wirtschaftlichkeitsgründen verzichtet.

In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass der Einsatz des Butylalkohols notwendig ist, damit die blaue Reaktionsfarbe intensiviert und stabilisiert wird. Bei Versuchen ohne Alkoholzusatz ist eine Abnahme der Extinktion um 22,3 % innerhalb von 120 min sichtbar. Durch den Zusatz des Alkohols bleibt die Extinktion über 120 min stabil. Außerdem kann unter Verwendung von Alkohol eine um 25,2 % erhöhte Extinktion gemessen werden. Dies ist v. a. bei Proben mit einer geringen Konzentration an sialinsäurehaltigen Verbindungen vorteilhaft. Da der Einsatz des Butylalkohols unumgänglich ist, muss der Test mit Hilfe eines Photometers durchgeführt werden. Die Messung mittels ELISA-Reader ist nicht möglich, da kein ausreichendes Schütteln der Proben nach Alkoholzusatz in den 96Well-Platten möglich ist.

In einem weiteren Vorversuch wurde untersucht, ob unbehandelte Rohmilch oder entfettete und weitgehend proteinfreie Rohmilch als Ausgangsmaterial vorzuziehen ist. Bei der

Analyse der unbehandelten Rohmilch treten deutliche Schwankungen der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen auf, was unter Umständen auf eine Störung der Analytik durch die Anwesenheit der Fette und Proteine zurückzuführen ist. Dagegen sind nur geringere Schwankungen bei der Analytik der entfetteten und weitgehend proteinfreien Rohmilch feststellbar. In den nachfolgenden Messungen werden somit entfettete und weitgehend proteinfreie Proben analysiert.

Nach den Vorversuchen wurden die Testsysteme nach Jourdian et al. [1971] - Perjodat-Resorcinol-Test - und nach Svennerholm [1957] - Resorcinol-Salzsäure-Test - gegenübergestellt. Im Gegensatz zum Resorcinol-Salzsäure-Test wurden beim Perjodat-Resorcinol-Test die sialinsäurehaltigen Verbindungen vor der Resorcinol-Reaktion mit Perjodat oxidiert. Die Messung erfolgte gegen 630 nm beim Perjodat-Resorcinol-Test und gegen 450 nm beim Resorcinol-Salzsäure-Test. Die Kalibrierung erfolgte bei beiden Messsystemen mit N-Acetylneuraminsäure. Ein Bestimmtheitsmaß von 99,1 % und ein Achsenabschnitt von 0,04 wurden mit dem Perjodat-Resorcinol-Test ermittelt. Beim Resorcinol-Salzsäure-Test lagen das Bestimmtheitsmaß bei 99,0 % und der Achsenabschnitt bei 0,24. Der Achsenabschnitt der Kalibriergerade des Perjodat-Resorcinol-Tests kommt dem Nullpunkt nahe, wodurch diese Kalibriergerade zum Auswerten von Analyten geeignet ist. Die Kalibriergerade des Resorcinol-Salzsäure-Tests hat dagegen leicht erhöhte Werte des Achsenabschnitts aufzuweisen, was die Genauigkeit einer Auswertung mit diesem Messsystem beeinträchtigen könnte. Die Auswertung eines externen N-Acetylneuraminsäurestandards ergab eine Wiederfindung von 98,6 % für den Perjodat-Resorcinol-Test und von 103,6 % für den Resorcinol-Salzsäure-Test. Außerdem wurde die N-Acetylneuraminsäure-Wiederfindung für eine 1+1-Mischung aus N-Acetylneuraminsäure und Lactose beider Testsysteme ermittelt. Mit Hilfe des Perjodat-Resorcinol-Testes konnte eine Wiederfindung zu $(89,9 \pm 8,2) \%$ mit einem Variationskoeffizienten von 9,12 % bestimmt werden. Der Resorcinol-Salzsäure-Test wies eine N-Acetylneuraminsäure-Wiederfindung des Gemisches von $(100,96 \pm 28,63) \%$ auf. Die Werte des Resorcinol-Salzsäure-Tests schwankten zwischen 80,7 % und 121,2 % und wiesen einen Variationskoeffizienten von 28,4 % auf. Somit scheint dieses Messsystem bei der Anwesenheit von Lactose deutlich ungenauer zu sein. Die Anwesenheit einer geringen Menge an Lactose in den Milchproben ist nach der Abtrennung mittels Ionenaustauscher nicht zu verhindern. Da die Gehalte an sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen in den Milchproben sehr gering sind (siehe Anhang Tab. 6-2), wird durch eine minimale Anwesenheit von

Lactose das Verhältnis 1+1 schnell erreicht. Der Resorcinol-Salzsäure-Test ist somit für eine Analyse der sialinsäurehaltigen Zucker in Milchproben ungeeignet. Auf Grund der geringeren Empfindlichkeit des Perjodat-Resorcinol-Testes gegenüber Lactose wird dieses Messsystem für weitere Analysen genutzt.

Anhand eines Wellenlängenscans (siehe Abb. 4-22) des N-Acetylneuraminsäurestandards nach der Reaktion im Perjodat-Resorcinol-Test wurde die optimale Wellenlänge des Messsystems bestimmt.

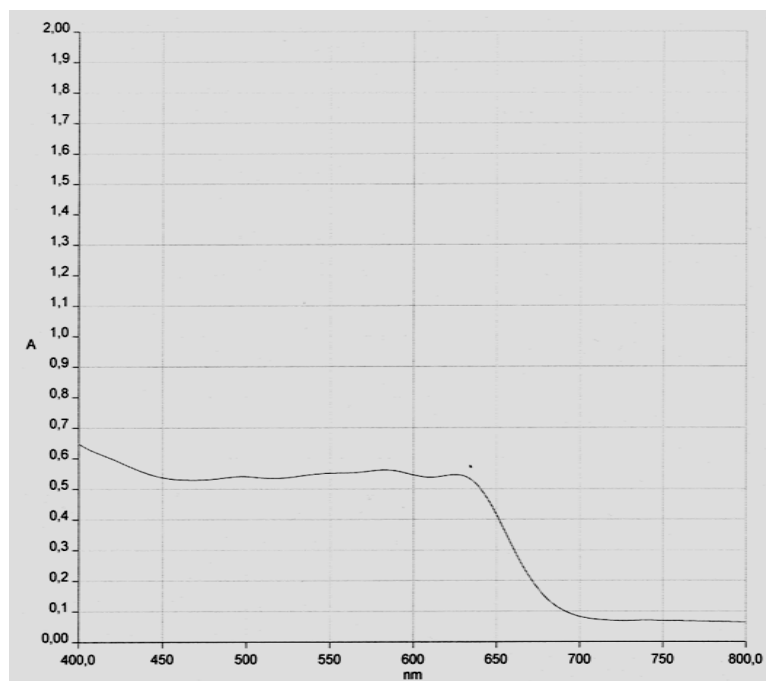


Abb. 4-22: Photometrischer Wellenlängenscan eines N-Acetylneuraminsäurestandards nach Reaktion im Perjodat-Resorcinol-Tests (A = Extinktion)

Da das Wellenlängenmaximum zwischen 450 nm und ca. 630 nm liegt, wird in Anlehnung an Jourdan et al. [1971] eine Wellenlänge von 630 nm für weitere Analysen genutzt.

Für den Perjodat-Resorcinol-Test wurde die Linearität der N-Acetylneuraminsäure-Kalibriergeraden (siehe Abb. 4-23) geprüft. Dies erfolgte mit einer reinen Standardlösung und nach Aufreinigung des Standards mit Hilfe eines Ionenaustauschers. Die Ionenaustauscher-Aufreinigung ist zwingend notwendig, um die sialinsäurehaltigen Zucker von der Lactose abzutrennen. Für die Aufarbeitung mittels Ionenaustauscher wurde eine 4,5%ige Lactose-Monohydrat-Lösung als Matrix für den Standard N-Acetylneuraminsäure verwendet.

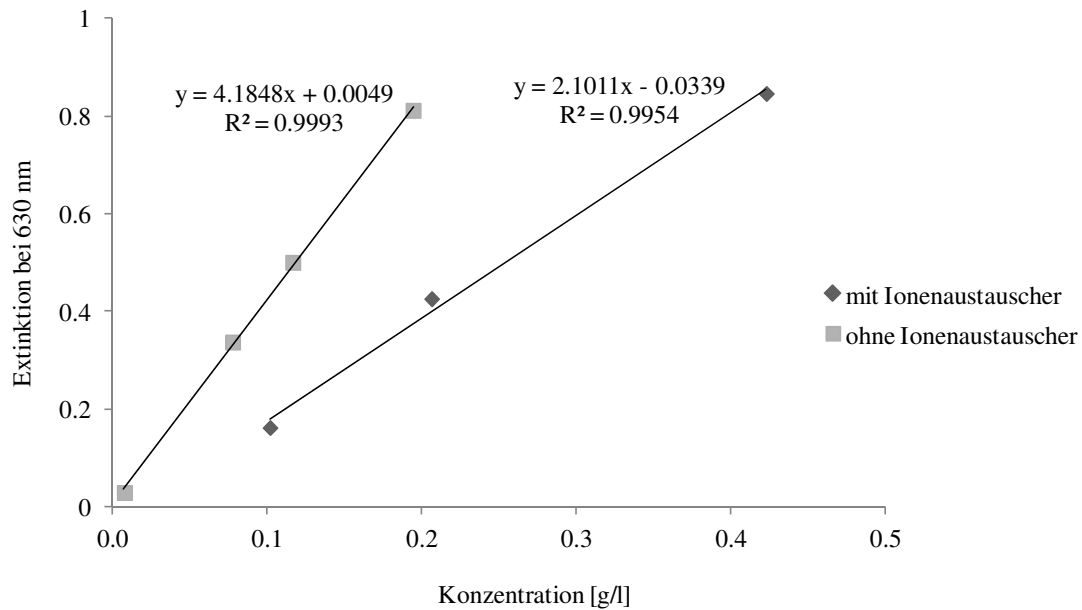


Abb. 4-23: Kalibriergerade des Perjodat-Resorcinol-Tests mit N-Acetylneuraminsäure als reine Standardlösung (ohne Ionenaustauscher) und nach Aufreinigung des Standards mit Hilfe des Ionenaustauschers (4,5 % Lactose-Monohydrat als Matrix)

Anhand der beiden Kalibriergeraden wird deutlich, dass es unter Verwendung des Ionenaustauschers zu Verlusten an N-Acetylneuraminsäure und damit auch an sialinsäurehaltigen OS-Verbindungen während der Probenaufarbeitung kommt. Dieser Verlust an Analyten ist jedoch konstant, da die Kalibriergerade ein Bestimmtheitsmaß von 99,54 % und einen Achsenabschnitt von -0,0339 besitzt. Die Kalibriergerade der reinen Standardlösung - ohne Aufarbeitung mittels Ionenaustauscher - weist ein Bestimmtheitsmaß von 99,93 % und einen Achsenabschnitt von 0,0049 auf (siehe Abb. 4-23). Beim Vergleich der Anstiege der beiden Kalibriergeraden wird ein Verlust von 49,8 % der N-Acetylneuraminsäure durch den Ionenaustauscher deutlich.

Die Eluation der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen vom Ionenaustauscher erfolgte mit 20 ml 0,1 N Ameisensäure nach der Eluation der Mono- und Disaccharide mit 20 ml Wasser. Anhand eines reinen N-Acetylneuraminsäurestandards wurde sichergestellt, dass keine Analyten in der Eluation mit Wasser vorhanden waren. Anschließend wurde der Eluationsschritt zur Gewinnung der sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen wiederholt. Dabei konnten keine weiteren sialinsäurehaltigen Kohlenhydrate detektiert werden. Daher scheint ein Eluationsvolumen von 20 ml Ameisensäure ausreichend. Wie bei der Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex[®] (siehe Kapitel 4.1.1.2.1) und der

Festphasenextraktion an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.1.1.2.3) können nur ca. 50 % der sialinsäurehaltigen Zucker wiedergefunden werden.

Auf Grund der stabilen Kalibriergeraden kann das Testsystem mit Ionenaustauscher dennoch zur Auswertung der sialinsäurehaltigen Kohlenhydratanalyten genutzt werden. Da dieses Testsystem v. a. für das Membranscreening bei der Nanofiltration (siehe Kapitel 4.4.1) eingesetzt werden soll, wurden die entsprechenden Matrizen mit N-Acetylneuraminsäure aufgestockt und deren Einfluss auf den Perjodat-Resorcinol-Test (siehe Abb. 4-24) untersucht.

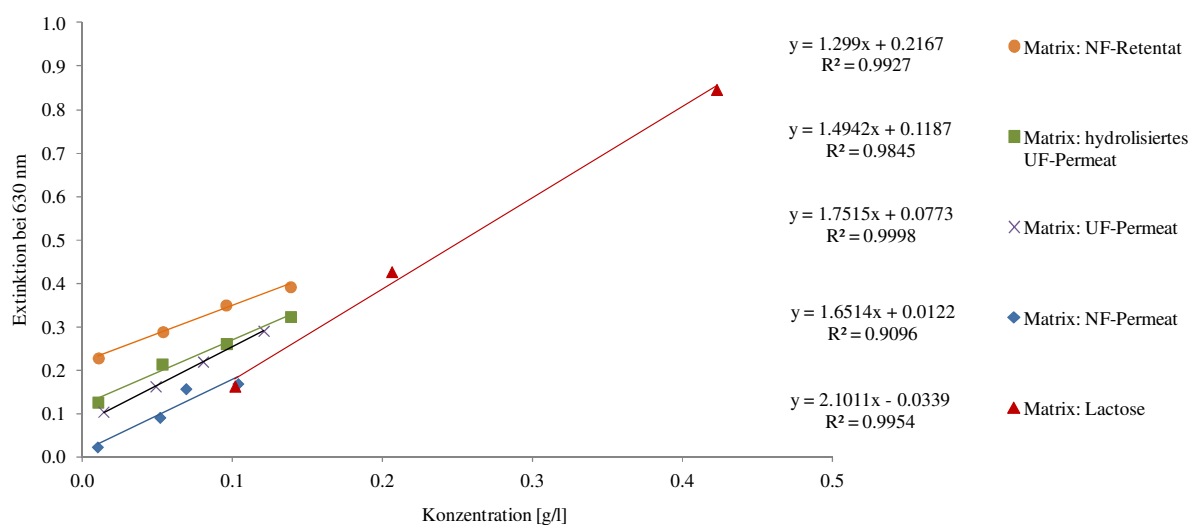


Abb. 4-24: N-Acetylneuraminsäure-Kalibriergerade des Perjodat-Resorcinol-Tests in verschiedenen Matrizen (Matrizen: UF-Permeat = entfettete und weitgehende proteinfreie Kuhmilch, hydrolysiertes UF-Permeat = mit β -Galactosidase hydrolysiertes UF-Permeat (Lactoseabbau), NF-Retentat = Retentat der Nanofiltration von hydrolysiertem UF-Permeat, NF-Permeat = Permeat der Nanofiltration von hydrolysiertem UF-Permeat)

Die Kalibriergeraden weisen Bestimmtheitsgrade zwischen 91,0 % und 99,9 % auf, was auf eine stabile Kalibrierung der aufgestockten N-Acetylneuraminsäure in den Matrizen deutet. Auffallend sind die unterschiedlichen Achsenabschnitte der Kalibrierungen (siehe Abb. 4-24). Dies liegt in den verschiedenen Gehalten an sialinsäurehaltigen Zuckerverbindungen der einzelnen, nicht aufgestockten Matrizen begründet. Der höchste Achsenabschnitt von 0,22 konnte bei dem NF-Retentat und der niedrigste - abgesehen von der Lactosematrix - mit 0,01

bei dem NF- Permeat detektiert werden. Diese Proben wurden nach der Nanofiltration von entfetteter, weitgehend proteinfreier und mit β -Galactosidase zum Lactoseabbau hydrolysiertes Kuhmilch auf der Retentatseite bzw. Permeatseite der Nanofiltration entnommen. Bei einer erfolgreichen Nanofiltration sollten MOS auf der Retentatseite aufgereinigt und auf der Permeatseite reduziert werden (siehe Kapitel 4.4.1). Im Vergleich zu den Proben ohne Nanofiltrationsbehandlung (UF-Permeat) erhöht sich der Achsenabschnitt im NF-Retentat und verringert sich im NF-Permeat. Im NF-Permeat sind somit kaum sialinsäurehaltige Verbindungen enthalten, da der Achsenabschnitt nahe dem Nullpunkt liegt. Aus diesem Grund stimmt die Kalibrierung der NF-Permeat-Matrix am besten mit der Kalibrierung der Lactose-Matrix überein. Die beiden Matrizen UF-Permeat und hydrolysiertes UF-Permeat zeigen ähnliche Achsenabschnitte, da sich bei beiden Proben der Gehalt der MOS und damit auch der Gehalt der sialinsäurehaltigen Verbindungen durch die Enzymbehandlung nur geringfügig ändert (siehe Kapitel 4.3.4). Die verschiedenen Achsenabschnitte sind somit durch die unterschiedlichen Gehalte an sialinsäurehaltigen Analyten der jeweiligen Matrix erklärbar.

Mit Hilfe der Anstiege der Kalibriergeraden kann im Vergleich zum Anstieg der Kalibriergeraden des reinen N-Acetylneuraminsäurestandards (ohne Ionenaustauscher) der etwaige Verlust der Analyten geschätzt werden. Die Wiederfindung von N-Acetylneuraminsäure in der Matrix Lactose-Monohydrat lag bei 50,2 %. Die anderen Matrizen zeigten Wiederfindungen zwischen 31,0 % und 41,9 %. Der Gehalt an sialinsäurehaltigen Analyten ist somit in einem bestimmten Grad von der untersuchten Matrix abhängig. Da für die Nanofiltration v. a. die Analyten der Matrizen NF-Retentat, NF-Permeat, hydrolysiertes UF-Permeat und UF-Permeat gegenübergestellt werden, liegt die Schwankungsbreite bei nur zehn Prozentpunkten. Der Einsatz dieses photometrischen Schnelltests für das Membranscreening der Nanofiltrationsversuche ist daher möglich. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wird ausschließlich die Kalibrierung des reinen N-Acetylneuraminsäurestandards - ohne vorherige Aufarbeitung mittels Ionenaustauschers - zur Berechnung der Gehalte an sialinsäurehaltigen Kohlenhydraten herangezogen.

Um eine Reaktion anderer Milchbestandteile in dem Perjodat-Resorcinol-Test auszuschließen, wurden die Substanzen Riboflavin, Adenosin und Adenosin-Monophosphat getestet. Bei Konzentrationen von 0,45 mg/l bis 90 mg/l Riboflavin, 0,5 mg/l bis 500 mg/l Adenosin und 0,5 mg/l bis 500 mg/l Adenosin-Monophosphat kann kein Einfluss im

photometrischen Test nachgewiesen werden. Die gemessenen Konzentrationen liegen deutlich über den Analysenwerten der Substanzen in Kuhmilch (siehe Souci et al. [2008]).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Perjodat-Resorcinol-Test als photometrischer Test zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Kohlenhydratverbindungen, v. a. im Bereich der Nanofiltration, einsetzbar ist. Vergleichswerte zwischen diesem Schnelltest und Analysenwerte der HPAEC-PAD werden im Kapitel 4.4.1.4 aufgeführt.

Im Kapitel 4.1 konnte eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Oligosaccharide entwickelt werden. Die Probenvorbereitung umfasst dabei folgende Schritte: Entfettung, Proteinentfernung durch Membranfiltration und Lactoseabtrennung durch GCC-SPE. Die chromatographische und massenspektrometrische Analyse erfolgt mittels HPAEC-PAD/IT-MS. Des Weiteren wurden verschiedene photometrische Schnelltests zur Abschätzung der Gehalte an neutralen (Resorcinol-Schwefelsäure-Test) und saure Oligosaccharide (Perjodat-Resorcinol-Test) entwickelt.

4.2 Identifizierung und Quantifizierung von milcheigenen Oligosacchariden in Milchproben verschiedener Nutztierarten und in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie

4.2.1 Milcheigene Oligosaccharide in Milchproben verschiedener Nutztierarten

Die in Kapitel 4.1 entwickelte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden wird im Folgendem zur Analyse von Milchproben verschiedener Nutztierarten verwendet.

Die Milchproben wurden durch Zentrifugation in der Kälte entfettet, Proteine durch eine 5 kDa-Ultrafiltration abgetrennt (nachfolgend UF-Magermilchpermeat genannt) und die Lactose mittels GCC-SPE entfernt. Die Oligosaccharide konnten mittels HPAEC-PAD/IT-MS analysiert werden. Die GCC-SPE-Optimierung erfolgte ausschließlich mit Proben aus Kuhmilch (siehe Kapitel 4.1.1.2.3). Dabei konnten Oligosaccharide, die nicht in Kuhmilch, sondern in anderen Milchproben vorkommen, nicht einbezogen werden. Diese Oligosaccharide könnten durch die GCC-SPE-Aufarbeitung verloren gehen. Da Kuhmilch für diese Arbeit von besondere Bedeutung ist (siehe Kapitel 4.4, 4.5 und 4.6), wurde die GCC-SPE-Optimierung mit dieser Ausgangsprobe durchgeführt.

In diesem Kapitel wurden Proben von Kuh-, Stuten-, Ziegen-, Schafs-, Kamel- und Humanmilch untersucht. Unterschiedliche Zeitpunkte der Probenahme (z. B. Morgengemelk vs. Abendgemelk) ermöglichten Untersuchungen der biologischen Varianz der jeweiligen Nutztierart.

Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte mittels LC/MS durch die Detektion von Lithiumaddukten $[M+Li]^+$. Mit der angewandten LC/MS-Methode können ohne Derivatisierung der Zucker die Molmassen der Kohlenhydrate, jedoch nicht die glycosidischen Verknüpfungen der einzelnen Zuckermonomere detektiert werden. Auf diese Weise können zwei Analyten, die zwei Peaks in dem HPAEC-Chromatogramm entsprechen, Substanzen mit derselben Molekülmasse zugeordnet werden. Diese beiden Peaks besitzen demnach die gleiche Molmasse, aber unterschiedliche glycosidische Verknüpfungen der einzelnen Zuckermonomere. Zum Beispiel weisen die milcheigenen Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL mit Retentionszeiten im HPAEC-Chromatogramm von 38,9 min und 39,4 min die gleiche Molekülmasse von ca. 640 Da auf. Durch externe Standards kann eine Identifizierung der Isomere als 3'-SL und 6'-SL anhand der Retentionszeiten erfolgen. Analog dazu verhalten sich die Zuckerkomponenten mit einer Molmasse von ca. 511 Da. Nach LC/MS-Analyse

handelt es sich um Kohlenhydratverbindungen, die aus drei Hexosen (mit je einer Molmasse von ca. 187 Da) bestehen. Eine exakte Identifizierung der glycosidischen Verknüpfungen oder der Identität des Monomers (Galactose oder Glucose) ist auf Grund des Fehlens von externen Standards nicht möglich. Denkbar sind die Verbindungen 3'-GL (3'-Galactosyllactose, Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc)), 4'-GL (4'-Galactosyllactose, Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc)) und 6'-GL (6'-Galactosyllactose, Gal- β -(1 \rightarrow 6)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc)). Durch verschiedene LC/MS-Fragmentierungen könnten im MS³ und MS⁴ Hinweise auf die glycosidischen Verknüpfungen (β 1 \rightarrow 3 vs. β 1 \rightarrow 4 vs. β 1 \rightarrow 6) einer Substanz gewonnen werden. Dies kann durch die Abspaltung von Wasser (im Falle von β 1 \rightarrow 3- und β 1 \rightarrow 6-Verknüpfungen) oder Monomeren (bei β 1 \rightarrow 4-OS) während der Fragmentierung erreicht werden. Mit Hilfe der Fragmentierungen im MS² - wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt - ist die Unterscheidung der glycosidischen Verknüpfung jedoch nicht sichtbar. Durch die Fragmentierung im MS² ist eine Differenzierung zwischen linearen und verzweigten Strukturen bei höhermolekularen Substanzen möglich. Am Beispiel von paraLNH (lineare Verbindung) und LNH (verzweigte Verbindung) ist im MS² das Fragment Gal-Glc mit einer Molekülmasse von ca. 349 Da nur bei paraLNH detektierbar. Dies liegt darin begründet, dass nur im paraLNH das Fragment Gal-Glc an einem freien Zuckerende vorliegt. Durch die LC/MS-Analysen können somit v. a. Molmassen der Ausgangssubstanzen sowie der nach MS² erhaltenen Fragmente identifiziert werden. Eine weitere Absicherung der identifizierten Analyten erfolgte mit Hilfe des Vergleichs der Retentionszeiten mit externen Standards. Dabei können die glycosidischen Verknüpfungen der Analyten näher bestimmt werden und eine Quantifizierung erfolgen. Folgende Oligosaccharidstandards können zur weiteren Identifizierung und Quantifizierung der MOS in den Tiermilchproben genutzt werden: GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNH, LNnH, 2'-FL, 3-FL, 3'-SL und 6'-SL.

4.2.1.1 Identifizierung der MOS in Milchproben verschiedener Nutztierarten

In **Kuhmilch** sind nach LC/MS-Analyse die Oligosaccharide GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL, 6'-SL, SGL (Sialylgalactosyllactose), drei Isomere an (Hex)₃ und Spuren von Hex-Neu5Ac (siehe Abb. 4-25) identifizierbar. Die Analyten GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL wurden durch den Retentionszeitenvergleich mit Standardsubstanzen bestätigt.

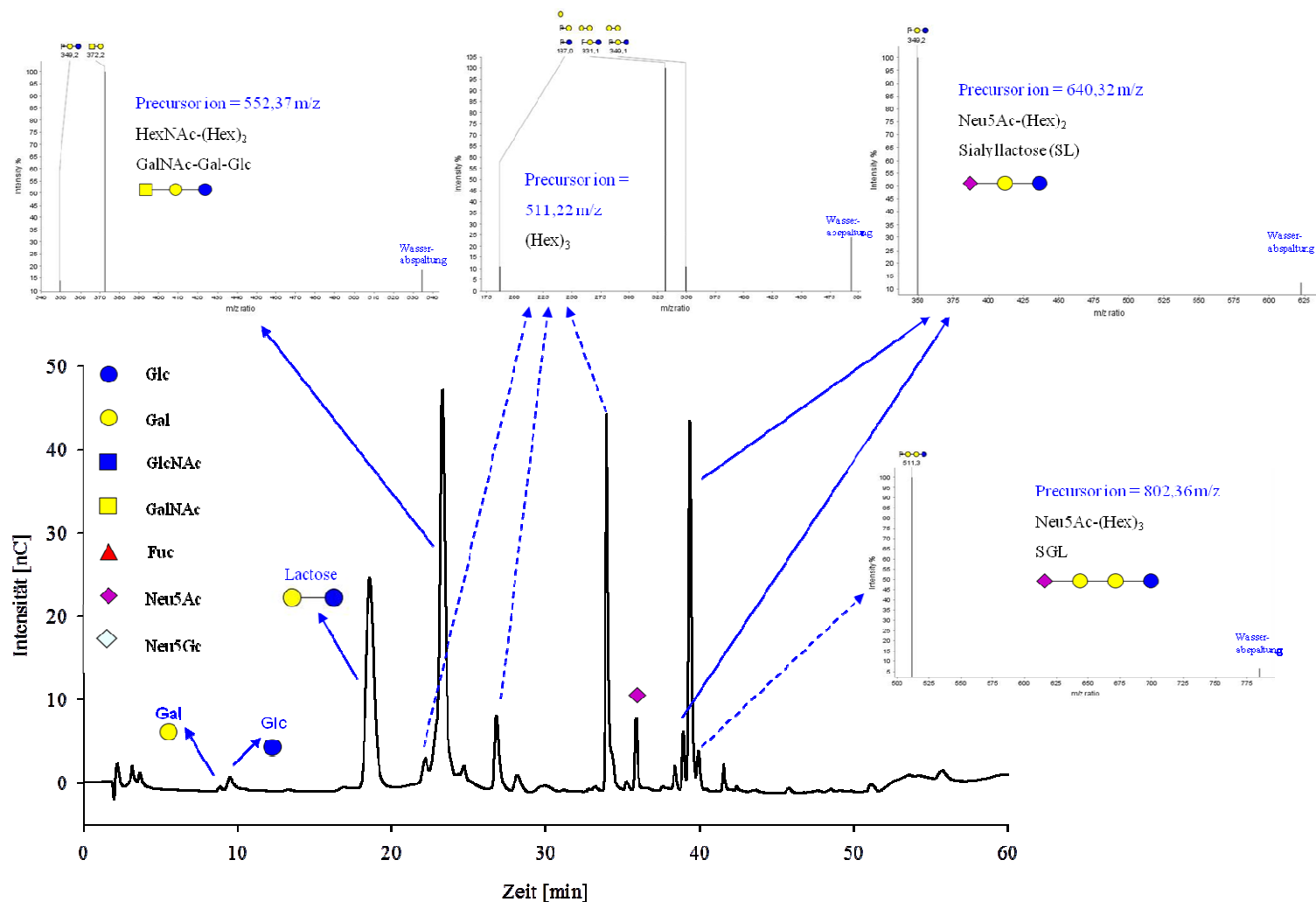


Abb. 4-25: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Kuhmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

In Forschungsstudien konnten bisher 62 Oligosaccharide in Kuhmilch, -molke und -kolostrum identifiziert, sechs davon quantifiziert werden (siehe Tab. 6-2 im Anhang). Höhermolekulare MOS - v. a. ab 1000 Da - konnten nur im Kuhkolostrum und/oder durch Analyse mittels HPLC-Chip/TOF-MS, welche Kohlenhydrate im Spurenbereich erfassen können, detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit können deutlich weniger MOS identifiziert ($n = 7$ und quantifiziert ($n = 3$) werden (siehe Abb. 4-25), da eine Analytik im Spurenbereich nicht möglich war. Der Anteil der sauren Oligosaccharide an den Gesamt-MOS beträgt ca. 60 %. Demnach besitzt der Großteil der MOS analog zu Tao et al. [2008] einen sauren Charakter. Die sauren Substanzen liegen in Kuhmilch, wie auch bei Martinez-Ferez et al. [2006] und Tao et al. [2008] beschrieben, v. a. einfach sialyliert vor und bestehen überwiegend aus N-Acetylneuraminsäuren (3'-SL und 6'-SL). Analog zu Sundekilde et al. [2012] liegt der Gehalt an 3'-SL deutlich über den Konzentrationen an 6'-SL (ca. 20 mg/l vs. 2 mg/l - 3 mg/l, Tab. 4-9). In der Kuhmilch sind keine fucosylierten Oligosaccharide detektierbar (ebenso Tao et al. [2008]). Nach Tao et al. [2008] und den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit besteht Kuhmilch überwiegend aus kurzkettigen MOS wie GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL.

Mit Hilfe der Standardsubstanzen GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL konnten diese Analyten in Kuhmilch quantifiziert werden. Im Vergleich zu Fong et al. [2011] und McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek [2004] konnten deutlich höhere Werte an GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc (2,6 mg/l bis 4 mg/l vs. 14,95 mg/l bis 16,27 mg/l) in Kuhmilch detektiert werden. Dies könnte auf unterschiedliche Probenaufarbeitungen und/oder biologische Varianzen zurückgeführt werden. In der Literatur konnten bisher 42,0 mg/l bis 139,2 mg/l 3'-SL und 3,6 mg/l bis 24,0 mg/l 6'-SL in Kuhmilch [[Fong et al., 2011], [Goto et al., 2010], [McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek, 2004] und [Nakamura et al., 2003]] gemessen werden. Die untersuchten Kuhmilchproben wiesen deutlich geringere Gehalte von 19,61 mg/l bis 21,31 mg/l 3'-SL und 1,94 mg/l bis 3,61 mg/l 6'-SL auf (siehe Tab. 4-9). Unter Berücksichtigung der Wiederfindung der beiden Sialyllactosen nach GCC-SPE-Aufarbeitung (50,4 % für 3'-SL und 66,4 % für 6'-SL) müssten die tatsächlichen Werte dieser Analyten höher liegen. Dadurch werden Konzentrationen erreicht, die sich im Bereich der in der Literatur gemessenen Gehalte befinden. Abweichungen können durch verschiedene Probenaufarbeitungen und biologische Variationen hervorgerufen werden.

In **Stutenmilch** sind v. a. 3'-SL und 6'-SL identifizierbar und quantifizierbar (siehe Abb. 4-26).

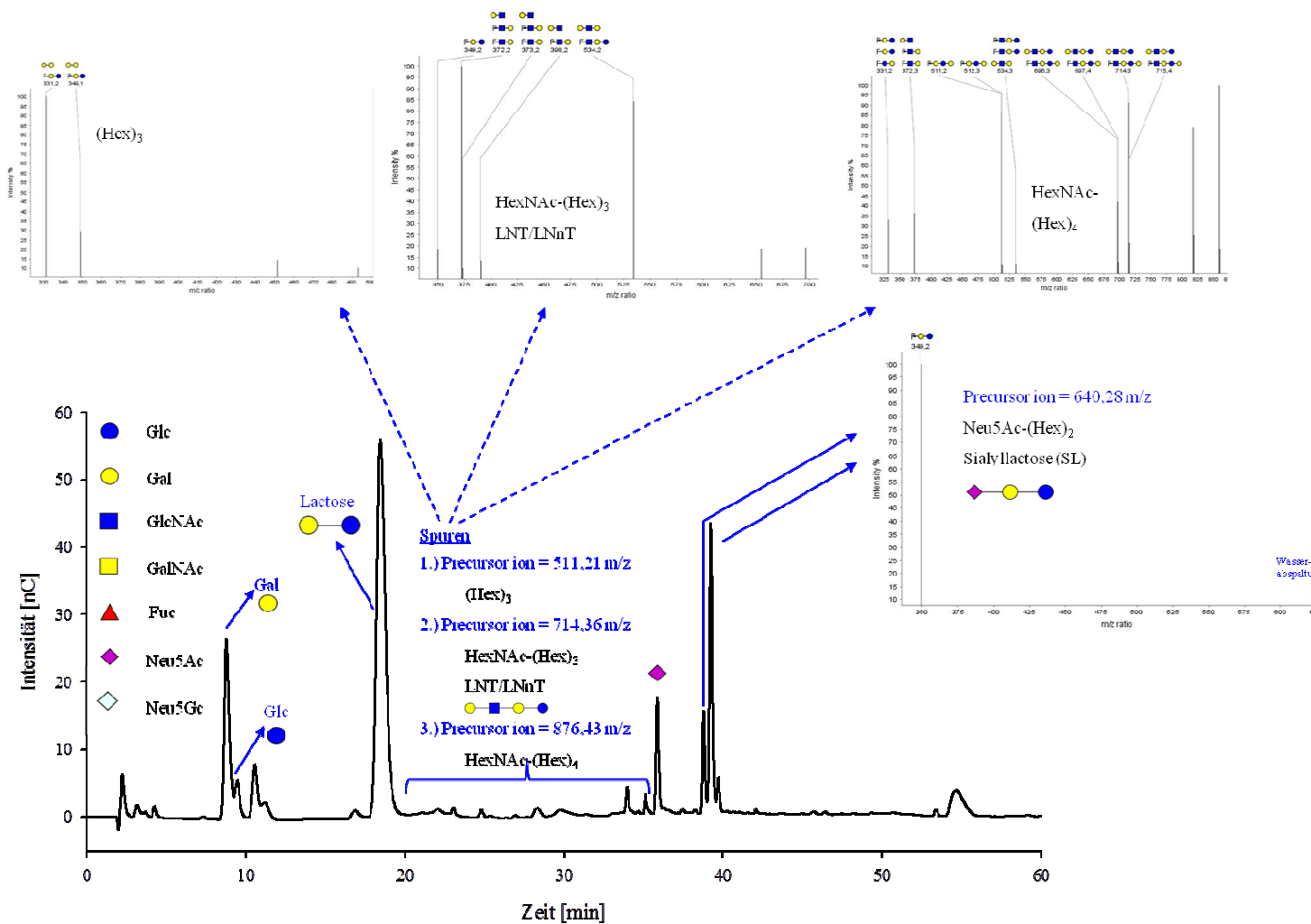


Abb. 4-26: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Stutenmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

Neben den durch externe Standardsubstanzen bestätigten Sialyllactosen 3'-SL und 6'-SL sind Spuren von $(\text{Hex})_3$, $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$ und $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_4$ messbar (siehe Abb. 4-26). Der Literaturmeinung folgend könnte es sich bei $(\text{Hex})_3$ um die Substanzen 3'-GL, 4'-GL oder 6'-GL bzw. bei $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$ um LNT oder LNnT handeln (siehe Tab. 6-2 im Anhang). Finke [2000] konnte in Stutenmilch sechs neutrale Oligosaccharide identifizieren, jedoch keine davon quantifizieren. Die Substanzen $(\text{Hex})_3$, $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$ und $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_4$ konnten bei Finke [2000] und in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Zusätzlich zu den neutralen MOS sind in der untersuchten Stutenmilch die Sialyllactosen 3'-SL und 6'-SL identifizier- und quantifizierbar (siehe Tab. 4-9).

In **Ziegenmilch** sind die Oligosaccharide 3-FL, 2'-FL, $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$, zwei Isomere an $(\text{Hex})_3$, 3'-SL, 6'-SL, SGL (Sialylgalactosyllactose) und $(\text{Hex})_2\text{-Neu5Gc}$ (siehe Abb. 4-27) nach LC/MS-Analyse detektierbar. Die Analyten 3-FL, 2'-FL, 3'-SL und 6'-SL wurden durch den Retentionszeitenvergleich mit Standardsubstanzen bestätigt. Bei $(\text{Hex})_3$ könnte es sich analog zur Stutenmilch um die Substanzen 3'-GL, 4'-GL oder 6'-GL bzw. bei $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$ um LNT oder LNnT handeln. Nach Sephadex[®]-Aufarbeitung zur Lactoseabtrennung sind außerdem Spuren von $(\text{Hex})_2\text{-Neu5Ac-Neu5Gc}$ und $(\text{Hex})_2\text{-(Neu5Ac)}_2$ nachweisbar. Im Rahmen bisheriger Forschungen konnten 29 MOS in Ziegenmilch, -molke und -kolostrum identifiziert werden, wobei davon sechs OS quantifiziert werden konnten (siehe Tab. 6-2 im Anhang). In der untersuchten Ziegenmilch können neun Oligosaccharide identifiziert und vier quantifiziert werden. Ein Großteil der MOS in Ziegenmilch sind kleine, neutrale Analyten oder saure, einfach bzw. doppelt sialylierte OS (ebenso Martinez-Ferez et al. [2006]).

Die Analyten 3-FL, 2'-FL, 3'-SL und 6'-SL konnten mit Standardsubstanzen in der Ziegenmilch quantifiziert werden. Martinez-Ferez et al. [2006] konnte 30 mg/l bis 60 mg/l 3'-SL und 50 mg/l bis 70 mg/l 6'-SL detektieren. Die in dieser Arbeit untersuchte Ziegenmilch wies deutlich geringere Werte von 3'-SL und 6'-SL auf (siehe Tab. 4-9). Auch unter Einbeziehung der Wiederfindung dieser Analyten nach GCC-SPE-Aufarbeitung (siehe Kapitel 4.1.1.2.3) lagen die Analysenwerte deutlich unterhalb der Konzentrationen, die von Martinez-Ferez et al. [2006] angegeben sind. Verschiedene Probenaufarbeitungen und/oder biologische Varianzen könnten für die unterschiedlichen Konzentrationen verantwortlich sein. Die Analyten 3-FL und 2'-FL konnten bisher nur in dieser Arbeit in Stutenmilch quantifiziert werden.

In **Schafsmilch** sind 3-FL, 2'-FL, zwei Isomere an $(\text{Hex})_3$ und $(\text{Hex})_2\text{-Neu5Gc}$ sowie Spuren von $\text{HexNAc}-(\text{Hex})_3$ und Sialyllactose (siehe Abb. 4-28) nach LC/MS-Analyse nachweisbar.

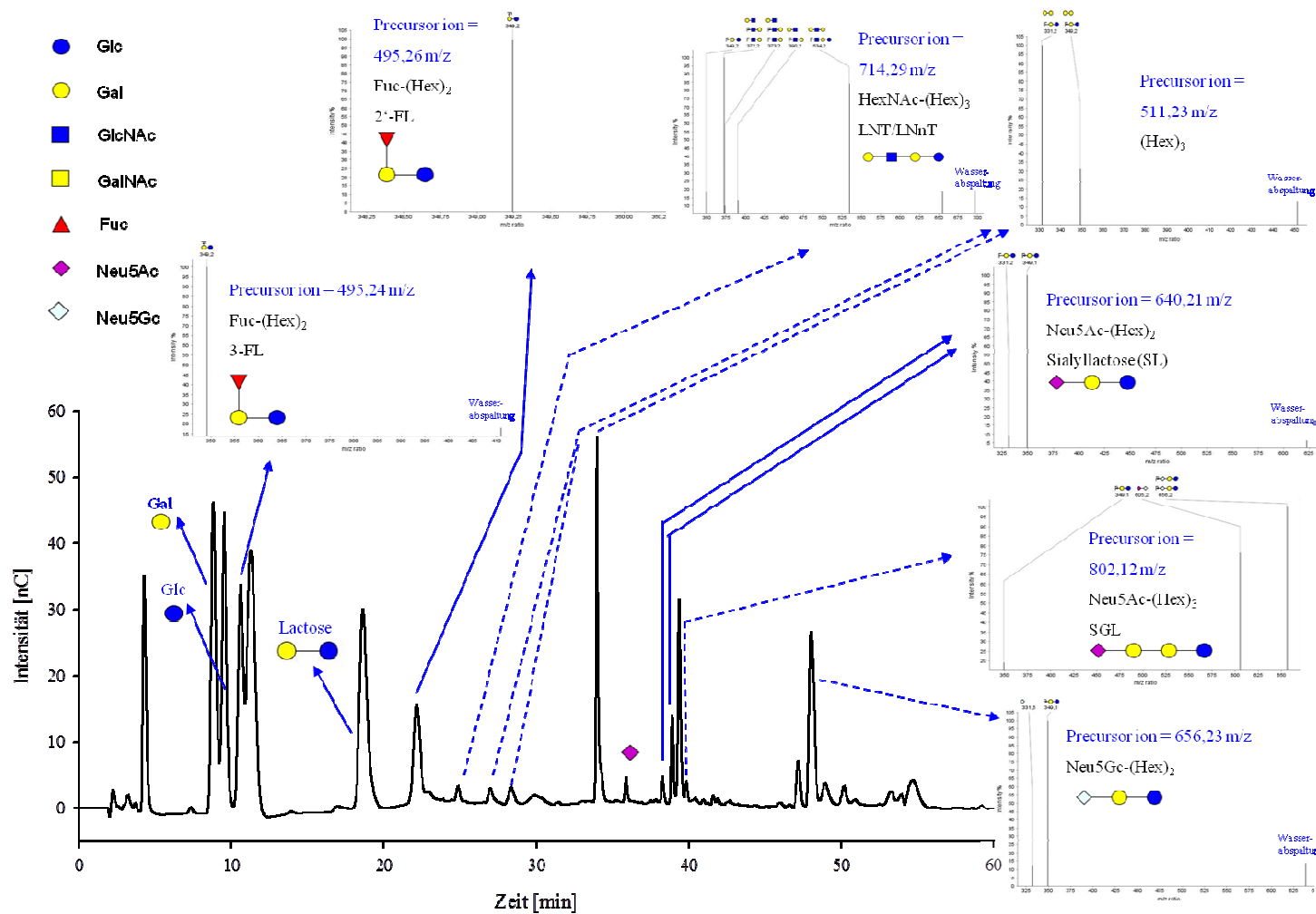


Abb. 4-27: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Ziegenmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalysen (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

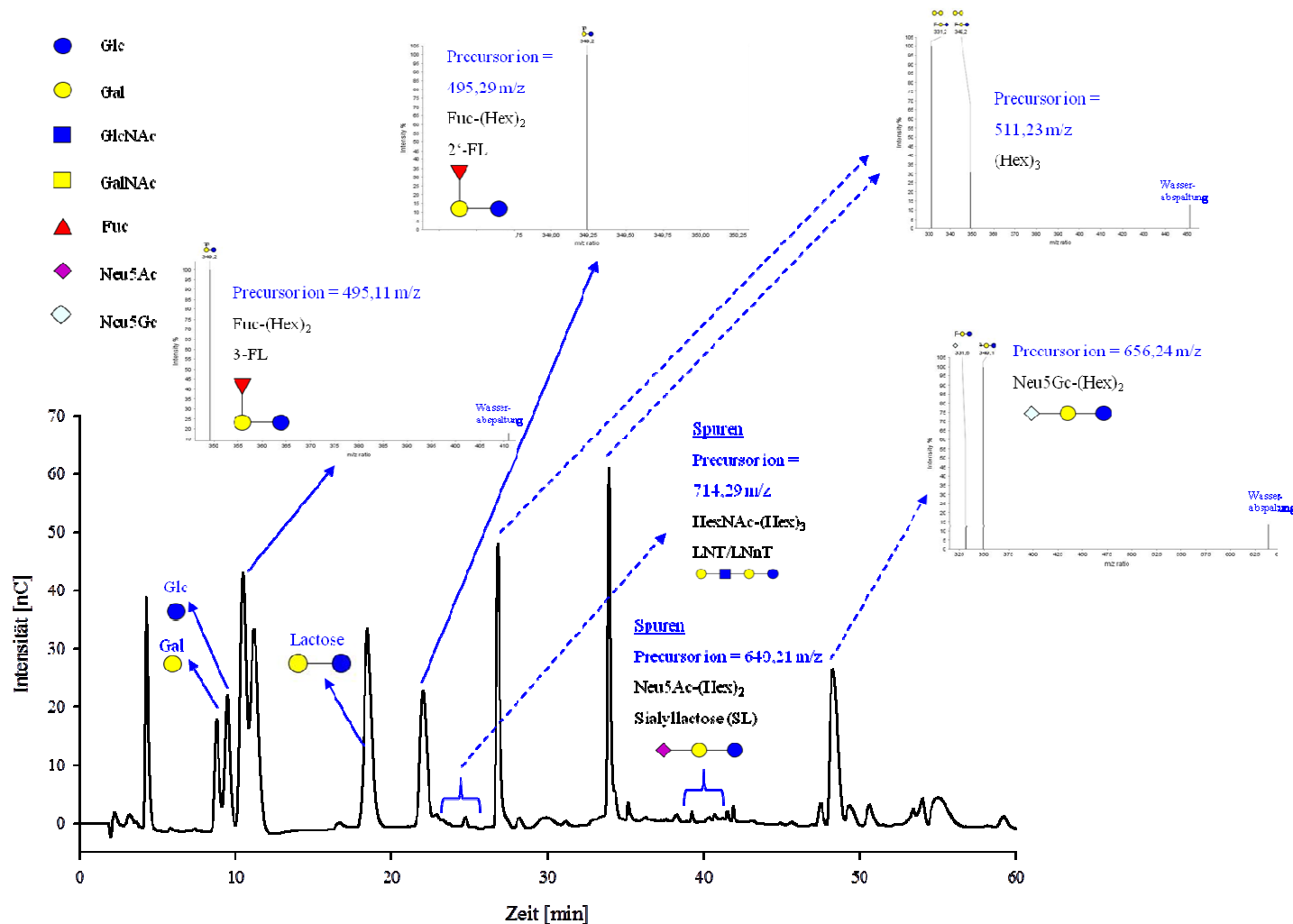


Abb. 4-28: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Schafsmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

Die Anwesenheit von 3-FL, 2'-FL sowie den Sialyllactosen 3'-SL und 6'-SL konnte in Schafsmilch mit externen Standards durch Vergleich der Retentionszeiten bestätigt werden. Im Rahmen bisheriger Forschungen wurden bisher 18 Oligosaccharide in Schafsmilch, -molke und -kolostrum identifiziert, jedoch keine quantifiziert (siehe Tab. 6-2 im Anhang). Die Oligosaccharide Galactosyllactose, Sialyllactose, (Hex)₂-Neu5Gc, Hex-HexNAc-Neu5Gc und HexNAc-(Hex)₃ konnten in Schafsmilch bei Finke [2000] detektiert werden. Bis auf Hex-HexNAc-Neu5Gc sind diese Analyten in der untersuchten Schafsmilch identifizierbar (siehe Abb. 4-28). Wie bei Finke [2000] und Martinez-Ferez et al. [2006] sind neben Neu5Ac-Monomeren der Oligosaccharide Neu5Gc-Bestandteile detektierbar. Die Fucosyllactosen 2'-FL und 3-FL können bisher nur in der vorliegenden Arbeit quantifiziert werden. Die Gehalte an 3'-SL und 6'-SL lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze und konnten durch HPAEC nicht quantifiziert werden.

In **Kamelmilch** sind die Oligosaccharide GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, HexNAc-(Hex)₃, LNnH [(HexNAc)₂-(Hex)₃], drei Isomere an (Hex)₃, 3'-SL, 6'-SL, SGL [(Hex)₃-Neu5Ac] und (p)DFLN(n)H [(HexNAc)₂-(Hex)₄-(Fuc)₂] detektierbar (siehe Abb. 4-29). Durch einen Retentionszeitenvergleich mit externen Standards konnten die Analyten GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, LNnH, 3'-SL und 6'-SL bestätigt werden. Alhaj et al. [2013] und Fukuda et al. [2010] konnten in Kamelmilch bisher zwölf MOS identifizieren, wobei sieben davon sialyliert, drei neutral unfucosyliert und zwei neutral fucosyliert sind (siehe Tab. 6-2 im Anhang). In der hier untersuchten Kamelmilch ist die Identifizierung von zehn Oligosacchariden - drei sialyliert, sechs neutral unfucosyliert und eins neutral fucosyliert - erfolgt. Die Oligosaccharide LNnH, (Hex)₃, 3'-SL, 6'-SL und SGL konnten sowohl in anderer Forschungsarbeiten als auch in der untersuchten Kamelmilch dieser Arbeit detektiert werden. GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, HexNAc-(Hex)₃ und (p)DFLN(n)H sind bisher nur in dieser Arbeit identifizierbar.

In **Humanmilch** sind nach LC/MS-Analyse die Oligosaccharide (p)DFLN(n)H [(HexNAc)₂-(Hex)₄-(Fuc)₂], drei Isomere an Fuc-LN(n)T [HexNAc-(Hex)₃-Fuc], 3-FL, (Hex)₃, Fuc-(p)LN(n)H [(HexNAc)₂-(Hex)₄-Fuc], HexNAc-(Hex)₃, 3'-SL und 6'-SL detektierbar (siehe Abb. 4-30). Die Analyten 3-FL, 3'-SL und 6'-SL konnten mit Hilfe von externen Standards und dem Vergleich der Retentionszeiten bestätigt werden.

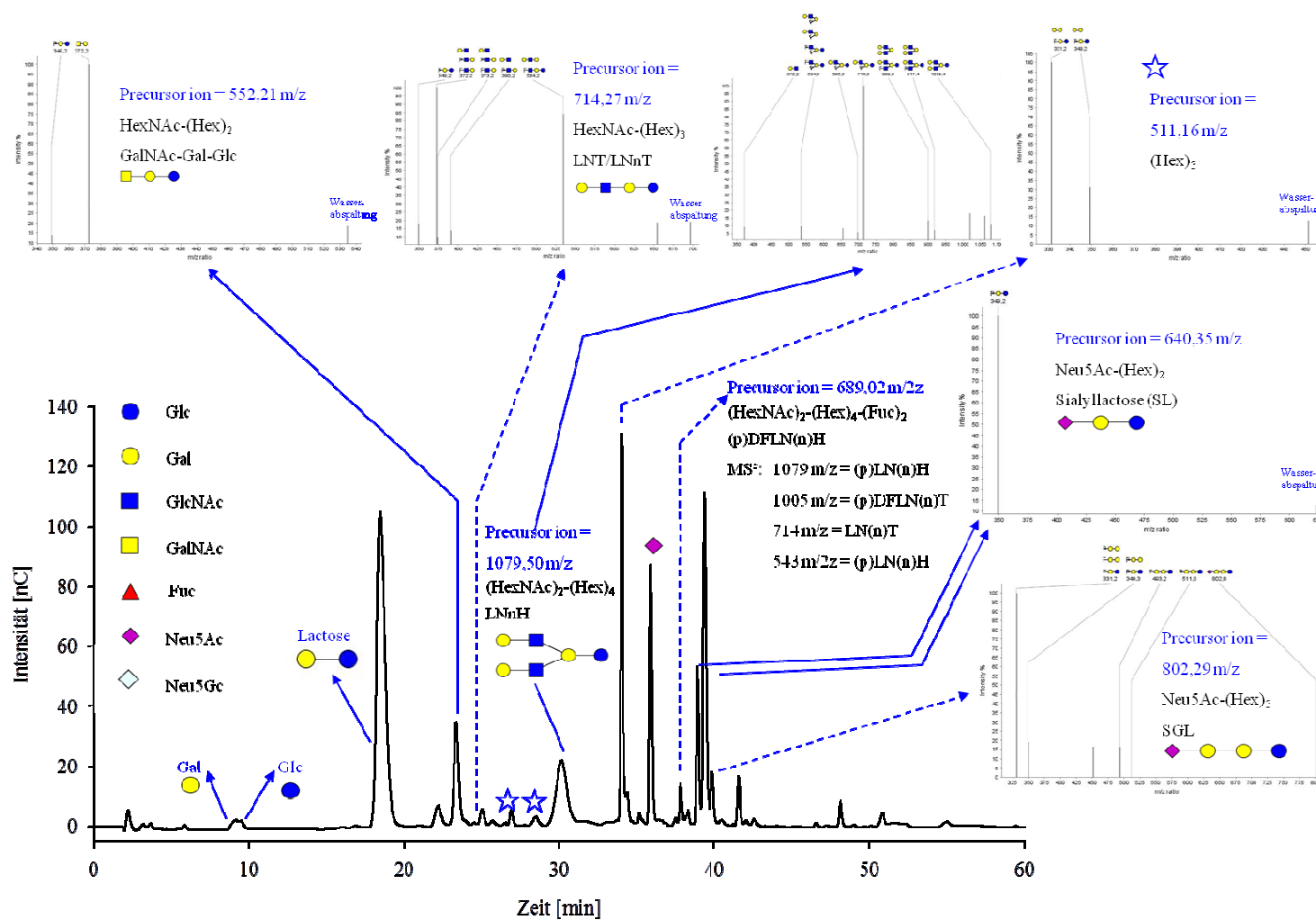


Abb. 4-29: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Kamelmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende MS²-Spektren der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

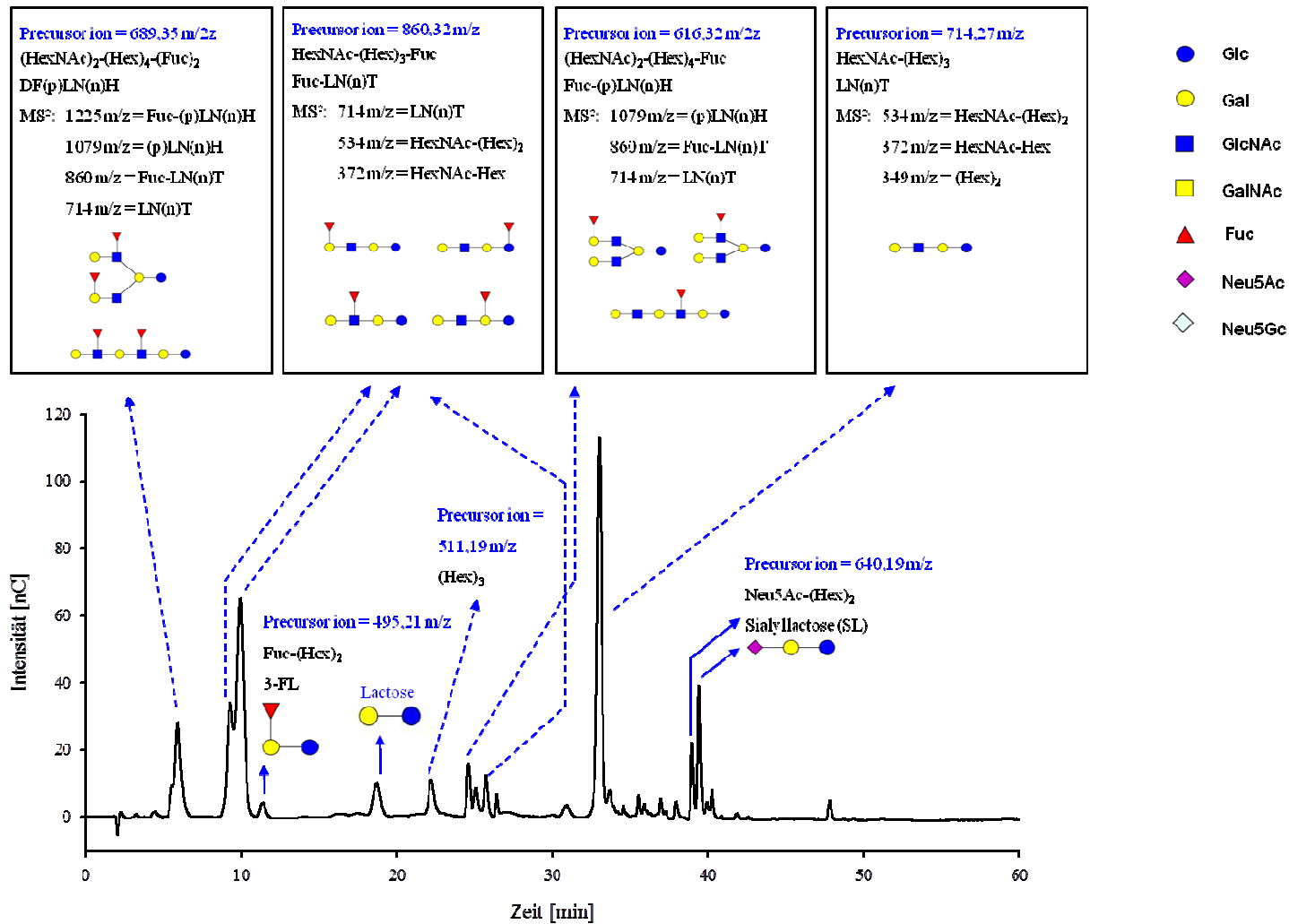


Abb. 4-30: HPAEC-Chromatogramm von UF-Magermilchpermeat aus Humanmilch (Lactoseabtrennung durch GCC-SPE) und entsprechende LC/MS-Daten der Oligosaccharidanalyten (gestrichelter Pfeil: Identifizierung nur durch LC/MS, durchgehender Pfeil: Analyten konnten zusätzlich mit externen Standards durch Retentionszeitvergleich bestätigt werden)

Humanmilch-Oligosaccharide bestehen zu ca. 77 % aus fucosylierten [Ninonuevo et al., 2006] und zu ca. 20 % aus sauren Oligosacchariden [Wu et al., 2011]. Diese Zusammensetzung kann durch die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen bestätigt werden (72,5 % fucosylierte und 27,5 % saure MOS nach Abschätzung der Peakflächenverhältnisse) (siehe Abb. 4-30). Die Verknüpfung der Fucose liegt in den MOS, wie bei Wu et al. [2011] beschrieben, stets in α -Stellung vor (2'-FL und 3'-FL). Nach Wu et al. [2011] ist der Anteil von 6'-SL in Humanmilch größer als der von 3'-SL. In der vorliegenden Arbeit liegt der Anteil der 6'-SL (siehe Abb. 4-30, vorderer Peak der beiden Sialyllactosen) in der dargestellten Milchprobe (9 Wochen postpartum) unterhalb des Gehalts an 3'-SL (hinterer Peak der beiden Sialyllactosen). Das Verhältnis von 6'-SL zu 3'-SL ändert sich jedoch während der Lactationszeit, da nach 23 Wochen postpartum 6'-SL eine höhere Konzentration im Vergleich zu 3'-SL aufweist (siehe Tab. 4-9).

Nach Coppa et al. [2011] und Thurl et al. [2010] sind die Gehalte an OS in Humanmilch von der Lewis-Blutgruppe des Spenders abhängig. Spender mit der Blutgruppe Le(a-b+) können demnach sowohl $\alpha(1\rightarrow2)$ -, $\alpha(1\rightarrow3)$ - als auch $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucosylierte MOS synthetisieren. Le(a+b-) bzw. Le(a-b-)-Spender können keine $\alpha(1\rightarrow2)$ - bzw. $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucosylierte Oligosaccharide bilden. Spender mit der Lewisblutgruppe Le(a+b+) können nur $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosylierte MOS synthetisieren. Da in den Milchproben der anonymen Spenderin (9, 11, 20 und 23 Wochen postpartum) deutliche Gehalte an 3-FL und 2'-FL messbar sind, können die Blutgruppen Le(a+b-) und Le(a-b+) als Lewisblutgruppe der Spenderin ausgeschlossen werden. Auf Grund von fehlenden Standardsubstanzen kann die Anwesenheit von $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucosylierte Oligosaccharide in der Humanmilch und damit verbundenen Lewisgruppe Le(a-b-) nicht nachgewiesen werden. Die Spenderin der Humanmilch besitzt somit entweder die Blutgruppe Le(a-b+) oder Le(a-b-). Ein Rückschluss von dem Oligosaccharidmuster (bei Vorhandensein externer Standards) auf die entsprechende Lewisblutgruppe der Spenderin scheint demnach möglich zu sein [[Coppa et al., 2011] und [Thurl et al., 2010]].

In der nachfolgenden Abbildung sind die HPAEC-Chromatogramme der Milchproben der in dieser Arbeit betrachteten Nutztierarten (Kuh-, Stuten-, Ziege-, Schafs-, Kamel- und Humanmilch) dargestellt.

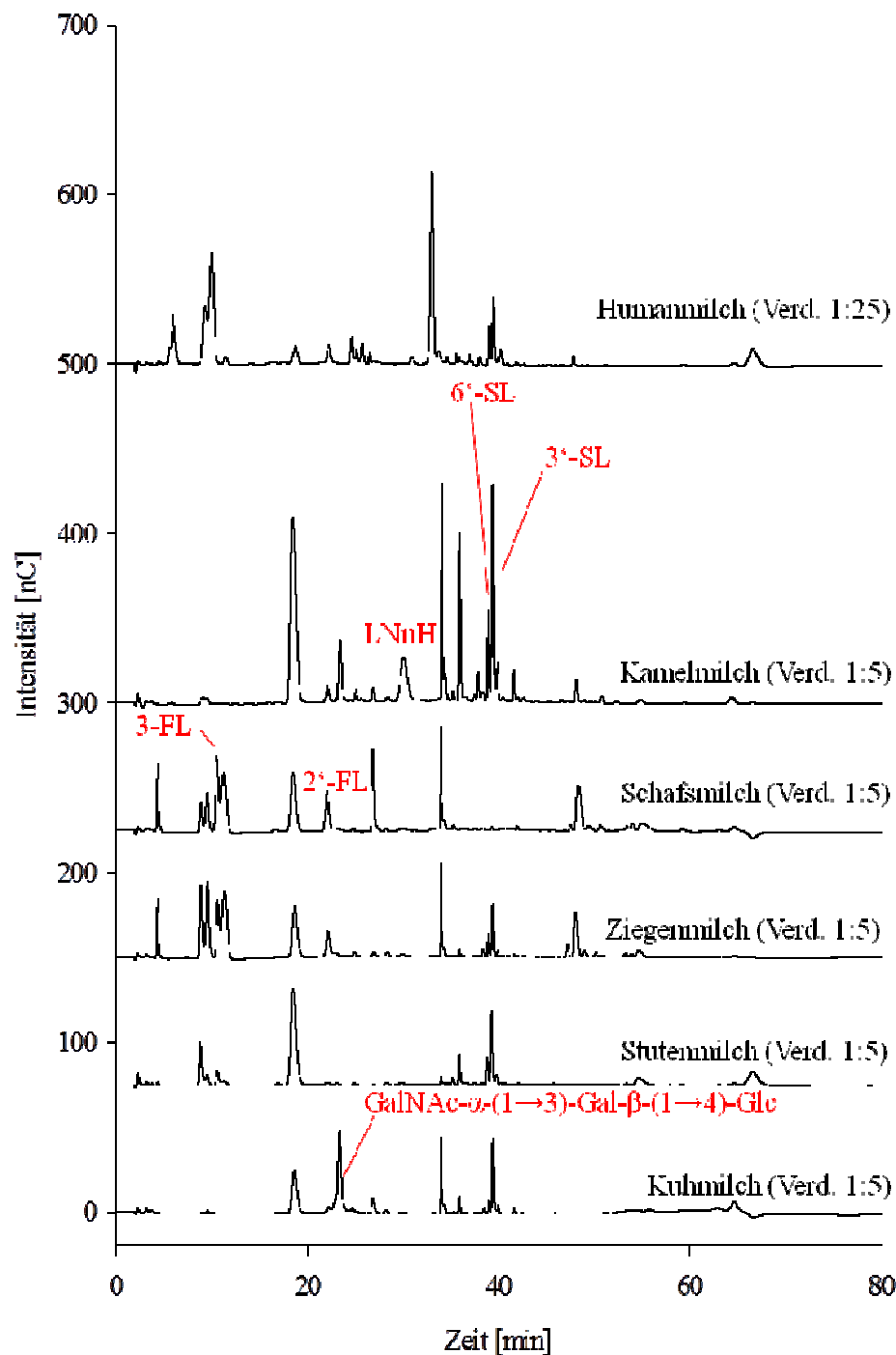


Abb. 4-31: HPAEC-Chromatogramme diverser Milchproben (Probenvorbereitung: Entfettung, Proteinabtrennung durch Ultrafiltration, Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE, Analytik: HPAEC-PAD/IT-MS)

Nach HPAEC-PAD/IT-MS-Analyse weist Humanmilch zahlreiche Peaks im Bereich 0 min bis 38 min auf (siehe Abb. 4-31), wobei es sich nach LC/MS-Analyse überwiegend um neutrale Kohlenhydrate handelt. Die Analyten nach Minute 38 der HPAEC-Chromatographie besitzen v. a. einen sauren Charakter. Humanmilch besteht demnach zum Großteil aus

neutralen sowie einigen sauren MOS. Chromatographisch besitzt Kamelmilch die größte Ähnlichkeit zu Humanmilch, da zahlreiche Peaks im neutralen Bereich (0 min bis 38 min) sowie einige Peaks im sauren Bereich (nach Minute 38) detektiert wurden. Im Gegensatz zur Humanmilch befinden sich in Kamelmilch keine Fucosyllactosen, die nach Kapitel 2.2.2.2.3 eine potentiell gesundheitsfördernde Wirkung besitzen. In Schafs-, Ziegen-, Stuten- und Kuhmilch können deutlich weniger Peaks sowohl im neutralen als auch im sauren Bereich detektiert werden. Kuhmilch nimmt jedoch auf Grund ihrer großen Verfügbarkeit und den in der Rohmilch befindlichen Sialyllactosen, die eine potentiell gesundheitsfördernde Wirkung besitzen, eine Sonderstellung ein.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass jede Milch hinsichtlich der MOS einzigartig ist, da verschiedenartige MOS in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen werden konnten.

4.2.1.2 Quantifizierung der MOS in Milchproben verschiedener Nutztierarten

Als Standardsubstanzen werden bei allen Milchproben die Oligosaccharide GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, LNnH, 2'-FL, 3-FL, 6'-SL und 3'-SL mitgeführt und - sofern identifizierbar - quantifiziert (siehe Tab. 4-9).

Tab. 4-9: MOS-Gehalte im UF-Magermilchpermeat verschiedener Nutztierarten (Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE, Analytik: HPAEC-PAD/IT-MS, Lactosegehalte nach Souci et al. [2008], Verhältnis MOS zu Lactose mit den mittels Standardsubstanzen quantifizierbaren MOS)

Probe (n = 3)	Gehalte MOS [mg/l]						Lac [%]	Verhältnis MOS zu Lac
	GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc	LNnH	2'-FL	3-FL	3'-SL	6'-SL		
Kuhmilch (Morgengemelk)	16,27 ± 0,27 [VarK = 1,63 %]	n. d.	n. d.	n. d.	21,18 ± 0,94 [VarK = 4,44 %]	1,94 ± 0,18 [VarK = 9,28 %]	4,7	1 : 1193,34
Kuhmilch (Abendgemelk)	15,59 ± 0,76 [VarK = 4,85 %]	n. d.	n. d.	n. d.	21,31 ± 0,50 [VarK = 2,33 %]	2,75 ± 0,28 [VarK = 10,23 %]	4,7	1 : 1185,63
Kuhmilch (Morgen- und Abendgemelk)	14,95 ± 0,48 [VarK = 3,18 %]	n. d.	n. d.	n. d.	19,61 ± 0,66 [VarK = 3,37 %]	3,61 ± 0,40 [VarK = 10,93 %]	4,7	1 : 1231,29
Stutenmilch (Morgengemelk)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	17,62 ± 0,79 [VarK = 4,51 %]	4,28 ± 0,33 [VarK = 7,61 %]	6,2	1 : 2830,63
Stutenmilch (Mittagsgemelk)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	25,15 ± 0,60 [VarK = 2,39 %]	4,27 ± 0,27 [VarK = 6,37 %]	6,2	1 : 2107,76
Stutenmilch (Abendgemelk)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	20,20 ± 0,63 [VarK = 3,12 %]	4,67 ± 0,10 [VarK = 2,12 %]	6,2	1 : 2492,69
Ziegenmilch (Morgengemelk)	n. d.	n. d.	15,59 ± 0,55 [VarK = 3,54 %]	18,67 ± 0,41 [VarK = 2,21 %]	11,32 ± 1,30 [VarK = 11,51 %]	4,28 ± 0,38 [VarK = 8,88 %]	4,2	1 : 842,42
Ziegenmilch (Abendgemelk)	n. d.	n. d.	12,99 ± 0,06 [VarK = 0,44 %]	21,30 ± 0,51 [VarK = 2,38 %]	7,17 ± 0,37 [VarK = 5,20 %]	1,90 ± 0,20 [VarK = 10,53 %]	4,2	1 : 968,43

Probe (n = 3)	Gehalte MOS [mg/l]						Lac [%]	Verhältnis MOS zu Lac
	GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc	LNnH	2'-FL	3-FL	3'-SL	6'-SL		
Schafsmilch (Abendgemelk)	n. d.	n. d.	23,19 ± 0,74 [VarK = 3,20 %]	28,07 ± 1,14 [VarK = 4,07 %]	Spuren	Spuren	4,6	1 : 917,95
Schafsmilch (Morgengemelk)	n. d.	n. d.	20,96 ± 0,68 [VarK = 3,23 %]	26,49 ± 2,18 [VarK = 8,24 %]	Spuren	Spuren	4,6	1 : 999,56
Schafsmilch (Morgen- und Abendgemelk)	n. d.	n. d.	22,20 ± 0,43 [VarK = 1,94 %]	25,50 ± 1,09 [VarK = 4,32 %]	Spuren	Spuren	4,6	1 : 996,11
Kamelmilch (pasteurisiert, 2011)	9,72 ± 0,18 [VarK = 1,90%]	57,10 ± 1,34 [VarK = 2,34 %]	n. d.	n. d.	65,33 ± 0,45 [VarK = 0,69 %]	16,23 ± 0,15 [VarK = 0,89 %]	4,8	1 : 323,5
Kamelmilch (roh)	9,58 ± 0,19 [VarK = 1,98 %]	53,28 ± 1,34 [VarK = 2,51 %]	n. d.	n. d.	63,92 ± 0,43 [VarK = 0,67 %]	16,05 ± 0,03 [VarK = 0,16 %]	4,8	1 : 336,05
Kamelmilch (pasteurisiert, 2012)	8,64 ± 0,20 [VarK = 2,28 %]	48,01 ± 0,65 [VarK = 1,34 %]	n. d.	n. d.	54,90 ± 0,45 [VarK = 0,82 %]	16,14 ± 0,18 [VarK = 1,13 %]	4,8	1 : 375,92
Humanmilch (9 Wochen postpartum)	n. d.	n. d.	44,18 ± 0,98 [VarK = 2,22 %]	226,86 ± 16,89 [VarK = 7,45 %]	85,43 ± 2,59 [VarK = 3,04 %]	36,48 ± 5,12 [VarK = 14,05 %]	7,0	1 : 178,14
Humanmilch (11 Wochen postpartum)	n. d.	n. d.	34,75 ± 4,17 [VarK = 7,08 %]	212,09 ± 7,90 [VarK = 3,73 %]	81,08 ± 5,23 [VarK = 6,45 %]	29,63 ± 9,34 [VarK = 11,99 %]	7,0	1 : 190,40
Humanmilch (20 Wochen postpartum)	n. d.	n. d.	28,64 ± 2,93 [VarK = 10,23 %]	215,00 ± 7,49 [VarK = 3,48 %]	47,49 ± 1,50 [VarK = 3,15 %]	42,08 ± 2,63 [VarK = 6,26 %]	7,0	1 : 210,08
Humanmilch (23 Wochen postpartum)	n. d.	n. d.	25,71 ± 0,76 [VarK = 2,97 %]	235,72 ± 0,38 [VarK = 0,16 %]	47,55 ± 2,44 [VarK = 5,13 %]	51,64 ± 5,81 [VarK = 11,24 %]	7,0	1 : 194,11

Die höchsten Gehalte an quantifizierbaren MOS (Summe der Spalten zwei bis sieben in Tab. 4-9) konnten in Humanmilch (0,333 g/l - 0,398 g/l) gefolgt von Kamelmilch (0,128 g/l - 0,148 g/l), Schafsmilch (0,046 g/l - 0,050 g/l), Ziegenmilch (0,043 g/l - 0,050 g/l), Kuhmilch (0,038 g/l - 0,040 g/l) und Stutenmilch (0,022 g/l - 0,029 g/l) gemessen werden (siehe Tab. 4-9). Martinez-Ferez et al. [2006] konnte die höchsten MOS-Konzentrationen in Humanmilch (5 g/l - 8 g/l) gefolgt von Ziegenmilch (0,25 g/l - 0,30 g/l), Kuhmilch (0,03 g/l - 0,06 g/l) und Schafsmilch (0,02 g/l - 0,04 g/l) detektieren. Die MOS-Konzentrationen der analysierten Kuh- und Schafsmilch stimmen mit den Analysenwerte von Martinez-Ferez et al. [2006] gut überein. Dagegen wurden in Ziegenmilch deutlich geringere Werte (0,25 g/l - 0,30 g/l vs. 0,043 g/l - 0,050 g/l) detektiert. Dies ist auf das Fehlen von externen Standardsubstanzen zur Quantifizierung der sauren Oligosaccharide (v. a. Neu5Gc-(Hex)₂ und Neu5Ac-(Hex)₃) in dieser Arbeit zurückzuführen. Martinez-Ferez et al. [2006] konnte diese Standardsubstanzen durch Isolierung aus Milchproben aufwendig gewinnen und somit zur Quantifizierung einsetzen. Aus gleichem Grund wurden deutlich geringere Konzentrationen an MOS in Humanmilch im Vergleich zu Martinez-Ferez et al. [2006] detektiert (0,333 g/l - 0,398 g/l vs. 5 g/l - 8 g/l). Die Abweichung ist im Vergleich zu Ziegenmilch deutlich größer, da die Vielfalt der MOS in Humanmilch signifikant höher ist.

4.2.1.3 Verhältnis von MOS zu Lactose in Milchproben verschiedener Nutztierarten

Wie im Kapitel 2.6 beschrieben, beträgt das Verhältnis MOS zu Lactose in Kuhmilch ca. 1:1000 (siehe Tab. 4-9). Deshalb ist eine Lactoseabtrennung zur MOS-Analytik notwendig. Schafs- und Ziegenmilch besitzen ähnliche MOS-Lactose-Verhältnisse wie Kuhmilch. Da nur ein Teil der sauren MOS in Ziegenmilch quantifiziert werden konnten, ist das MOS-Lactose-Verhältnis deutlich zu Gunsten der Lactose verschoben. In Stutenmilch kann ein Verhältnis von MOS zu Lactose von ca. 1:2500 detektiert werden. Dies ist auf einen geringeren Anteil der MOS und einen höheren Anteil an Lactose im Vergleich zur Kuhmilch zurückzuführen. Auf Grund des deutlich höheren MOS-Gehalts in Kamelmilch im Vergleich zur Kuh-, Schafs-, Ziegen und Stutenmilch kann ein erhöhtes MOS-Lactose-Verhältnis von ca. 1:350 detektiert werden. Das Verhältnis der quantifizierten MOS zu Lactose in Humanmilch beträgt ca. 1:200, wobei ähnlich der Ziegenmilch nur ein geringer Anteil der identifizierten Oligosaccharide quantifiziert werden konnte. Damit würde sich das Verhältnis von MOS zu Lactose in Richtung MOS verschieben. Nach Martinez-Ferez et al. [2006] liegt dementsprechend das MOS-Lactose-Verhältnis in Humanmilch bei ca. 1:10.

4.2.1.4 Einflussfaktoren auf die MOS-Konzentration in Milchproben verschiedener Nutztierarten

Nach Asakuma et al. [2010], Barile et al. [2010], McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek [2004], Sundekilde et al. [2012] und Urashima et al. [2002] ist die Konzentration der MOS in den Milchproben von Faktoren wie Fütterung, Anzahl der Lactationen, Unterkunft der Tiere, genetischen Faktoren wie Art, Rasse und Alter sowie der saisonalen Variation abhängig. Die biologischen Varianzen zwischen verschiedenen Milchproben einer Tierart wurden anhand der Proben von Morgen-, Mittags- und Abendgemelk untersucht. Die MOS-Analyten in der Ziegenmilch zeigen - bis auf 3-FL - deutlich geringere Konzentrationen im Abendgemelk als im Morgengemelk. Eine tageszeitabhängige Tendenz der MOS-Gehalte kann bei Kuh-, Stuten- und Schafsmilch nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 4-9). Die MOS-Konzentrationen scheinen, soweit die geringe Probenzahl dies erkennen lässt, lediglich bei Ziegenmilch von der Tageszeit des Melkens beeinflusst zu werden.

Die Abhängigkeit der MOS-Konzentrationen von der Lactationsdauer wurde in Humanmilch untersucht. Mit zunehmender Lactationsdauer kommt es zur starken Abnahme der Konzentrationen von 2'-FL und 3'-SL. Die Analyten 3-FL und 6'-SL zeigen bis Woche elf eine Abnahme der Konzentration und anschließend eine Zunahme mit fortschreitender Lactationsdauer (siehe Tab. 4-9). Die Summe der quantifizierbaren MOS sowie die Summe aus 3'-SL und 6'-SL nehmen mit zunehmender Lactationsdauer ab (siehe Tab. 4-9). Nach Wang et al. [2001] und Martín-Sosa et al. [2003] verringert sich die Summe von 3'-SL und 6'-SL in Humanmilch innerhalb von drei Monaten um 80 %. In den untersuchten Humanmilchproben dieser Arbeit kann eine Abnahme der Summe an 3'-SL und 6'-SL von 18,6 % innerhalb von 14 Tagen gemessen werden. Mit zunehmender Lactationsdauer kommt es zu einem Abfall der Konzentration an 2'-FL und einem leichten Anstieg des Gehalts an 3-FL (siehe Tab. 4-9) (ebenso Bao et al. [2013]). Wie bei McJarrow and Amelsfort-Schoonbeek [2004], Nakamura et al. [2003], Wang et al. [2001], Bao et al. [2013] und Martín-Sosa et al. [2003] beschrieben, werden zu Beginn der Lactation deutlich höhere Gehalte an Gesamt-MOS gemessen, die mit fortschreitender Lactationsdauer abnehmen und später in Milch konstante Werte annehmen.

Beim Vergleich der Kamel-MOS-Gehalte von Rohmilch und pasteurisierter Milch können nur geringfügige Änderungen während der Milcherhitzung detektiert werden (siehe Tab. 4-9). Die Erhitzung scheint somit nur einen geringen Einfluss auf die MOS-Konzentration zu besitzen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der MOS-Gehalt in den verschiedenen untersuchten, MOS-haltigen Proben - wie in der Literatur beschrieben - von vielen unterschiedlichen Faktoren (z. B. Zeitpunkt des Melkens und Lactationsdauer) abhängig ist.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass jede Milch hinsichtlich der MOS einzigartig ist und eine Spezies-spezifische Oligosaccharidzusammensetzung aufweist. Der MOS-Gehalt ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Die höchsten Gehalte an quantifizierbaren MOS können in Humanmilch gefolgt von Kamelmilch, Schafsmilch, Ziegenmilch, Kuhmilch und Stutenmilch gemessen werden. Das milcheigene Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc kann nur in Kuh- und Kamelmilch; LNnH nur in Kamelmilch detektiert werden. Die Oligosaccharide 2'-FL und 3-FL können in Ziegen-, Schafs- und Humanmilch gemessen werden. Die Sialyllactosen 3'-SL und 6'-SL können in allen untersuchten Tiermilchproben identifiziert und - bis auf Schafsmilch - in allen Proben quantifiziert werden.

4.2.2 Milcheigene Oligosaccharide in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie

4.2.2.1 Identifizierung und Quantifizierung der MOS in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie

Die in Kapitel 4.1 entwickelte Methode zur Oligosaccharidanalyse wurde neben der Analyse der Milchproben verschiedener Nutztierarten (siehe Kapitel 4.2.1) auch auf MOS-haltige Produktströme der milch- und molkeverarbeitenden Industrie angewandt. Hierbei stellte die Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG (UTM) Proben ihrer relevanten Produktströme für diese Arbeit zur Verfügung (siehe Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Gehalte der MOS 3'-SL, 6'-SL und GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie der Kohlenhydrate Lactose und Galactose in Proben der Produktströme von UTM (Analytik der MOS: HPAEC-PAD/IT-MS, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Probenaufarbeitung: (wenn nötig) Entfettung, Proteinentfernung durch Ultrafiltration und Aufreinigung mittels GCC-SPE (n = 2), Analytik von Lactose und Galactose durch UTM)

Probe	Gehalte MOS [mg/l]			Lac [%]	Gal [%]	Verhältnis MOS zu Lac
	3'-SL	6'-SL	GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc			
Rohmilch	20,50 \pm 0,70 [VarK = 3,41 %]	3,91 \pm 0,16 [VarK = 4,14 %]	16,92 \pm 0,17 [VarK = 1,00 %]	4,83	< 0,05	1:1168,64
Magermilch	22,24 \pm 0,54 [VarK = 2,44 %]	4,80 \pm 0,07 [VarK = 1,53 %]	17,43 \pm 0,44 [VarK = 2,50 %]	5,03	< 0,05	1:1131,10
Konz. UF-Permeat	58,14 \pm 0,70 [VarK = 1,20 %]	12,98 \pm 0,38 [VarK = 2,93 %]	51,27 \pm 1,61 [VarK = 3,15 %]	15,25	0,13	1:1246,02
Süßmolke	16,39 \pm 0,03 [VarK = 0,18 %]	3,30 \pm 0,06 [VarK = 1,67 %]	12,20 \pm 0,10 [VarK = 0,65 %]	3,53	< 0,05	1:1106,93
Sauermolke	20,33 \pm 0,37 [VarK = 1,80 %]	4,01 \pm 0,05 [VarK = 1,20 %]	14,37 \pm 0,12 [VarK = 0,81 %]	3,27	< 0,05	1:844,74
Melasse	64,89 \pm 0,06 [VarK = 0,09 %]	16,60 \pm 0,74 [VarK = 4,49 %]	102,53 \pm 3,58 [VarK = 3,49 %]	12,85	0,54	1:698,29
Fermentat	61,53 \pm 0,42 [VarK = 0,58 %]	15,35 \pm 0,73 [VarK = 4,76 %]	102,53 \pm 1,25 [VarK = 1,22 %]	1,19	0,62	1:66,32
Schlempe	68,61 \pm 4,10 [VarK = 5,90 %]	19,86 \pm 2,92 [VarK = 14,71 %]	108,46 \pm 0,03 [VarK = 0,03 %]	1,36	0,64	1:69,06
Lactosefreie Milch	22,91 \pm 0,27 [VarK = 1,19 %]	4,02 \pm 0,02 [VarK = 0,54 %]	11,60 \pm 0,07 [VarK = 0,59 %]	< 0,05	2,42	1:16,9

Die analysierte Kuh-**Rohmilch** (siehe Tab. 4-10) weist vergleichbare Werte wie die in Kapitel 4.2.1 untersuchte Kuhmilch (siehe Tab. 4-9) auf. Durch Entfettung der Rohmilch

entsteht **Magermilch**, die ähnliche MOS-Konzentrationen wie Rohmilch aufweisen sollte. Dies kann anhand der durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden (siehe Tab. 4-10).

Magermilch, die durch Ultrafiltration (UF) weitgehend proteinfrei und mittels Umkehrosmose um den Faktor drei aufkonzentriert wurde (**konz. UF-Permeat**), enthält erwartungsgemäß eine dreifach höhere MOS-Konzentration im Vergleich zur Rohmilch (siehe Tab. 4-10). Durch Entfettung, Proteinabtrennung und Aufkonzentrierung kommt es nur zu geringfügigen Verlusten der MOS.

Süßmolke wird bei der Produktion von Schnittkäse gewonnen und sollte, da die MOS nicht zusammen mit den Proteinen bei der Käseherstellung ausfallen, ähnliche MOS-Konzentrationen wie Rohmilch aufweisen. Dementsprechend können ca. 80 % der MOS aus Rohmilch in Süßmolke wiedergefunden werden (siehe Tab. 4-10). Während der Schnittkäseherstellung kommt es somit zu leichten Verlusten an MOS. **Sauermolke** wird aus der Herstellung von Sauermilchkäse bei gesenktem pH-Wert - gegenüber der Schnittkäseherstellung - gewonnen. Die Sauermolke weist MOS-Konzentrationen auf, die ähnlich zur Rohmilch sind. Nach den Untersuchungen in dieser Arbeit kommt es nur zu sehr geringfügigen Verlusten an milcheigenen Oligosacchariden während der Sauermilchkäseherstellung (siehe Tab. 4-10).

Melasse wird als flüssiger Rückstand der Lactosekristallisation von mikro- und ultrafiltrierter sowie auf 60 % Lactose aufkonzentrierter und durch Aktivkohle entfärbter Magermilch bzw. Molke bezeichnet. Falls alle MOS in die Melasse übergehen, sollte im Vergleich zur Rohmilch durch die Aufkonzentrierung das 12,5 fache der MOS-Konzentration gemessen werden. Nach HPAEC-PAD-Analyse können jedoch nur ca. 35 % der MOS wiedergefunden werden (siehe Tab. 4-10). Durch die Lactosekristallisation und Aktivkohlebehandlung der Ausgangsprobe kommt es zu starken Verlusten der MOS. Ein Verlust der MOS nach Aktivkohlebehandlung war nach Kapitel 4.1.1.2.3 zu erwarten, da neutrale Oligosaccharide nur mit einem organischem Modifier und saure MOS nur durch zusätzlich verwendete flüchtige Säuren von der Aktivkohle eluiert werden können. Im großtechnischem Betrieb findet die Aktivkohlebehandlung zur Entfärbung der Probe nur mit Wasser statt. Nach Maier [1990] entfärbt Aktivkohle den Produktstrom, adsorbiert jedoch auch die Zucker. Die MOS eluieren somit nicht vollständig von der Aktivkohle.

Zur Alkoholbildung wird Melasse mit Hefe versetzt. Dieses Gemisch wird nach eintretender Alkoholgärung als **Fermentat** bezeichnet. Das Fermentat wird nach ausreichender Gärung

destilliert. Der Rückstand dieser Destillation wird als **Schlempe** bezeichnet. Vergleichbare MOS-Analysenwerte zwischen Melasse und Fermentat bzw. Schlempe können detektiert werden (siehe Tab. 4-10). Der Einfluss der Hefebehandlung und der Destillation auf den MOS-Gehalt ist demnach gering.

Lactosefreie Milch ist pasteurisierte Milch, deren Lactose mit Hilfe des Enzyms β -Galactosidase in Galactose und Glucose gespalten wurde. Da im Vergleich zur Rohmilch ähnliche Werte gemessen werden können, scheint der Einfluss der Enzymbehandlung auf den MOS-Gehalt gering (siehe Tab. 4-10).

In der nachfolgenden Abbildung sind die HPAEC-Chromatogramme der Proben aus den Produktströmen von UTM dargestellt.

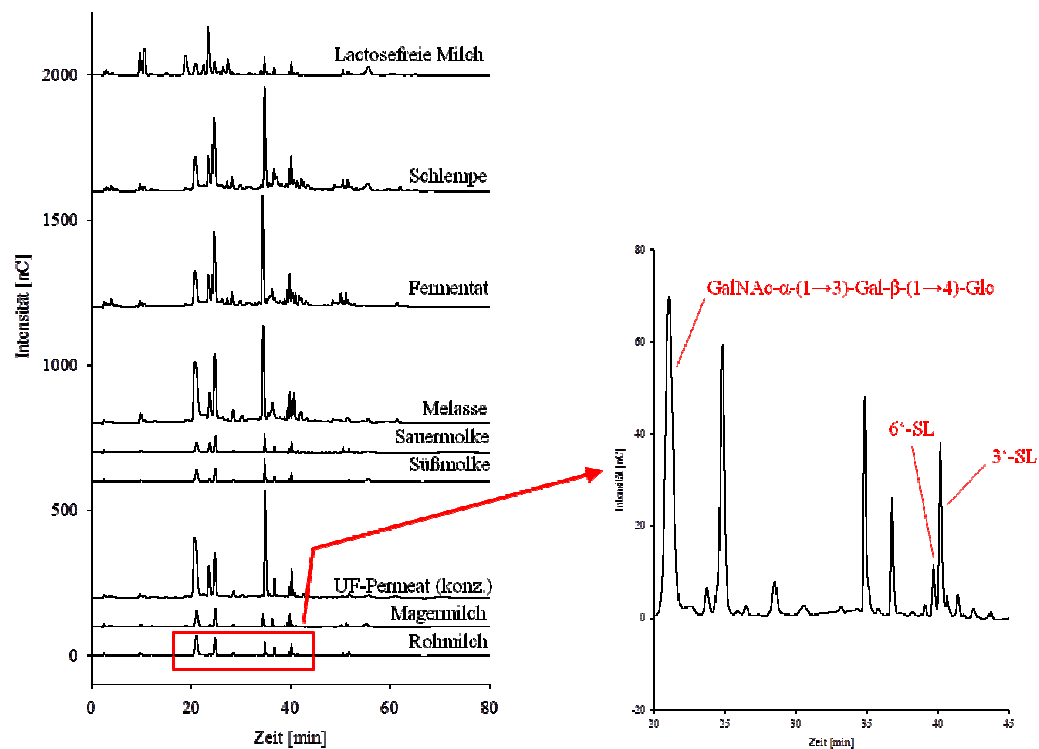


Abb. 4-32: HPAEC-Chromatogramme der verschiedenen Produktströme von UTM (Analytik der MOS: HPAEC-PAD/IT-MS, Quantifizierung mittels externer OS-Standards, Probenaufarbeitung: (wenn nötig) Entfettung, Proteinentfernung durch Ultrafiltration und Aufreinigung mittels GCC-SPE (n = 2), Analytik von Lactose und Galactose durch UTM)

Nach HPAEC-PAD/IT-MS-Analyse der Produktströme von UTM können - wie bei der Rohmilch in Kapitel 4.2.1.1 - die Kohlenhydrate Galactose, Glucose, Lactose, (Hex)₃,

GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, N-Acetylneuraminsäure, 3'-SL, 6'-SL und SGL in der Rohmilch detektiert werden. Mit Hilfe von externen Standards können die Oligosaccharide GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL quantifiziert werden (siehe Abb. 4-32). Magermilch weist ein ähnliches OS-Muster wie Rohmilch auf, was auf Grund des einzigen zusätzlichen Prozessschrittes - der Entfettung - zu erwarten war. Das konzentrierte UF-Permeat zeigt ein ähnliches OS-Profil wie Rohmilch, allerdings mit deutlich höheren Peakflächen der Analyten durch die vorherige Aufkonzentrierung der Probe. Das OS-Muster von Süß- und Sauermolke ist dem der Rohmilch sehr ähnlich.

In Melasse können alle Analyten der Rohmilch sowie ein zusätzlicher Analyt bei ca. 42 min detektiert werden. Nach LC/MS-Analyse ist die Identifizierung dieses Analyten nicht möglich gewesen. Im Vergleich zur Rohmilch sind die Verhältnisse der Peaks auf Grund der vielen Herstellungsschritte sehr verschieden. Ähnliche OS-Muster zeigen sich bei Fermentat und Schlempe.

Die größte Veränderung des OS-Musters im Vergleich zur Rohmilch kann bei der lactosefreien Milch detektiert werden. Dies kann durch den Einsatz der β -Galactosidase zur Lactosehydrolyse erklärt werden. Die MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL scheinen durch diese Behandlung nur geringfügig verändert zu werden. Durch die Enzymbehandlung kommt es zur Bildung von Di- und Trisacchariden, die im HPAEC-Chromatogramm der lactosefreien Milch detektiert werden können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den verschiedenen Proben der Produktströme von UTM unterschiedliche Konzentrationen an MOS nach HPAEC-PAD/IT-MS-Analyse detektiert werden können. Keine der untersuchten Proben ist frei von milcheigenen Oligosacchariden.

4.2.2.2 Verhältnis von MOS zu Lactose in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie

Das Verhältnis von MOS zu Lactose liegt in Rohmilch bei ca. 1:1000 (siehe Kapitel 4.2.1.3). Ähnliche Ergebnisse sind bei der Rohmilch von UTM messbar (siehe Tab. 4-10). Da es während der weiteren Milchaufarbeitung zu keinen Verlusten an MOS kommt, werden bei Magermilch und konzentriertem UF-Permeat ähnliche MOS-Lactose-Verhältnisse detektiert. In Süßmolke liegt das MOS-Lactose-Verhältnis ähnlich wie bei Rohmilch bei ca. 1:1000, da neben den geringeren MOS-Gehalten auch niedrigere Lactose-Konzentrationen gemessen

werden konnten. Im Vergleich zur Rohmilch weist Sauermolke ein niedrigeres MOS-Lactose-Verhältnis von ca. 1:845 auf, da deutlich weniger Lactose und eine gleichbleibende MOS-Konzentration detektiert werden konnten.

In Melasse kann ein MOS-Lactose-Verhältnis von ca. 1:700 gemessen werden. Durch die vorherige Kristallisation wird Lactose abgetrennt und das MOS-Lactose-Verhältnis sollte zu Gunsten der MOS verbessert werden. Jedoch kommt es bei der Aktivkohlebehandlung und der Lactosekristallisation zu Verlusten an milcheigenen Oligosacchariden, wodurch sich das MOS-Lactose-Verhältnis im Gegensatz zu den Erwartungen nur leicht verbessert.

In Fermentat und Schlempe kann ein MOS-Lactose-Verhältnis von ca. 1:70 gemessen werden. Während der in Kapitel 4.2.2.1 beschriebenen Herstellung von Fermentat und Schlempe kommt es zur Abreicherung der Lactose und deren Spaltung in Galactose und Glucose. Das Verhältnis von MOS zu der Summe aus Lactose, Galactose und Glucose beträgt ca. 1:135. Das Verhältnis von MOS zu den Kohlenhydraten Galactose, Glucose und Lactose kann somit im Vergleich zur Rohmilch deutlich verbessert werden.

In lactosefreier Milch kann ein MOS-Lactose-Verhältnis von 1:17 detektiert werden. Bei der Herstellung der lactosefreien Milch wird die Lactose durch vorherige Behandlung mit β -Galactosidase in Monosaccharide gespalten. Das Verhältnis von MOS zu der Summe aus Lactose, Galactose und Glucose beträgt ca. 1:1000. Im Vergleich zur Rohmilch konnte das Verhältnis somit nicht verbessert werden.

Es lässt sich festhalten, dass das Verhältnis von MOS zu der Summe aus Galactose, Glucose und Lactose durch verschiedene Prozessschritte während der Milch- und/oder Molkeverarbeitung verändert wird. Das beste Verhältnis (1:135) kann in Fermentat bzw. Schlempe gemessen werden. Das beste MOS-Lactose-Verhältnis (1:17) kann in lactosefreier Milch gemessen werden. Unter Berücksichtigung der Gehalte an Monosacchariden wird allerdings nur ein zur Rohmilch ähnliches Verhältnis von ca. 1:1000 erreicht.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die in Kapitel 4.1 entwickelte HPAEC-Methode problemlos auf Milchproben angewendet werden kann. Dadurch konnten die Milchproben verschiedener Nutztierarten und Produktströme der milch- und molkeverarbeitenden Industrie untersucht werden.

4.3 Enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β -Galactosidasen

Enzymatisch synthetisierte Galacto-Oligosaccharide könnten als potentiell funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe verwendet werden. Aus diesem Grund soll die enzymatische Synthese der GOS mit diversen β -Galactosidasen untersucht werden.

Die enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe diverser β -Galactosidasen (β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* und *Bacillus circulans*) wurde hinsichtlich verschiedener Prozessparameter wie pH-Wert, Temperatur, Enzym-Substrat-Verhältnis (E/S-Verhältnis), Enzympräparation unterschiedlicher Hersteller, Hitzebehandlung des Enzyms, Einsatz eines zweiten Zuckersubstrates bzw. eines zweiten Enzyms optimiert. Die Analyse der Zuckerzusammensetzung erfolgte mittels HPAEC-PAD nach Carrez-Fällung der Proben zur Abtrennung der inaktivierten Enzyme und Restproteine. Die Berechnung des GOS-Gehalts, der GOS-Ausbeute und der Lactosehydrolyse erfolgte in Anlehnung an Gosling et al. [2011] und Roberts und Pettinati [1957] (siehe Kapitel 6.2.3 im Anhang). Für alle Versuche wurde als Ausgangssubstrat entfettete und durch Ultrafiltration weitgehend proteinfreie Kuhmilch (im Folgenden UF-Magermilchpermeat) mit einem Lactosegehalt von circa 5 % verwendet. Nach Gedai [2010] kann im UF-Magermilchpermeat im Vergleich zu einer 5%igen Lactoselösung in entmineralisiertem Wasser, einer 5%igen Lactoselösung in Puffer und einer 5%igen Lactoselösung in Trinkwasser der höchste Lactosehydrolysegrad erreicht werden. Eine erfolgreiche Lactosehydrolyse ist Voraussetzung für die GOS-Synthese (siehe Kapitel 2.5). Das UF-Magermilchpermeat wurde mit Lactose auf eine Zuckerkonzentration von 40 % aufgestockt. Der Literaturmeinung [u. a. [Gosling et al., 2011], [Rustom et al., 1998], [Goulas et al., 2007], [Splechna et al., 2007], [Neri et al., 2009] und [Rodriguez-Colinas et al., 2012]] folgend kann dadurch die GOS-Ausbeute deutlich gesteigert werden. Eine weitere Erhöhung der Lactosekonzentration im UF-Magermilchpermeat ist nicht möglich, da sonst die Lactose auskristallisiert [Gänzle, 2012]. Als Ausgangssubstrat zur GOS-Herstellung diente daher auf 40 % Lactose aufgestocktes UF-Magermilchpermeat.

Zur Veranschaulichung ist in der nachfolgenden Abbildung das HPAEC-Chromatogramm einer enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösung nach Identifizierung der Analyten mittels LC/MS (siehe Kapitel 4.3.2) sowie der zeitliche Verlauf während der enzymatischen GOS-Synthese von Glucose, Lactose sowie den synthetisierten Tri-, Tetra- und Pentasacchariden dargestellt.

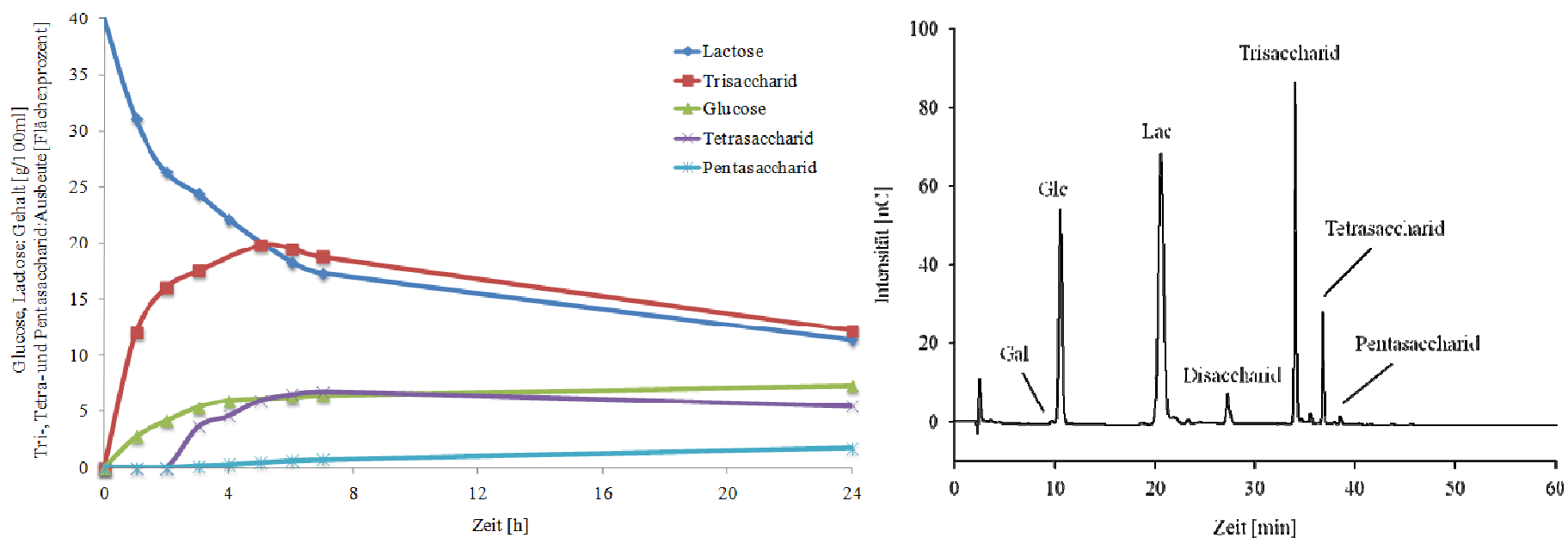


Abb. 4-33: Zeitlicher Verlauf (links) von Glucose, Lactose und den synthetisierten Tri-, Tetra- und Pentasacchariden einer enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösung mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* sowie HPAEC-Chromatogramm (rechts, zum Reaktionszeitpunkt $t = 5$ h) (pH 4, E/S-Verhältnis = 12 U/g, $T = 40$ °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung, Identifizierung der Analyten mittels LC/MS)

In den enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen - nach Inkubation mit β -Galactosidase - sind Mono- bis Pentasaccharide (siehe Kapitel 4.3.2) messbar. Mit fortschreitendem Verlauf der enzymatischen Synthese erfolgt ein Abbau der Lactose (in Abb. 4-33 mit \blacklozenge dargestellt) und ein daraus resultierender Anstieg des Lactosehydrolysegrads sowie die Bildung der Monosaccharide Glucose (\bullet) und Galactose. Die Galactose wird zur Bildung der Tri- (\blacksquare), Tetra- (\blacktriangle) und Pentasaccharide (\blacksquare) genutzt und liegt somit zu einem deutlich geringeren Anteil als Glucose in der synthetisierten, GOS-haltigen Lösung vor. Aus diesem Grund wird auf eine explizite Betrachtung der Galactose verzichtet. Das Hauptreaktionsprodukt der enzymatischen Synthese ist ein Trisaccharid (nachfolgend als Haupt-Trisaccharid bezeichnet). Die enzymatisch gebildeten Tri- bis Pentasaccharide werden bei sinkendem Lactosegehalt durch das Enzym wieder abgebaut (siehe Abb. 4-33). Höhere GOS, wie Pentasaccharide, erreichen im Vergleich zu den Trisacchariden zu einem späteren Zeitpunkt die optimale Ausbeute und werden erst nach längerer Inkubationszeit abgebaut. Die Standardabweichung des gebildeten Haupt-Trisaccharids liegt zwischen 0,8 und 2,8 Flächenprozent der HPAEC-Analyse mit einem Variationskoeffizienten von 4,4 % bis 15,7 %.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der Prozessparameter für die GOS-Synthese mit Hilfe der β -Galactosidasen aus *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* und *Bacillus circulans* sowie die anschließenden Analysen der Endprodukte mittels LC/MS und NMR. Danach wurde ein direkter Vergleich der Reaktionsprodukte der drei eingesetzten Enzyme mittels HPAEC-PAD-, LC/MS- und NMR-Analyse durchgeführt.

4.3.1 Einflussfaktoren auf die GOS-Synthese

4.3.1.1 Einfluss des pH-Wertes auf die GOS-Synthese

Der Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische GOS-Synthese bzw. Lactosehydrolyse wurde anhand der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei pH 4 und pH 7 (siehe Abb. 4-34) untersucht.

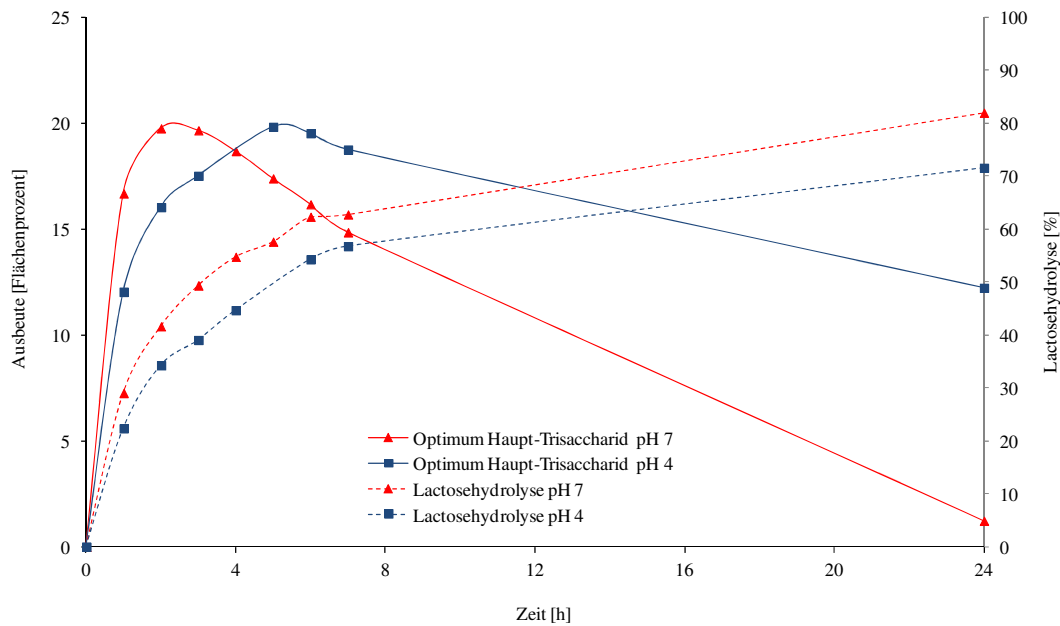


Abb. 4-34: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) und Lactosehydrolyse mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei pH 4 und pH 7 (n = 2, T = 40 °C, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Bei einem pH-Wert von 7,0 wurde die optimale Ausbeute des Haupt-Trisaccharids (19,7 Flächenprozent der HPAEC) nach ca. zwei Stunden mit einer Lactosehydrolyse von 41,6 % erreicht (siehe Abb. 4-34). Das Haupt-Trisaccharid-Optimum (19,8 Flächenprozent der HPAEC) bei pH 4,0 wurde nach ca. fünf Stunden und einer Lactosehydrolyse von 55,2 % gemessen. Der pH-Wert scheint somit nur einen sehr geringen Einfluss auf die Ausbeute des Haupt-Trisaccharids zu besitzen. Allerdings wird durch den geringeren pH-Wert die Lactosehydrolyse beschleunigt (siehe Abb. 4-34) und die Bildung höhermolekularer Zucker (Tetra- und Pentasaccharide) gefördert. Bei einem pH-Wert von 4,0 (nach zwei Stunden) wurden 6,1 Flächenprozent Tetrasaccharide und 0,5 Flächenprozent Pentasaccharide gebildet wohingegen bei pH 7,0 (nach fünf Stunden) nur 4,1 Flächenprozent bzw. 0,2 Flächenprozent detektiert werden konnten. Bei der Addition der Flächenprozent der HPAEC für Tri- bis Pentasaccharide ergibt sich eine Ausbeute von 24,3 % für pH 7,0 und von 27,0 % für pH 4,0. Entgegen den Herstellerangaben von einem optimalen pH-Wert von 6,0 für die Lactosehydrolyse scheint der optimale pH-Wert für die enzymatische GOS-Synthese bei

pH 4,0 zu liegen. Laut Herstellerangaben besitzt die β -Galactosidase aus *B. circulans* eine hohe pH-Stabilität, zeigt für die Lactosehydrolyse eine 100%ige Aktivität zwischen pH 5 und 9 sowie eine circa 70%ige Aktivität im pH-Bereich von 4 bis 10. Auf Grund der hohen pH-Stabilität ist daher eine GOS-Synthese bei pH 4,0 möglich.

Die Enzyme aus *K. lactis* und *A. oryzae* besitzen eine deutlich geringere pH-Stabilität. Die β -Galactosidase aus *K. lactis* zeigt bei einem pH-Wert von ca. 7,0 die höchste Aktivität für die Lactosehydrolyse. Die β -Galactosidase von *A. oryzae* besitzt die höchste Enzymaktivität zwischen pH 4,0 und 4,5. Daher wird für die enzymatische GOS-Synthese mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* ein pH-Wert von 7,0 [[Martinez-Villaluenga et al., 2008], [Foda and Lopez-Leiva, 2000] und [Rustom et al., 1998]] und für die β -Galactosidase aus *A. oryzae* ein pH-Wert von 4,5 [[Boon et al., 2000], [Chen et al., 2002], [Huerta et al., 2011] und [Matella et al., 2006]] genutzt.

4.3.1.2 Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese

Der Temperatureinfluss auf die enzymatische GOS-Synthese - insbesondere auf die Synthese des Haupt-Trisaccharids - wurde mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C, 50 °C und 60 °C analysiert (siehe Abb. 4-35).

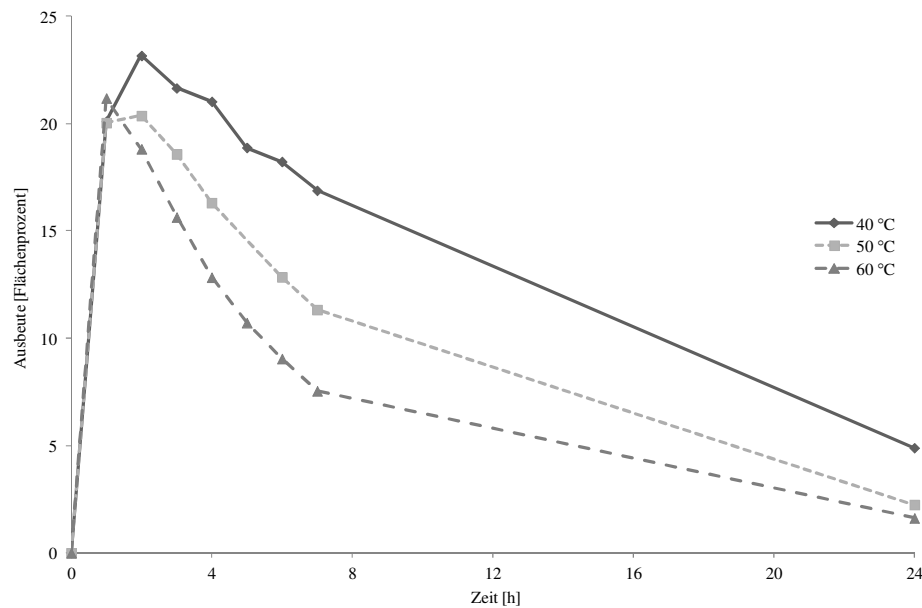


Abb. 4-35: Synthese der Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C, 50 °C und 60 °C (pH = 7,0, E/S-Verhältnis = 12 U/g, 40 % Ausgangslactose; Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Eine Temperatur von 40 °C liefert die größte Ausbeute des Haupt-Trisaccharids (siehe Abb. 4-35). Bei dieser Temperatur ist die Degradation des Trisaccharids am geringsten. Die optimale Ausbeute des Haupt-Trisaccharids fällt bis zu Stunde 24 auf 20,6 % des Optimumwertes ab, was im Vergleich zur Reaktion bei 50 °C (Abfall auf 10,9 %) und 60 °C (Abfall auf 7,6 %) der geringste Rückgang ist. Somit liefert eine Reaktion bei 40 °C die höchste Ausbeute an Haupt-Trisaccharid und die niedrigste Degradation dieses Analyten. Auf Versuche bei niedrigeren Temperaturen wurde verzichtet, da auf Grund der geringeren Lactoselöslichkeit keine höheren Ausbeuten zu erwarten waren [[Gosling et al., 2009] und [Boon et al., 2000]].

Die enzymatische GOS-Synthese mittels β -Galactosidase aus *K. lactis* erfolgt bei 40 °C [[Martinez-Villaluenga et al., 2008], [Rustom et al., 1998], [Chockchaisawasdee et al., 2005], [Ebrahimi et al., 2010] und [Usui et al., 1993]]. Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen GOS-Synthese mit β -Galactosidase aus *A. oryzae* wurde bei 40 °C und 50 °C untersucht. Wie auch Neri et al. [2009] festgestellt hat, ist die Temperaturabhängigkeit eher gering.

Eine Temperatur von 40 °C erweist sich für alle drei Enzyme als geeignet und wird in den nachfolgenden Untersuchungen genutzt.

4.3.1.3 Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses auf die GOS-Synthese

Der Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses auf die enzymatische GOS-Synthese wurde anhand der β -Galactosidase aus *A. oryzae* (siehe Abb. 4-36) und aus *K. lactis* (siehe Tab. 4-11) bei 6 U/g, 12 U/g und 24 U/g untersucht.

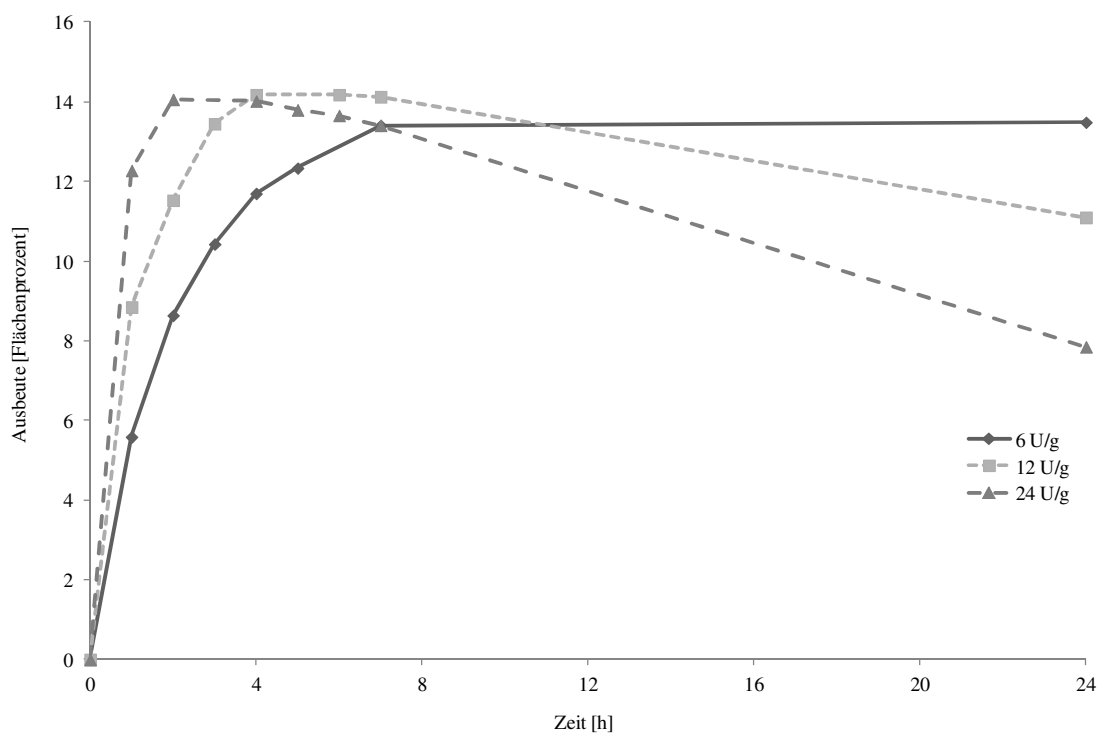


Abb. 4-36: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* („Tolerase“) bei 6 U/g, 12 U/g und 24 U/g (pH = 4,5, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose; Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Tab. 4-11: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* („Lactozym“) bei 6 U/g, 12 U/g und 24 U/g (40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Enzym- quelle	Prozessparameter des Optimums			t	Ausbeute des Haupt-Trisaccharids [Flächenprozent]
	pH	T	E/S-Verhältnis		
<i>K. lactis</i>	7,0	40 °C	6 U/g	7,0 h	11,1 %
	7,0	40 °C	12 U/g	6,0 h	11,5 %
	7,0	40 °C	24 U/g	4,0 h	11,7 %

Durch eine Veränderung des Enzym-Substrat-Verhältnisses wird die Ausbeute des Haupt-Trisaccharids, das mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* (siehe Abb. 4-36) oder *K. lactis* (siehe Tab. 4-11) gebildet wird, nur geringfügig verändert. Jedoch wird der Zeitpunkt der Bildung des Haupt-Trisaccharid-Optimums stark beeinflusst. Das Haupt-Trisaccharid-Optimum wird umso eher gebildet, je höher das Enzym-Substrat-Verhältnis ist. Dadurch wird der GOS-Abbau nach Erreichen des Optimums beschleunigt [ebenso [Martinez-Villaluenga et al., 2008], [Hellerova and Curda, 2009], [Rustom et al., 1998], [Foda and Lopez-Leiva, 2000] und [Chockchaisawasdee et al., 2005]].

Da die Bildung des Haupt-Trisaccharid-Optimums mit 24 U/g bzw. 6 U/g zu schnell bzw. zu langsam erfolgt, wird für alle weiteren Versuche ein Enzym-Substrat-Verhältnis von 12 U/g genutzt.

4.3.1.4 Vergleich der Enzympräparationen verschiedener Hersteller auf die GOS-Synthese

Anhand der β -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* wurde der Einfluss der Enzympräparationen von verschiedenen Herstellern auf die enzymatische GOS-Synthese analysiert (siehe Tab. 4-12).

Tab. 4-12: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit der β -Galactosidase aus *A. oryzae* oder *K. lactis* verschiedener Hersteller (40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Enzym- quelle	Hersteller	Prozessparameter des Optimums			t	Ausbeute des Haupt- Trisaccharids [Flächenprozent]
		pH	T	E/S- Verhältnis		
<i>K. lactis</i>	Novozymes A/S	7,0	40 °C	12 U/g	5,0 h	10,5 %
	Chr. Hansen A/S	7,0	40 °C	12 U/g	5,0 h	10,5 %
	DSM Nutritional Products GmbH	7,0	40 °C	12 U/g	3,0 h	10,4 %
<i>A. oryzae</i>	Extrakt Chemie Dr. Bruno Stellmach GmbH & Co. KG	4,5	40 °C	12 U/g	4,0 h	12,8 %
	DSM Nutritional Products GmbH	4,5	40 °C	12 U/g	4,0 h	14,2 %

Die Enzympräparate verschiedener Hersteller der β -Galactosidase aus *A. oryzae* oder *K. lactis* zeigen nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Ausbeute des Haupt-Trisaccharids (siehe Tab. 4-12). Dies ist analog zu den Beobachtungen von Boon et al. [2000].

4.3.1.5 Einfluss der vorherigen Wärmebehandlung des Enzympräparats auf die GOS-Synthese

Nach Mozaffar et al. [1985], Usui et al. [1993] und Fujimoto et al. [1998] besitzt die β -Galactosidase aus *B. circulans* drei Subtypen, die nach Vetere und Paoletti [1998] durch verschiedene pH- und Hitzestabilitäten voneinander unterscheidbar sind. Der Subtyp β -Galactosidase II überlebt als einziger Subtyp eine Hitzebehandlung von 60 °C und bildet v. a. β -(1→4)-verknüpfte Zuckeranalyten [Usui et al., 1993]. Somit sollten nach einer Erhitzung der β -Galactosidase aus *B. circulans* auf ca. 60 °C die Subtypen I und III inaktiviert werden. Nur Subtyp II, der u. a. 4'-Galactosyllactose (4'-GL) bildet, bleibt nach der Wärmebehandlung aktiv. Nach Gosling et al. [2009] kann dadurch die Ausbeute an GOS erhöht werden.

Das Enzym wurde, wie bei Gosling et al. [2009] beschrieben, im Wasserbad für 20 min bei 60 °C erhitzt. Danach wurde das Enzym abgekühlt, dem lactosereichen UF-Magermilchpermeat hinzugefügt und so die enzymatischen GOS-Synthese gestartet. Im Gegensatz zu Gosling et al. [2009] wurde durch die Wärmebehandlung das Enzym inaktiviert und keine GOS gebildet. Im nachfolgenden Versuch wurde die Temperatur von 60 °C auf 50 °C verringert. Bei dieser Temperatur blieb das Enzym aktiv und die enzymatische GOS-Synthese verlief erfolgreich. Im Vergleich zu dem nicht hitzebehandelten Enzym lag die Ausbeute des Haupt-Trisaccharids nur um ca. 1,5 Flächenprozent der HPAEC höher. In einem weiteren Versuch erfolgte nach der Zugabe des Enzyms zum lactosereichen UF-Magermilchpermeat die Erhitzung für 20 min bei 60 °C. Im Anschluss wurde die Mischung abgekühlt und die Enzymreaktion gestartet. Dabei konnte im Vergleich zu dem nicht hitzebehandelten Enzym keine Steigerung der Ausbeute gemessen werden. Eine Erhöhung der Ausbeute von ca. 15 % - wie bei Gosling et al. [2009] beschrieben - konnte dabei nicht erreicht werden.

4.3.1.6 Einfluss des gleichzeitigen Einsatzes von zwei Enzymen auf die GOS-Synthese

Der gleichzeitige Einsatz zweier β -Galactosidasen zur Ausbeutesteigerung der GOS-Synthese im Vergleich zur Synthese mit einem Enzym wurde untersucht. Bemerkenswert ist, dass die β -Galactosidasen aus *K. lactis* und *A. oryzae* Haupt-Trisaccharide mit einer Retentionszeit von 23,6 min bilden, wohingegen die β -Galactosidase aus *B. circulans* ein Haupt-Trisaccharid bei 33,3 min synthetisiert. Durch den gleichzeitigen Einsatz der verschiedenen β -Galactosidasen (β -Galactosidasen aus *B. circulans* und *K. lactis* vs. β -Galactosidasen aus *B. circulans* und *A. oryzae*) sollten demnach beide Trisaccharide synthetisiert und die GOS-Ausbeuten erhöht werden. Dazu wurden die verschiedenen β -Galactosidasen zu unterschiedlichen Reaktionszeitpunkten (meist zum Optimum des zuerst eingesetzten Enzyms) hinzugegeben und mit der Bildung des Haupt-Trisaccharids, das mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* synthetisiert wurde, verglichen (siehe Abb. 4-37).

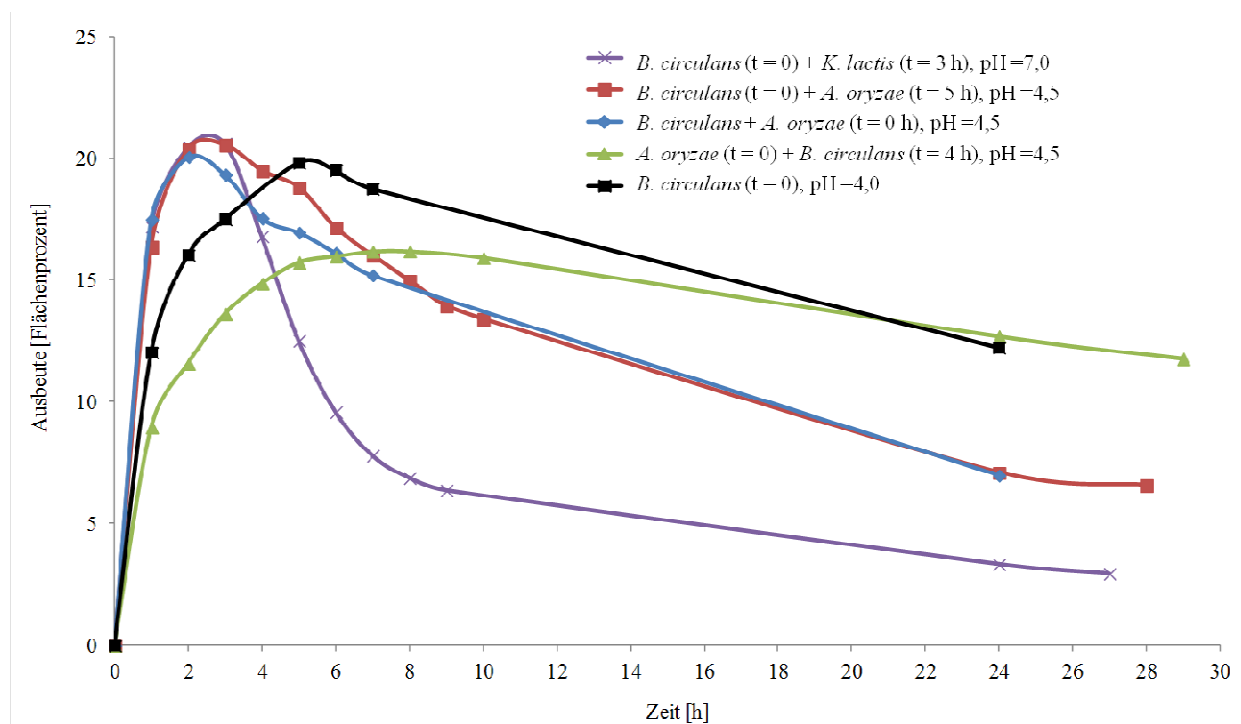


Abb. 4-37: Synthese der Haupt-Trisaccharide (Summe der Trisaccharide bei 23,6 min und bei 33,3 min) mit Hilfe der β -Galactosidasen aus *B. circulans*, *A. oryzae* und *K. lactis* (T = 40 °C, E/S-Verhältnis: je eingesetztem Enzym 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* konnten 19,8 Flächenprozent der HPAEC (siehe Abb. 4-37) des Haupt-Trisaccharids bei 33,3 min gemessen werden. Ausgehend von dem Gehalt der Trisaccharide ($R_t = 23,6$ min) mit dem Einsatz von nur einem Enzym (β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae*) wurde ein Anstieg je nach Enzym von 10,5 % bis 14,0 % (siehe Kapitel 4.3.1.7) erwartet. Durch den gleichzeitigen Einsatz eines zweiten Enzyms konnte der Gehalt - bezogen auf die Summe der Trisaccharide bei 23,6 min und 33,3 min - um maximal 0,8 Flächenprozent erhöht werden.

Daher wurde die Bildung der Trisaccharide bei 23,6 min und bei 33,3 min mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* nach Zugabe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* nach fünf Stunden bzw. zum Zeitpunkt Null näher untersucht (siehe Abb. 4-38).

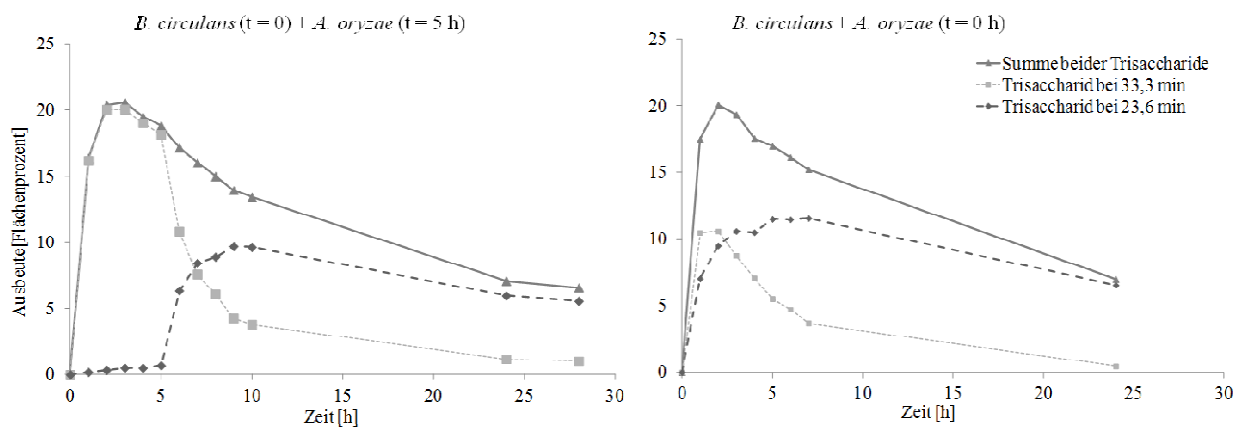


Abb. 4-38: Synthese der Trisaccharide bei 23,6 min und bei 33,3 min sowie deren Summe während der GOS-Herstellung mit den β -Galactosidasen aus *B. circulans* und *A. oryzae* (Zusatz nach 5 Stunden bzw. 0 Stunden) [T = 40 °C, E/S-Verhältnis: je eingesetztem Enzym 12 U/g, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung]

Nach fünf Stunden - der optimalen Reaktionszeit der GOS-Synthese mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* - wurde die β -Galactosidase aus *A. oryzae* zu diesem GOS-Reaktionsgemisch hinzugegeben. Dadurch erfolgt der Abbau des bisher gebildeten Trisaccharids bei 33,3 min und die Synthese des Trisaccharids bei 23,6 min (siehe Abb. 4-38,

links). Somit ist die erwartete Ausbeuteerhöhung der Summe der beiden Trisaccharide nicht eingetreten.

Bei der Zugabe der Enzyme zum Zeitpunkt Null werden die zwei Trisaccharide nur bis ca. 10 Flächenprozent der HPAEC gebildet, bevor ein Abbau der Analyten erfolgt (siehe Abb. 4-38, rechts). Die Summe beider Trisaccharide liegt bei ca. 20 Flächenprozent und damit in einem ähnlichen Bereich wie bei der Synthese des Haupt-Trisaccharids mit nur einem Enzym (β -Galactosidase aus *B. circulans*).

Die GOS-Ausbeute kann durch den gleichzeitigen Einsatz zweier β -Galactosidasen somit nicht erhöht werden.

4.3.1.7 Vergleich der GOS-Synthesen mit β -Galactosidasen verschiedener Enzymherkünfte

Der Einfluss der Enzymherkunft auf die enzymatische GOS-Synthese wurde anhand der β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* und *Bacillus circulans* (siehe Abb. 4-39) mit den bisher optimierten Parametern untersucht.

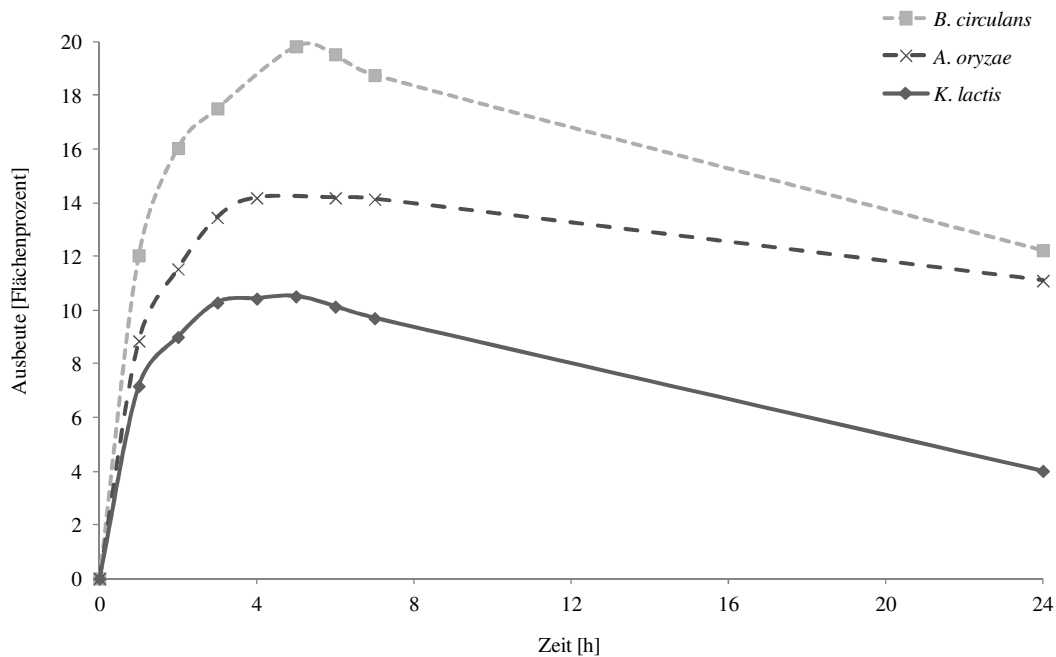


Abb. 4-39: Synthese des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (pH 4,5, „Tolerase“) oder *B. circulans* (pH 4) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat). Ausbeute des Haupt-Trisaccharids in relative Flächenprozenten des HPAEC-Chromatogramms, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Die höchste Ausbeute des Haupt-Trisaccharids konnte durch die enzymatische Synthese mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* detektiert werden. Dabei wurden nach fünf Stunden 19,8 Flächenprozent und nach 24 h 12,2 Flächenprozent der HPAEC gebildet (siehe Abb. 4-39). Mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* konnten nach vier Stunden 14,2 Flächenprozent der HPAEC gemessen werden. Ein Trisaccharidgehalt von 11,1 % wurde nach 24 h detektiert (siehe Abb. 4-39). Der geringste Gehalt an Trisacchariden (10,5 Flächenprozent der HPAEC) konnte unter Verwendung der β -Galactosidase aus *K. lactis* nach fünf Stunden gemessen werden. Nach 24 h wurde ein Trisaccharidgehalt von 4,0 Flächenprozent detektiert (siehe Abb. 4-39). Die verschiedenen Enzymquellen weisen unterschiedliche Reaktionsoptima für das jeweilige Haupt-Trisaccharid sowie eine unterschiedlich schnelle Degradation dieses Trisaccharids auf. Neben dem Haupt-Trisaccharid werden noch weitere GOS - v. a. Tetra- und Pentasaccharide - gebildet, die mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe Abb. 4-40) und der HPAEC-PAD/IT-MS (siehe Kapitel 4.3.2) detektiert werden können.

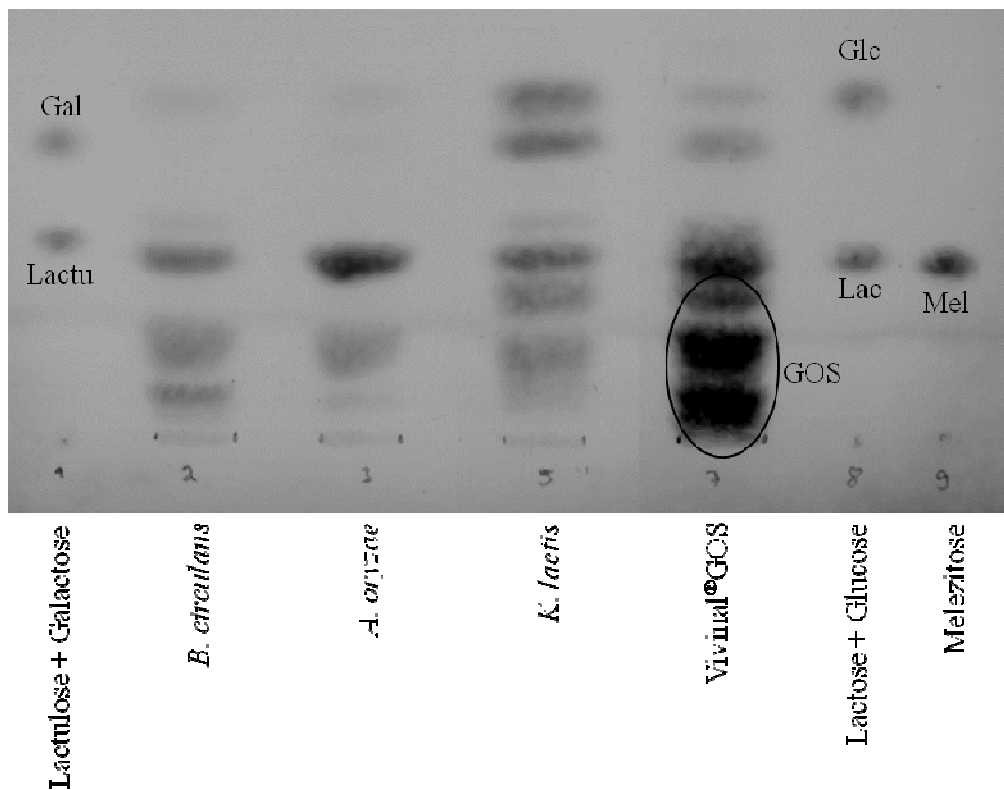


Abb. 4-40: Zucker-DC der mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (t = 5 h, pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (t = 4 h, pH 4,5, „Tolerase“) und *B. circulans* (t = 5 h, pH 4) enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C; 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* synthetisierte, GOS-haltige Lösung wies nach densitometrischer Auswertung der Zucker-DC folgende Zusammensetzung auf: 5,6 % Glucose, 31,3 % Lactose, 59,9 % GOS und 3,2 % andere Zucker. Ausgehend von einer Zuckerzusammensetzung von nahezu 100 % Lactose im Ausgangssubstrat, wurden 68,6 % der Lactose abgebaut. Demnach sollten ca. 34 % beider Monosaccharide entstanden sein. Da die Gehalte an Monosacchariden in der synthetisierten, GOS-haltigen Lösung deutlich geringer waren, kann von einer erfolgreichen GOS-Synthese ausgegangen werden. Dies kann durch die ermittelte Zuckerzusammensetzung mit einem Anteil von ca. 60 % GOS bestätigt werden.

Die mittels der β -Galactosidase aus *A. oryzae* synthetisierte, GOS-haltige Lösung bestand zu 4,2 % aus Glucose, zu 62,7 % aus Lactose und zu 33,1 % aus GOS. Die Lactosehydrolyse verlief - sichtbar an den höheren Lactosewerten - langsamer als bei der Reaktion mit der

β -Galactosidase aus *B. circulans*. Somit wurden weniger Monosaccharide gebildet, woraus sich eine geringere GOS-Ausbeute ergibt.

Die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* enzymatisch synthetisierte, GOS-haltige Lösung wies folgende Zuckerzusammensetzung auf: 18,8 % Glucose, 16,9 % Galactose, 19,2 % Lactose, 41,1 % GOS und 4,0 % andere Zucker. Die Lactosehydrolyse war bei dieser enzymatischen Reaktion stark ausgeprägt und hatte einen hohen Gehalt an Glucose und Galactose zur Folge. Bei einer Lactosehydrolyse von 80,8 % sollten ca. 40 % der beiden Monosaccharide gebildet werden. Da der Monosaccharidgehalt in der synthetisierten, GOS-haltigen Lösung circa um die Hälfte niedriger lag, kann von einer erfolgreichen Synthese der GOS ausgegangen werden. Dies kann durch eine GOS-Ausbeute von ca. 41,1 % bestätigt werden.

Den höchsten GOS-Reinheitsgrad kann nach Auswertung der Zucker-DC mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* (59,9 %) erreicht werden. Die β -Galactosidase aus *A. oryzae* und *K. lactis* zeigen eine GOS-Reinheit von 33,1 % bzw. 41,1 %.

Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der Zucker-DC werden die GOS als Gesamtheit aller Kohlenhydrate außer Glucose, Galactose und Lactose definiert. Demnach gehören Disaccharide ebenfalls zur Klasse der GOS. Dabei ist es möglich, dass zu Lactose isomere Disaccharide von Lactose nicht getrennt werden können und daher im gleichen Spot eluieren. Dies könnte zu einer Beeinträchtigung der Erkenntnisse der Analysen führen. Aus diesem Grund kann die densitometrische Auswertung der Zucker-DC nur als Schnellmethode angesehen werden.

Mit Hilfe der Zucker-DC ist keine Berechnung von absoluten Konzentrationen möglich. Auf Grund der fehlenden GOS-Standards ist ebenso keine Quantifizierung mittels HPAEC-PAD/IT-MS möglich. Nach Gosling et al. [2011] und Roberts and Pettinati [1957] kann die GOS-Konzentration aus der Differenz zwischen der Ausgangslactosekonzentration und der Summe der Konzentrationen von Glucose, Galactose und Lactose in der Reaktionslösung berechnet werden. Die prozentuale GOS-Ausbeute kann durch das Verhältnis der GOS-Konzentration zum Ausgangslactosegehalt ermittelt werden (siehe Kapitel 6.2.3 im Anhang). Die erforderlichen Daten und berechneten GOS-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 4-13: Optimale Ausbeute des Haupt-Trisaccharids (GOS) mit den β -Galactosidasen aus *K. lactis* (pH 7,0, „Lactozym“), *A. oryzae* (pH 4,5, „Tolerase“) und *B. circulans* (pH 4,0) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Berechnung der GOS-Konzentration [g/100ml] aus der Differenz zwischen dem Ausgangslactosegehalt und der Summe aus Glucose-, Galactose- und Lactosekonzentration, in Klammern: GOS-Konzentration nach Abzug der Disaccharide, Analyse: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Enzymquelle	Haupt-Trisaccharid [Flächenprozent der HPAEC]	c _{ini} (Lac) [g/100ml]	c(Lac) [g/100ml]	c(Glc) [g/100ml]	c(Gal) [g/100ml]	c(GOS) [g/100ml]	GOS-Ausbeute [%]	Lactosehydrolysegrad [%]
<i>K. lactis</i> (5 h, pH 7,0)	10,5	44,18	7,87	13,14	7,74	15,43	34,93 (3,00)	82,19
<i>A. oryzae</i> (4 h, pH 4,5)	14,2	38,37	25,69	4,06	0,76	7,86	20,48 (19,71)	33,05
<i>B. circulans</i> (5 h, pH 4,0)	19,8	40,04	17,93	5,57	0,12	16,42	40,98 (40,48)	55,22

Die höchste GOS-Ausbeute konnte mit 41,0 % mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* detektiert werden. Die Ausbeuten der GOS-Synthese mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. *A. oryzae* lagen bei 34,9 % bzw. 20,5 % (siehe Tab. 4-11). Durch die oben dargestellte Berechnung wurden - ähnlich wie bei der densitometrischen Auswertung der Zucker-DC - GOS als Gesamtheit aller Kohlenhydrate außer Glucose, Galactose und Lactose definiert. Werden GOS als Kohlenhydrate mit mindestens drei Zuckermonomeren definiert, sind die Disaccharide störende Analyten, die das GOS-Ergebnis verfälschen könnten. Durch den Abzug der zu Lactose isomeren Disaccharide - berechnet mittels HPAEC-PAD-Analyse und externer Lactose-Kalibrierung - wurden die GOS-Ausbeuten angepasst. Dadurch konnten GOS-Ausbeuten von 40,5 % mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans*, gefolgt von 19,7 % aus *A. oryzae* und 3,0 % aus *K. lactis* detektiert werden. Die berechneten GOS-Ausbeuten stimmen mit den Literaturwerten überein [β -Galactosidase aus *B. circulans*: Gosling et al. [2009], Gosling et al. [2011], Palai et al. [2012] und Valero [2009], β -Galactosidase aus *A. oryzae*: Rustom et al. [1998], Chen et al. [2002] und Matella et al. [2006], β -Galactosidase aus *K. lactis*: Martinez-Villaluenga et al. [2008], Foda and Lopez-Leiva [2000], Rustom et al. [1998], Chockchaisawasdee et al. [2005] und Mozaffar et al. [1985]].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die höchste GOS-Ausbeute mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C, 12 U/g und pH 4 synthetisiert werden konnte (19,8 Flächenprozent der HPAEC des Haupt-Trisaccharids, 40,5 % GOS - ohne Berücksichtigung von Disacchariden). Mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* konnten bei optimierten Prozessbedingungen (40 °C, 12 U/g und pH 4,5) 14,2 Flächenprozent der HPAEC des Haupt-Trisaccharids und 19,7 % GOS gebildet werden. Die GOS-Synthese mittels der β -Galactosidase aus *K. lactis* erfolgte bei 40 °C, 12 U/g und pH 7,0. Dabei konnten 10,5 Flächenprozent der HPAEC des Haupt-Trisaccharids und 3,0 % GOS synthetisiert werden. Eine deutliche Ausbeuteerhöhung der GOS konnte durch die Hitzebehandlung des Enzyms sowie durch den gleichzeitigen Einsatz zweier β -Galactosidasen nicht erreicht werden. Die hergestellten, GOS-haltigen Lösungen könnten auf Grund ihres großen Anteils an Tri- bis Pentasacchariden als funktionelle Inhaltsstoffe in Lebensmitteln eingesetzt werden.

4.3.2 Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels Massenspektrometrie

Zusätzlich zu der Charakterisierung der Kohlenhydratanalyten der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen mit HPAEC-PAD erfolgte eine direkte Identifizierung der GOS-Zusammensetzung mittels LC/MS. Die Darstellung der HPAEC-Chromatogramme der synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen, die bei optimierten Prozessbedingungen mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis*, *A. oryzae* oder *B. circulans* gebildet worden sind, erfolgt in Abb. 4-41.

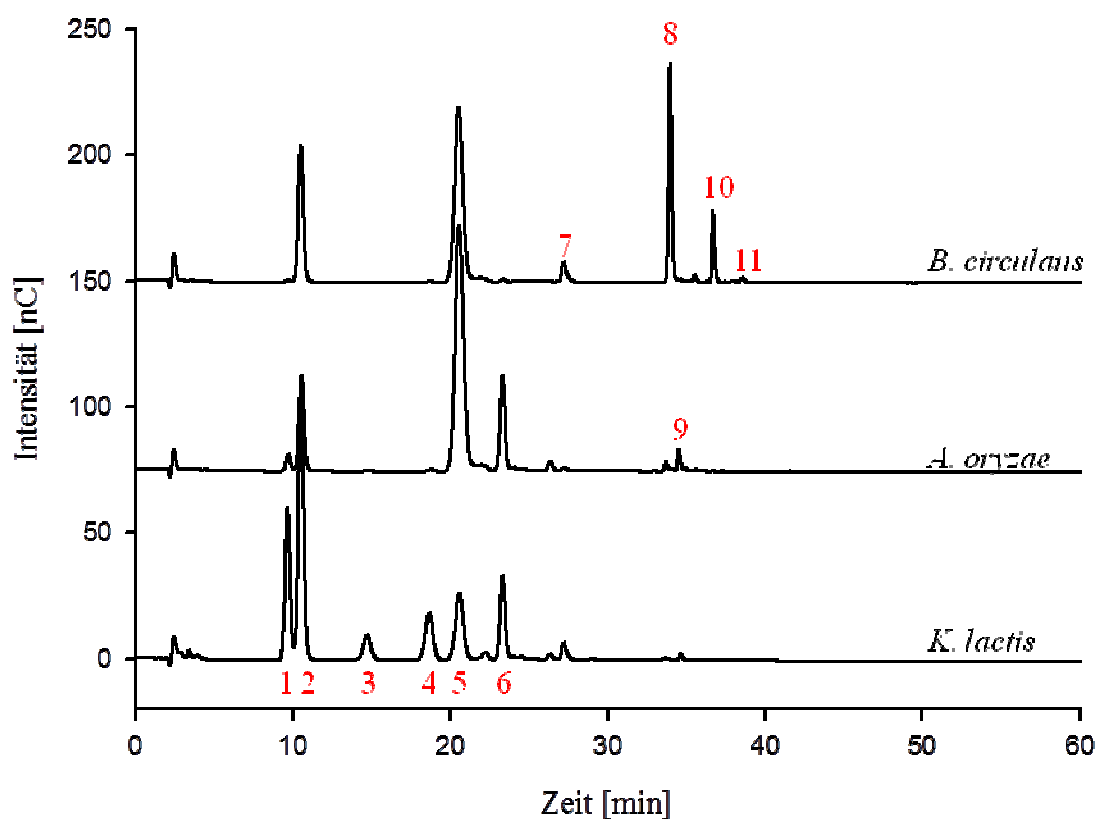


Abb. 4-41: HPAEC-Chromatogramme der synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (t = 5 h, pH 7, „Lactozym“), *A. oryzae* (t = 4 h, pH 4,5, „Tolerase“) oder *B. circulans* (t = 5 h, pH 4) (E/S-Verhältnis = 12 U/g, T = 40 °C, 40 % Ausgangslactose, Substrat: UF-Magermilchpermeat, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung)

Durch den Einsatz der β -Galactosidasen aus verschiedenen Enzymherkünften (*K. lactis* vs. *A. oryzae* vs. *B. circulans*) resultiert die Bildung unterschiedlicher GOS-Muster (siehe

Abb. 4-41). Insgesamt können elf Analyten detektiert werden, die mittels LC/MS (siehe Tab. 4-14) identifiziert wurden.

Tab. 4-14: HPAEC-Retentionszeit, Molekulargewicht (gemessen und theoretisch) sowie vermutete Substanz der einzelnen Analyten aus Abb. 4-41 der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen

Peak- nummer aus Abb. 4-41	Retentionszeit (HPAEC)	Gemessenes Molekulargewicht (Lithiumaddukt)	Theoretisches Molekulargewicht (Lithiumaddukt)	Vermutete Substanz
1	9,8 min	187,1	187,1	Monosaccharid (Galactose)
2	10,7 min	187,1	187,1	Monosaccharid (Glucose)
3	15,1 min	349,1	349,3	Disaccharid
4	19,2 min	349,1	349,3	Disaccharid
5	21,0 min	349,1	349,3	Disaccharid (Lactose)
6	23,6 min	511,2	511,4	Trisaccharid
7	27,5 min	349,1	349,3	Disaccharid
8	33,3 min	511,2	511,4	Trisaccharid
9	34,8 min	673,2	673,6	Tetrasaccharid
10	35,9 min	673,2	673,6	Tetrasaccharid
11	37,7 min	835,3	835,7	Pentasaccharid

Die Analyten Galactose (Abb. 4-41 bzw. Tab. 4-14: Peak-Nr. 1), Glucose (Peak-Nr. 2) und Lactose (Peak-Nr. 5) können mit Hilfe der LC/MS identifiziert und durch externe Standards bestätigt werden. Die Disaccharide bei 15,1 min (Peak-Nr. 3) und 19,2 min (Peak-Nr. 4) können in erhöhter Konzentration nur in der GOS-haltigen Lösung detektiert werden, die mit

der β -Galactosidase aus *K. lactis* hergestellt wurde. Auffallend ist, dass das mittels der β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae* gebildete Haupt-Trisaccharid eine Retentionszeit von 23,6 min (Peak-Nr. 6) aufweist. Im Gegensatz dazu wird das Haupt-Trisaccharid aus der Synthese mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei einer Retentionszeit von 33,3 min (Peak-Nr. 8) detektiert. Durch die β -Galactosidasen verschiedener Enzymherkünfte werden somit Trisaccharide mit unterschiedlichen glycosidischen Verknüpfungen gebildet. Nach Rodriguez-Colinas et al. [2012], Martinez-Villaluenga et al. [2008], Urrutia et al. [2013], Gosling et al. [2009] und Suwasono [2003] werden β -(1 \rightarrow 6)-Verknüpfungen mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae* sowie β -(1 \rightarrow 4)-Verknüpfungen mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* gebildet. Als Hauptreaktionsprodukt wird die Bildung von 6'-GL mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae* sowie die Synthese von 4'-GL mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* sichtbar [[Martinez-Villaluenga et al., 2008], [Gosling et al., 2009] und [Suwasono, 2003]]. Dies wird durch den Vergleich entsprechender HPAEC-Analysendaten bestätigt (siehe Abb. 4-41). Außerdem können Tetrasaccharide bei 34,8 min (Peak-Nr. 9) und 35,9 min (Peak-Nr. 10) sowie ein Pentasaccharid bei 37,7 min (Peak-Nr. 11) in den GOS-haltigen Lösungen detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die enzymatische GOS-Synthese mittels der β -Galactosidase aus *K. lactis* hohe Mengen an Di- und Trisacchariden sowie geringe Mengen an Tetrasacchariden gebildet werden. Mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* werden hauptsächlich Tri- und Tetrasacchariden synthetisiert. Die höchsten Gehalte an Tri- bis Pentasacchariden werden durch die β -Galactosidase aus *B. circulans* generiert. Anhand der genutzten MS-Technik kann eine Aussage über die Molekülmasse des untersuchten Analyten getroffen werden. Durch die Fragmentierungen können zudem Anzahl und Molekülmassen der Monomere bestimmt werden. Eine Aussage über die glycosidische Verknüpfung ist nicht möglich. Zur weiteren Identifizierung der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen sind weitere Analysemethoden - wie eine Untersuchung mittels NMR (siehe Kapitel 4.3.3) - notwendig.

4.3.3 Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels NMR

Die enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen wurden nach den chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen mittels NMR analysiert.

Dazu wurden zunächst Galactose, Glucose und Lactose mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.4.2) von den höhermolekularen GOS - Tri- bis Pentasaccharide - abgetrennt. Der Lactosegehalt konnte von 17,8 % bis 66,9 % (bezogen auf den Gesamtzuckergehalt, abhängig von der jeweiligen GOS-haltigen Lösung) auf unter 1 % reduziert werden. Der GOS-Anteil am Gesamtzuckergehalt liegt über 99 % (siehe Kapitel 4.4.2). Nach einer weiteren Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie im Forschungszentrum Borstel konnten folgende Proben für eine NMR-Untersuchung gewonnen werden:

GOS1-1: mittels des mit β -Galactosidase aus *K. lactis* hergestelltem Trisaccharids

($R_t = 23,6$ min, Peak Nr. 6, siehe Tab. 4-14)

GOS2-1: mittels des mit β -Galactosidase aus *B. circulans* hergestelltem Trisaccharids

($R_t = 33,3$ min, Peak Nr. 8, siehe Tab. 4-14)

GOS2-2: mittels des mit β -Galactosidase aus *B. circulans* hergestelltem Tetrasaccharids

($R_t = 35,9$ min, Peak Nr. 10, siehe Tab. 4-14)

GOS2-3: mittels des mit β -Galactosidase aus *B. circulans* hergestelltem Pentasaccharids

($R_t = 37,7$ min, Peak Nr. 11, siehe Tab. 4-14)

Nach den Untersuchungen mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und GLC-MS (im Forschungszentrum Borstel) können folgende Glucose/Galactose-Verhältnisse ermittelt werden: 1:2 für GOS1-1 und GOS2-1, 1:3 für GOS2-2 und 1:4 für GOS2-3. Außerdem können 6-substituierte, terminale Hexosen in GOS1-1 und 4-substituierte, terminale Hexosen in GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 nachgewiesen werden. Die mittels NMR identifizierten Verbindungen sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Die Darstellungen des $^1\text{H-NMR}$ sowie der chemischen Verschiebungen erfolgt im Anhang in Abb. 6-5 sowie Tab. 6-8 bis Tab. 6-11.

GOS1-1: β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glcp-red.

GOS2-1: β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glcp-red.

GOS2-2: β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glcp-red.

GOS2-3: β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glcp-red.

Abb. 4-42: Struktur der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 nach Analyse mittels ^1H NMR, ^{13}C NMR und GLC-MS

Mittels NMR-Analyse können - wie im Kapitel 4.3.2 bereits vermutet - die Synthese von β -(1→6)-Verkürpfungen mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. β -(1→4)-Verkürpfungen mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* bestätigt werden. Die Hauptprodukte aus der GOS-Synthese sind demnach 6'-GL bei der Reaktion mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. 4'-GL bei der Reaktion mit der β -Galactosidase aus *B. circulans*. Damit können die Beobachtungen von Rodriguez-Colinas et al. [2012], Martinez-Villaluenga et al. [2008], Urrutia et al. [2013], Gosling et al. [2009] und Suwasono [2003] bestätigt werden. Die NMR-Analyse der GOS-Produkte, die durch die β -Galactosidase aus *A. oryzae* gebildet wurden, steht noch aus. Auf Grund der ähnlichen Retentionszeiten des mittels der β -Galactosidase aus *A. oryzae* gebildeten Haupt-Trisaccharids im Vergleich zu dem Haupt-Trisaccharid aus der Reaktion mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* (siehe Abb. 4-41) ist zu vermuten, dass beide Enzyme β -(1→6)-Verkürpfungen synthetisieren.

Durch die Analyse mittels NMR kann die enzymatische Synthese von 6'-GL mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* und von 4'-GL mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe von β -Galactosidasen und optimierten Prozessbedingungen (siehe Kapitel 4.3.1) GOS in den für ein funktionelles Lebensmittel benötigten Mengen synthetisiert werden können. Als Hauptreaktionsprodukt entsteht dabei v. a. Galactosyllactose (je nach Enzymherkunft: 4'-GL oder 6'-GL) (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.3).

4.3.4 Reaktion der milcheigenen Oligosaccharide mit β -Galactosidasen

Bei der Herstellung lactosefreier Milch wird das Enzym β -Galactosidase genutzt, um die Lactose in deren Monosaccharide zu spalten. Dabei werden nach Ruiz-Matute et al. [2012] abhängig vom Milchprodukt 6,0 g/100ml bis 43,5 g/100ml GOS gebildet. Der Einfluss der genutzten β -Galactosidasen auf die in der Milch vorhandenen OS wurde noch nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde UF-Magermilchpermeat mit β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. *B. circulans* versetzt und der Einfluss auf den MOS-Gehalt während der enzymatischen Reaktion analysiert (siehe Abb. 4-43).

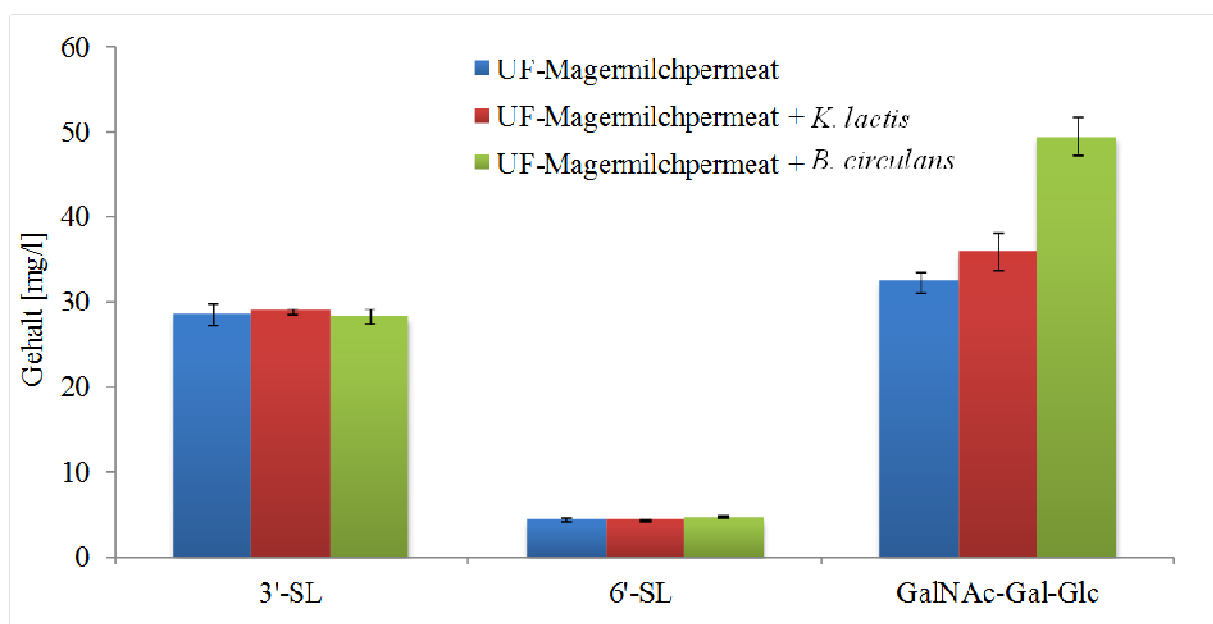


Abb. 4-43: Gehalte der Oligosaccharide GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL im UF-Magermilchpermeat und mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* bzw. *B. circulans* behandeltem UF-Magermilchpermeat (t = 3 h, pH 6,6, 300 U/g, T = 40 °C, keine weitere Aufzuckerung des Substrates), Probenaufarbeitung: GCC-SPE (n = 2)

Die sauren Oligosaccharide 6'-SL und 3'-SL der Milch wurden durch die Behandlung des UF-Magermilchpermeats mit den verschiedenen β -Galactosidasen zu 97,8 % bis 108,8 % wiedergefunden (siehe Abb. 4-43). Es finden somit weder Abbau noch Synthese statt. Die Interaktion zwischen den β -Galactosidasen und den Sialyllactosen ist gering. Dies könnte entweder auf den sauren Charakter der Oligosaccharide oder auf den N-terminale Glucose-Rest zurückzuführen sein. Dieser N-terminale Glucose-Rest scheint von β -Galactosidasen

nicht genutzt werden zu können, da das Enzym einen freien, N-terminalen Galactose-Rest zur Reaktion benötigt (siehe Kapitel 2.5.1, insbesondere Abb. 2-13). Eine reine Galactosespezifität der β -Galactosidase ist jedoch nicht belegt.

Das Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc wurde bei der Reaktion von UF-Magermilchpermeat mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* zu 110,6 % wiedergefunden (siehe Abb. 4-43). Dieses milcheigene Oligosaccharid wird daher nicht durch die β -Galactosidase abgebaut, wobei der N-terminale Glucose-Rest für diese fehlende Reaktion verantwortlich sein könnte. Bei der Reaktion des UF-Magermilchpermeats mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* ist bemerkenswert, dass das Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc zu 152,5 % wiedergefunden werden konnte (siehe Abb. 4-43). Dieser Zucker wird nicht abgebaut, sondern während der enzymatischen Reaktion synthetisiert. Bei der Anwesenheit von Lactose und einem freien GalNAc-Monomer in der Milch scheint durch β -Galactosidase die Synthese von GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc möglich.

Bei der Reaktion mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* kommt es zur Bildung von 6'-GL, Disacchariden und einem geringen Anteil an Tetrasacchariden. Nach der enzymatischen GOS-Synthese mit diesem Enzym war die Bildung der oben aufgeführten Zucker zu erwarten (siehe Kapitel 4.3.2). Analog zur enzymatischen GOS-Synthese mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* (siehe Kapitel 4.3.2) werden 4'-GL, 6'-GL sowie das Tetrasaccharid Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc gebildet.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die quantifizierbaren MOS in Kuhmilch durch β -Galactosidasen nur geringfügig beeinflusst werden.

4.4 Aufreinigung von Oligosacchariden

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden entwickelt (siehe Kapitel 4.1) und diese Methoden auf verschiedene OS-haltige Proben angewandt (siehe Kapitel 4.2). Vor dem Hintergrund potentiell funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe zu entwickeln, wurden GOS durch die enzymatische Synthese mit β -Galactosidase hergestellt (siehe Kapitel 4.3). Auf Grund der nicht unwesentlichen Mengen an Oligosacchariden in Kuhmilch (siehe Kapitel 4.2.1), scheinen sich auch MOS für die Entwicklung eines potentiell funktionellen Lebensmittels zu eignen. Dazu muss Lactose - wegen des schlechten Lactose-MOS-Verhältnisses (siehe Kapitel 4.2.1) - von den MOS abgetrennt werden. Dies soll mit der großtechnisch durchführbaren Nanofiltration (siehe Kapitel 4.4.1) erfolgen.

Des Weiteren müssen die durch Nanofiltration erzeugten, aufgereinigten, MOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1) und die erhaltenen, GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.3) bis zu einem Restlactosegehalt von unter 1 % aufgereinigt werden. Dies ist notwendig, um orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung (siehe Kapitel 4.5) durchführen zu können. Die notwendige Aufreinigung auf unter 1 % Restlactosegehalt erfolgt anhand einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.4.2).

4.4.1 Aufreinigung der Oligosaccharide mittels Nanofiltration

Zur Aufreinigung der Kuhmilch-Oligosaccharide sollen Verfahren der Nanofiltration genutzt werden, da diese eine großtechnische Herstellung des funktionellen Lebensmittels ermöglichen. Dazu sollen Vorversuche mit MOS-haltigen Proben im Dead-End- und Cross-Flow-Modus durchgeführt werden (siehe Kapitel 4.4.1.1). Anschließend folgen Versuche im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2). Dabei werden die ersten Versuche mit GOS-haltigen Proben durchgeführt (siehe Kapitel 4.4.1.2.1), da diese höhere OS-Konzentrationen als MOS-haltige Proben aufweisen und damit besser analysierbar sind. Anschließend werden die in Kapitel 4.4.1.2.1 gewonnen Erkenntnisse mit GOS-haltigen Probe auf Versuche mit MOS-haltigen Proben angewendet (siehe Kapitel 4.4.1.2.2). Nach der erfolgreichen MOS-Aufreinigung im Labormaßstab werden Versuche im Technikumsmaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.3) und im großtechnischen Maßstab (siehe Kapitel 4.4.1.4) durchgeführt.

4.4.1.1 Vorversuche der Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben im Dead-End- und Cross-Flow-Modus

Die ersten Versuche zur Trennung zwischen Lactose und MOS mittels Nanofiltration erfolgten im Dead-End-Modus durch Zentrifugation (2000 RZB, 10 h) einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilchprobe. Dabei wurden verschiedene Membranen (Cut-off: 0,5 kDa und 1 kDa, Hersteller: Merck & Co., Inc., Material: regenerierte Cellulose) verwendet. Bei einer erfolgreichen Nanofiltration sollten Mono- und Disaccharide ins Eluat übergehen und MOS im Überstand zurückzuhalten werden. Unter Verwendung der 1 kDa-Membran sind alle Zucker - Lactose und MOS - in das Eluat übergegangen. Eine Aufreinigung der MOS kann dagegen mit der 0,5 kDa-Membran erreicht werden. Demnach ist die Wahl der Membran, insbesondere der Cut-off-Größe, für die Trennung von Lactose und MOS entscheidend.

Nach Sarney et al. [2000] kann die Trennungsqualität verbessert werden, wenn der Überstand der Membran mehrfach mit Wasser gewaschen wird. Dementsprechend wurde eine entfettete und weitgehend proteinfreie Kuhmilch durch eine 1 kDa-Membran (Hersteller: Pall GmbH, Material: modifiziertes PES) zentrifugiert und der Überstand mehrfach gewaschen (siehe Kapitel 3.7.1.1). Auf diese Weise konnte der Lactosegehalt im Überstand stark reduziert und die MOS deutlich aufgereinigt werden. Das Lactose-MOS-Verhältnis kann signifikant zu Gunsten der MOS verbessert werden. Die sauren MOS scheinen dabei besser zurückgehalten zu werden als neutrale MOS. Eine Trennung zwischen Lactose und MOS durch Nanofiltration scheint mittels Dead-End-Filtration möglich.

Bei Vorversuchen mit einer Cross-Flow-Membran (Bezeichnung: MinimateTM TFF Capsule, Material: modifiziertes PES, NMWCO: 650 Da, Hersteller: Pall GmbH) konnten die MOS in einer entfetteten und weitgehend proteinfreien Kuhmilch durch Waschen um ca. den Faktor 18 im Überstand der Membran aufgereinigt und Lactose zum Großteil abgetrennt werden. Dabei ging ein Teil der MOS verloren. Das Lactose-MOS-Verhältnis konnte deutlich zu Gunsten der MOS verbessert werden.

Eine Trennung von Lactose und MOS scheint sowohl im Dead-End-Modus als auch im Cross-Flow-Modus möglich.

4.4.1.2 Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™

4.4.1.2.1 *Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™*

Die Cross-Flow-Filtration wurde im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare (siehe Abb. 3-1 im Kapitel 3.7.1.2.1) durchgeführt. Dazu wurden zunächst der Vivinal®GOS-Sirup (Zusammensetzung: 31,5 % Glucose, 2,5 % Galactose, 14,8 % Lactose, 0,7 % Lactulose und 50,5 % Tri- bis Pentasaccharide) und später enzymatisch hergestellte, GOS-haltige Proben (siehe Kapitel 4.3) als Ausgangssubstanz eingesetzt. Die Nanofiltration mit GOS-haltigen Proben wurde durchgeführt, um Erfahrungswerte für die spätere Durchführung der Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben zu sammeln. Zudem weisen GOS-haltige Proben höhere OS-Konzentrationen als MOS-haltige Proben auf und sind daher besser analysierbar.

Die Nanofiltration erfolgte mit einem Washfaktor von ca. 30 und einem TMP (transmembraner Druck) je nach Membran von 3,0 bar bis 4,5 bar (siehe Kapitel 3.7.1.2). Für die Filtration wurden verschiedene Membranen getestet (siehe Tab. 3-10 im Kapitel 3.7.1.2.1). Eine 5%ige Zuckerlösung - ähnlich der Zuckerkonzentration in Milch - wurde als Ausgangslösung verwendet. Die Wiederfindungen von Glucose, Lactose, eines Trisaccharids, eines Tetrasaccharids und eines Pentasaccharids im Nanofiltrationsretentat diverser Membranen sind in Abb. 4-44 gegenübergestellt.

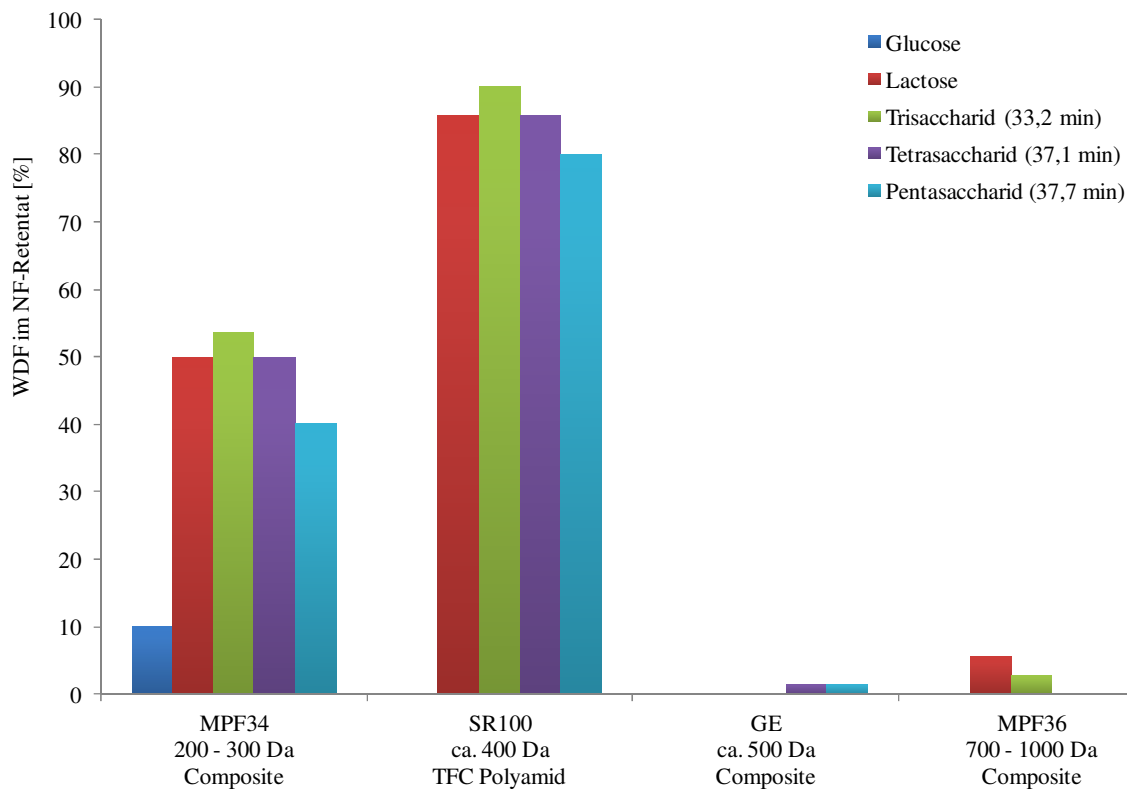


Abb. 4-44: Wiederfindungen (WDF) von Glucose, Lactose, Tri-, Tetra- und Pentasaccharid im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: 5 % Vivinal[®]GOS, Durchführung: Diafiltration mit einem Waschfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow[™], TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, n = 1)

Durch die Membran MPF34 konnte der Glucosegehalt um ca. 90 % reduziert werden. Gleichzeitig wurde der Lactosegehalt auf ca. 50 % verringert und die höhermolekularen GOS zu ca. 50 % wiedergefunden. Mit der Membran SR100 konnte die Glucose fast vollständig abgetrennt werden und eine Wiederfindung von Lactose und Tri- bis Pentasacchariden von über 80 % ermittelt werden (siehe Abb. 4-44). Die Nanofiltrationsretentate der Membranen GE und MPF36 wiesen dagegen nur einen geringen Zuckerrückhalt der Analyten auf, da nahezu alle Kohlenhydrate ins Permeat übergingen.

Die beste Trennung kann mit der Membran SR100 erreicht werden. Dabei können jedoch nur Monosaccharide von Di- bis Pentasacchariden getrennt werden. Disaccharide, wie Lactose, können von höhermolekularen OS nicht abgetrennt werden. Bei vorheriger Behandlung der Lactose mit dem Enzym β -Galactosidase könnte Lactose in seine Monosaccharide gespalten werden, wodurch eine Trennung zwischen Mono-/Disacchariden und höhermolekularen OS

möglich scheint. Bei den GOS-haltigen Ausgangsproben ist diese Behandlung jedoch nicht möglich, da durch die β -Galactosidase auch GOS abgebaut werden (siehe Kapitel 4.3). MOS werden nur geringfügig durch eine Behandlung mit β -Galactosidase verändert (siehe Kapitel 4.3.4). Somit könnte die Lactose in Milchproben durch β -Galactosidase in seine Monosaccharide gespalten werden, um eine Trennung zwischen Monosacchariden und MOS zu erreichen.

Die Wahl der Nanofiltrationsmembran hat Einfluss auf den Flux (Permeatleistung) und den Permeatfluss, wie beispielhaft anhand der Membranen MPF34 und SR100 in Abb. 4-45 dargestellt ist.

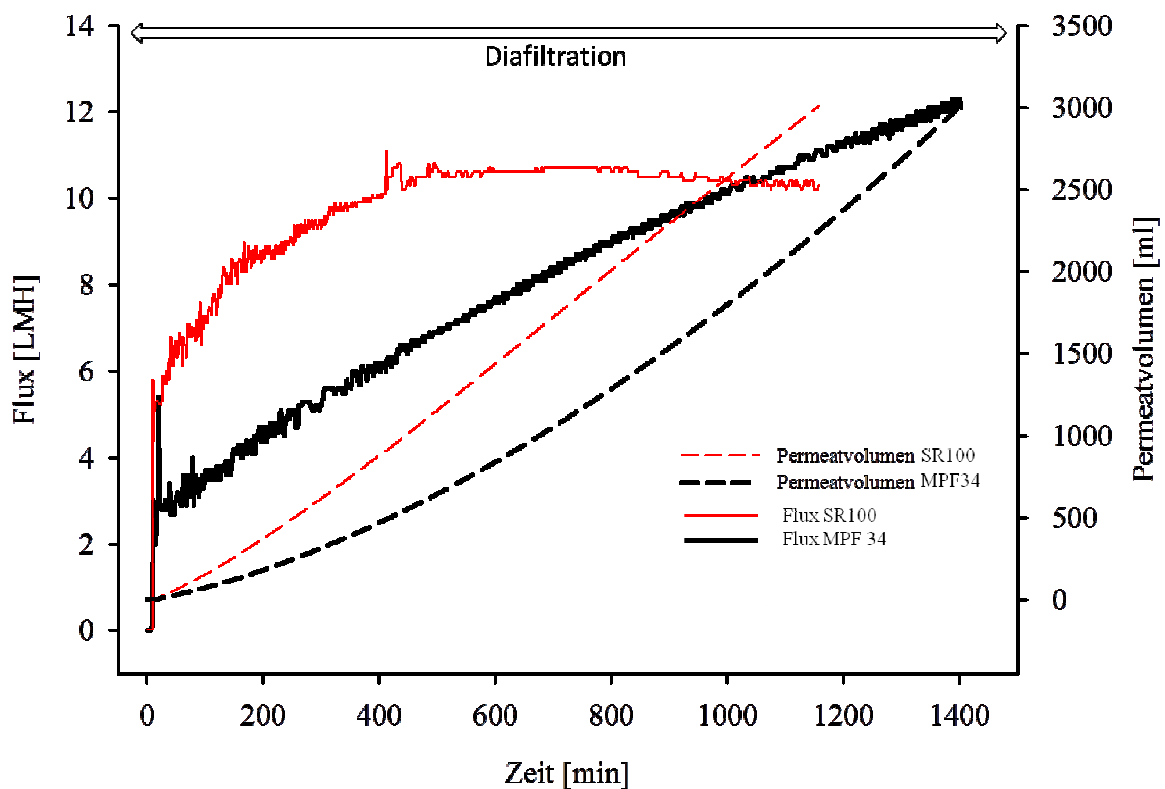


Abb. 4-45: Flux (Permeatleistung) in LMH (Liter pro Membranfläche und Stunde) und Permeatvolumen in ml der Membranen SR100 und MPF34 während der Nanofiltration (Ausgangssubstanz: 5 % Vivinal®GOS, Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, n = 1)

Bei der Nanofiltration steigen Flux (Permeatleistung) und Permeatvolumen mit fortschreitender Dauer der Filtration an (siehe Abb. 4-45). Durch die Abtrennung diverser Zuckersubstanzen aus dem Nanofiltrationsretentat sinkt die Viskosität der Lösung, was einen Anstieg des Fluxes zur Folge hat. Dieser Effekt ist umso deutlicher je größer der Cut-off einer Membran ist. Mit Hilfe der Membran SR100 (ca. 400 Da) kann im Vergleich zur Membran MPF34 (200 Da - 300 Da) frühzeitig ein hoher Flux und ein schnellerer Anstieg des Permeatvolumens erreicht werden. Die Trennung zwischen Monosacchariden und höhermolekularen Zuckern scheint dadurch beeinflusst zu werden.

Die HPAEC-Chromatogramme der vier Nanofiltrationsretentate sowie der Ausgangslösung sind in Abb. 4-46 gegenübergestellt.

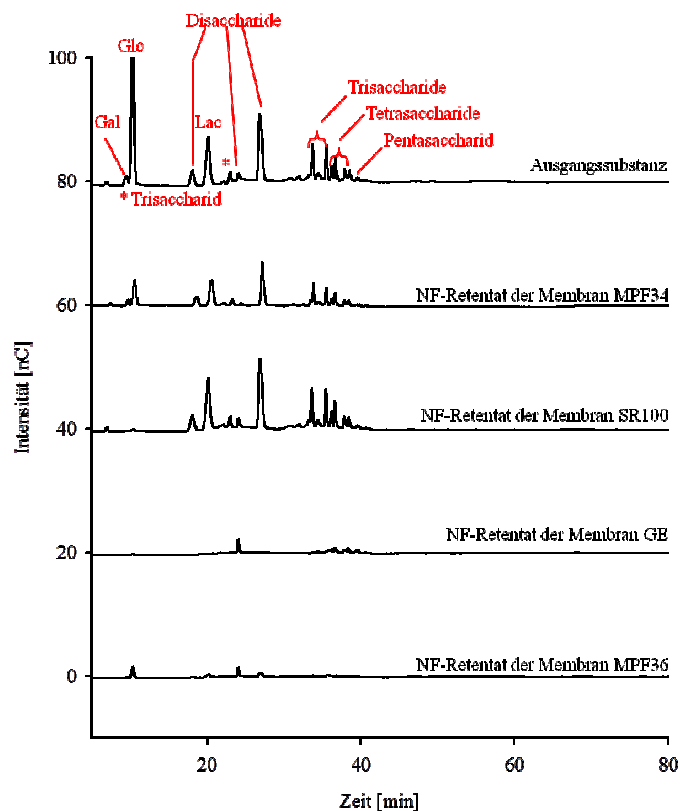


Abb. 4-46: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (5%iger Vivinal®GOS-Sirup) und der Nanofiltrationsretentate der verschiedenen Membranen (Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 3,0 bar - 4,5 bar je nach Membran, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min)

Wie bei den Wiederfindungen der einzelnen Zuckerkomponenten (siehe Abb. 4-44) können in den Nanofiltrationsretentaten der Membranen GE und MPF36 nur geringe Anteile an Kohlenhydraten detektiert werden (siehe Abb. 4-46). Diese Kohlenhydrate werden während der Nanofiltration fast vollständig ins Permeat überführt. In dem Nanofiltrationsretentat der Membran SR100 (ca. 400 Da) können alle Peaks der Ausgangssubstanz mit ca. 20 % geringeren Flächen wiedergefunden werden. Einzige Ausnahme bilden hierbei die Monosaccharide, welche fast vollständig durch die Filtration abgetrennt werden. Das Nanofiltrationsretentat der Membran MPF34 (200 Da - 300 Da) weist ebenfalls jeden Peak der Ausgangssubstanz auf. Die Flächen der Monosaccharide sind im Vergleich zur Ausgangssprobe um ca. 90 % und alle weiteren Flächen um ca. 50 % kleiner. Durch die Nanofiltration sind keine neuen (evtl. unerwünschten) Analyten im Nanofiltrationsretentat der Membranen MPF34 und SR100 entstanden und keine GOS-Analyten komplett verloren gegangen.

Für eine erfolgreiche Trennung von Monosacchariden und höhermolekularen Kohlenhydraten sind Cut-off und Material der Nanofiltrationsmembranen entscheidend. Die Membran SR100 aus Thin Film Composite Polyamid und einem Cut-off von 400 Da scheint für die gewünschte Trennung besonders geeignet zu sein (siehe Abb. 4-46).

Die Analysenwerte von Glucose, Lactose, eines Trisaccharids, eines Tetrasaccharids und eines Pentasaccharids sowie deren Wiederfindungen in den entnommenen Proben während der Nanofiltration mit der Membran SR100 wurden gegenübergestellt (siehe Abb. 4-47). Als Recovery wird die Wiederfindung der Kohlenhydrate bezeichnet, die nach Entfernen des Nanofiltrationsretentats auf der Membran verbleiben und mit Wasser extrahiert werden (siehe Kapitel 3.7.1.2).

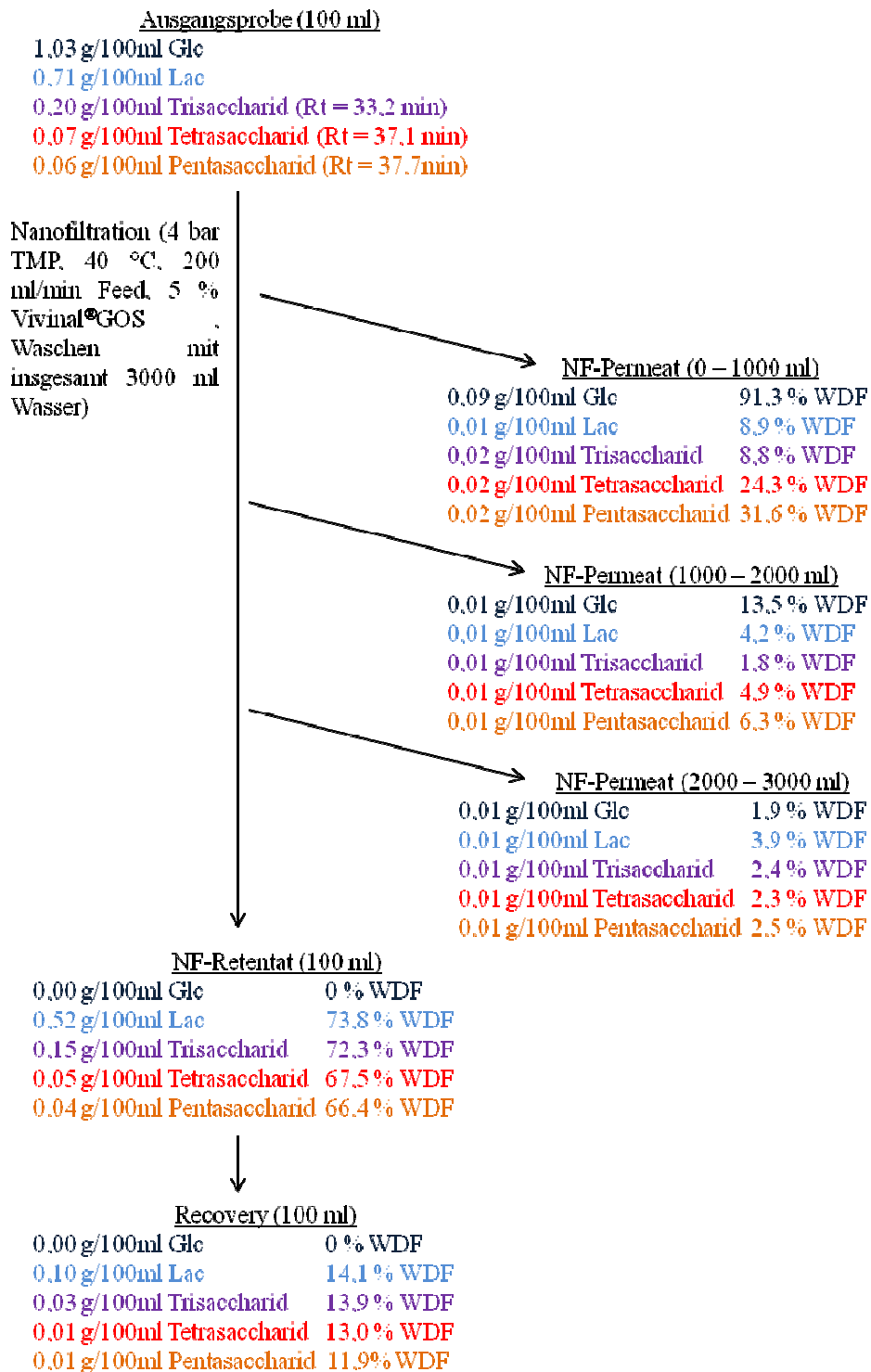


Abb. 4-47: Gehalte und Wiederfindungen von Glucose, Lactose, Tri-, Tetra- und Pentasaccharid (Berechnung der Gehalte an Tri- bis Pentasaccharid mittels externer Lactosekalibrierung) in den mit der Membran SR100 (ca. 400 Da, Thin Film Composite Polyamid) behandelten Proben (Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, Analytik: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung: Carrez-Fällung, n = 1)

Durch das Waschen konnte die Glucose aus dem Nanofiltrationsretentat entfernt und fast vollständig in den ersten 1000 ml des Permeats aufgefangen werden (siehe Abb. 4-47). Ein Großteil der Lactose verblieb auf der Retentatseite der Membran (73,8 % der Lactose im Nanofiltrationsretentat und 14,1 % der Lactose in der Recovery). Der Anteil der Lactose im Permeat verringerte sich bei fortschreitender Nanofiltrationsdauer und damit einhergehender Erhöhung des Permeatvolumens. Ähnlich zur Lactose verhalten sich die Tri- bis Pentasaccharide mit Wiederfindungen von 66,4 % bis 72,3% im Nanofiltrationsretentat bzw. 11,9 % bis 13,9 % in der Recovery.

Auf der Retentatseite der Membran verblieb ein Großteil der Di- bis Pentasaccharide. Lediglich die Monosaccharide konnten erfolgreich von Lactose und höhermolekularen Oligosacchariden abgetrennt werden. Im Nanofiltrationsretentat konnten 72,3 % Trisaccharid, 67,5 % Tetrasaccharid und 66,4 % Pentasaccharid wiedergefunden werden, wobei 100 % Glucose und 26,3 % Lactose abgetrennt wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt Feng et al. [2009]. Feng et al. [2009] nutzte dabei die Membran NF-3 (Cut-off: 800 Da - 1000 Da, Spiralwickelmodul aus Celluloseacetat, Cross-Flow) und konnte durch eine Filtration bei 50 °C und 6 bar 90,5 % der Monosaccharide sowie 52,5 % der Lactose abtrennen, wobei 70 % GOS wiedergefunden wurden. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte Feng et al. [2009] ausschließlich Monosaccharide von Disacchariden und GOS abtrennen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Goulas et al. [2002] und Grandison et al. [2003]. In diesen Arbeitsgruppen konnten mit den Membranen NF-CA-50 (Flachmembran aus Celluloseacetat, Cross-Flow) und DS-5-DL (Flachmembran, Cross-Flow) 82 % bis 86 % der Monosaccharide sowie 11 % bis 41 % der Lactose abgetrennt werden. Die Wiederfindung der Trisaccharide betrug dabei 81 % bis 98 %. Mit Hilfe der Nanofiltration scheint ausschließlich eine Abtrennung der Monosaccharide von den Disacchariden und höhermolekularen GOS möglich.

Eine enzymatisch hergestellte, GOS-haltige Probe (Synthese mit der β -Galactosidase aus *K. lactis*, Reaktionsbedingungen: pH 7, 5 h, 40 °C, 12 U/g) (siehe Kapitel 4.3) wurde anschließend mit Hilfe der Membran SR100 aufgereinigt. Diese Ausgangssubstanz enthält im Vergleich zum Vivinal®GOS-Sirup deutlich weniger Monosaccharide und höhere Gehalte an GOS. Dies könnte die Nanofiltration maßgeblich beeinflussen. Die Wiederfindungen der verschiedenen Kohlenhydrate der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Probe nach der Aufreinigung mittels Nanofiltration sind in Abb. 4-48 gegenübergestellt.

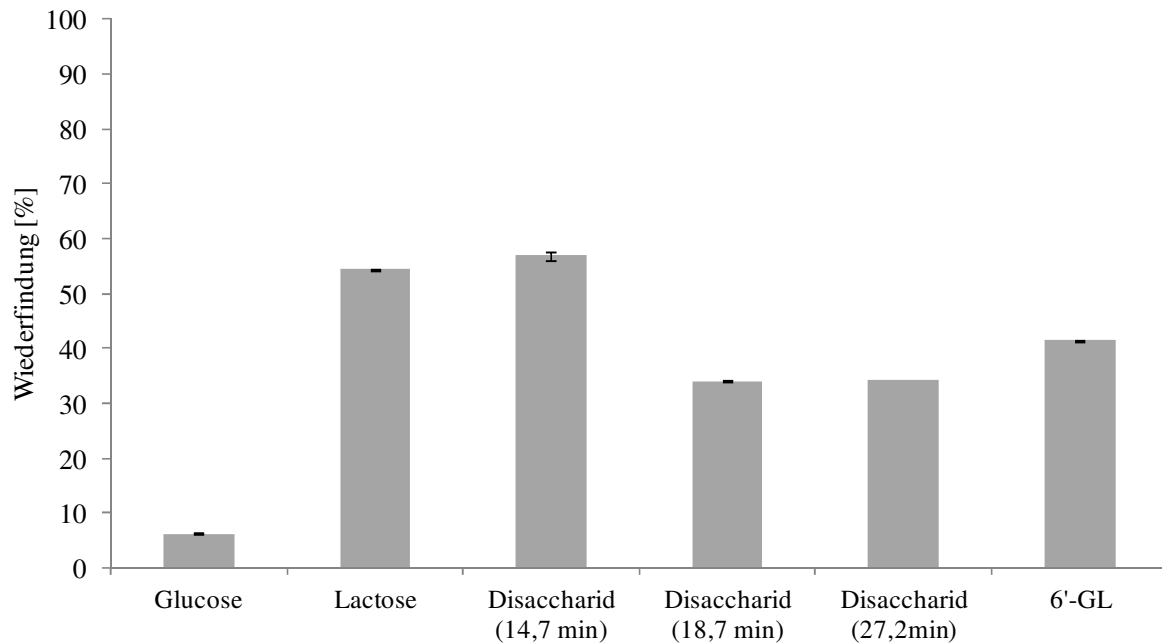


Abb. 4-48: Wiederfindungen von Glucose, Lactose, drei Disacchariden und 6'-GL im Nanofiltrationsretentat (Membran: SR100, Ausgangssubstanz: 5%ige GOS-Probe, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h), Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4,0 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, n = 2)

Im Nanofiltrationsretentat konnten 0,01 g/100ml Galactose, 0,2 g/100ml Glucose, 0,5 g/100ml Lactose und 6,5 g/100ml GOS (GOS: berechnet mittels externer Lactosekalibrierung, entspricht allen im HPAEC-Chromatogramm vorhandenen Peaks außer Galactose, Glucose und Lactose) detektiert werden (siehe Abb. 4-48). Bezogen auf den Gesamtzuckergehalt entspricht dies 0,1 % Galactose, 2,5 % Glucose, 6,9 % Lactose und 90,5 % GOS. Im Retentat konnten 41,1 % GOS wiedergefunden sowie 99,3 % Galactose, 93,7 % Glucose und 45,6 % Lactose abgetrennt werden. Wie bei der Aufreinigung des Vivinal® GOS-Sirups konnten bei der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Probe nur Monosaccharide von Disacchariden und höhermolekularen Zuckern abgetrennt werden. Disaccharide konnten von den GOS nicht abgetrennt werden. In dem HPAEC-Chromatogramm des Nanofiltrationsretentats (siehe Abb. 6-6 im Anhang) konnten keine neuen (evtl. unerwünschten) Analyten detektiert werden. Zudem wurden alle OS wiedergefunden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Nanofiltration 5%iger, GOS-haltiger Proben im Labormaßstab die Monosaccharide nahezu vollständig von den Disacchariden und höhermolekularen Oligosacchariden abgetrennt werden können.

4.4.1.2.2 *Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™*

Das in Kapitel 4.4.1.2.1 dargestellte Verfahren der Nanofiltration wurde anschließend für die MOS-Aufreinigung eines UF-Magermilchpermeats verwendet. Die Analyse der MOS- bzw. Lactosegehalte erfolgte mittels GCC-SPE bzw. enzymatischer Bestimmung. Zur Analyse der MOS-Ausgangswerte im UF-Magermilchpermeat wurde die Lactoseabtrennung mittels GCC-SPE notwendigerweise durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.1.2). Um Abweichungen - resultierend aus unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren - auszuschließen, wurde das Nanofiltrationsretentat ebenfalls mittels GCC-SPE aufgearbeitet.

Im Vergleich zu GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1.2.1) konnte bei der Nanofiltration mit MOS-haltigen Proben die Membran MPF34 nicht untersucht werden, da es nach kurzer Filtrationszeit zur Verstopfung der Membran kam. Dafür wurde eine weitere Membran mit einem Cut-off von 150 Da bis 300 Da (Bezeichnung: DL) getestet.

Die Ausgangslösung der Nanofiltration wurde vor der Diafiltration um den Faktor zwei aufkonzentriert, damit genügend MOS für die spätere Analyse (u. a. Perjodat-Resorcinol-Test und HPAEC-PAD) zur Verfügung stehen. Mit Hilfe von Perjodat-Resorcinol-Tests hätten Nanofiltrationsretentate mit keinerlei Rückhalt an sialinsäurehaltigen MOS für weitere Analysen ausgeschlossen werden können. Jedoch waren sialinsäurehaltige Zucker in allen Retentaten messbar, weshalb keine Membran ausgeschlossen wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse von HPAEC und Perjodat-Resorcinol-Test findet im Kapitel 4.4.1.4 statt. Der Resorcinol-Schwefelsäure-Test wurde verwendet, um den Gehalt an neutralen Zuckern (v. a. Lactose) abzuschätzen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch die enzymatische Lactosebestimmung bestätigt.

Die Membran MPF36 wurde mit einem Waschfaktor von 30, die Membranen GE und SR100 mit einem Waschfaktor von 15 und die Membran DL mit einem Waschfaktor von 1 diafiltriert. Die unterschiedlichen Waschfaktoren resultieren aus der Dauer bis die Filtration auf Grund der Verstopfung der jeweiligen Membran zum Erliegen kam. Nach den Ergebnissen der Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1.2.1,

v. a. Abb. 4-47) sollte ein Waschfaktor kleiner 30 eine Zuckertrennung ermöglichen. Im Vergleich zu Kapitel 4.4.1.2.1 (Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben) ist die Verstopfung der Membran ein Einflussfaktor, der bei der MOS-Aufreinigung beachtet werden muss, da noch restliche Proteine in der Ausgangslösung vorhanden sind. Diese können die Membran belegen und damit die Ergebnisse der Nanofiltration verändern.

Die Wiederfindungen von Lactose, des MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat diverser Membranen sind in Abb. 4-49 gegenübergestellt.

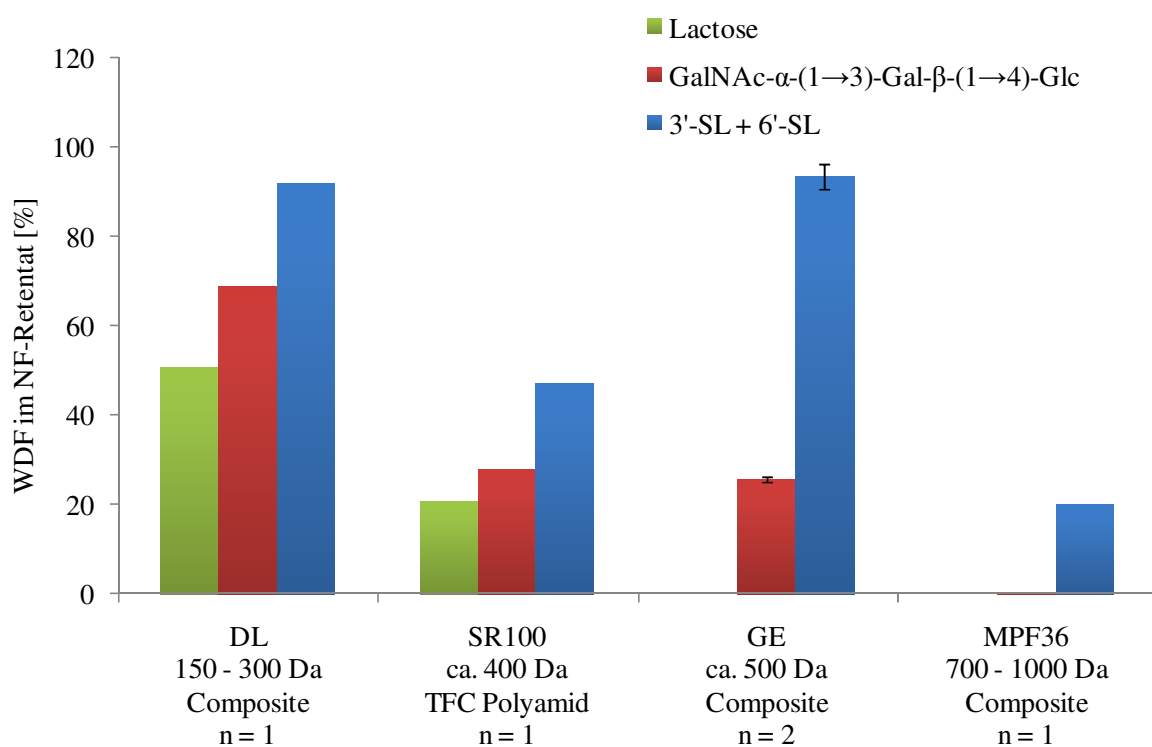


Abb. 4-49: Wiederfindung von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: UF-Magermilchpermeat, Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Waschfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Analytik: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung)

Durch die Membranen DL und SR100 kann keine ausreichende Trennung zwischen Lactose und MOS erreicht werden (siehe Abb. 4-49). Ebenso kann keine Trennung mit der Membran MPF36 erzielt werden, da ein Großteil der Lactose und der MOS ins Permeat übergegangen sind (siehe Abb. 4-49). Mit Hilfe der Membran GE konnten die Lactose nahezu vollständig abgetrennt sowie die sauren MOS 3'-SL und 6'-SL zu 93,4 % im Nanofiltrationsretentat wiedergefunden werden. Nachteilig dabei ist, dass das neutrale Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc nur zu 25,5 % im Retentat zurückgehalten werden konnte (siehe Abb. 4-49).

Im Gegensatz zur Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1.2.1) können durch die Nanofiltration Mono- und Disaccharide von höhermolekularen Kohlenhydraten abgetrennt werden. Nach Grandison et al. [2003] beeinflussen v. a. elektrisch geladene Oligosaccharide die Zuckertrennung, wodurch der hohe Rückhalt an sauren Zuckern im Retentat erklärt werden kann. Des Weiteren können die restlichen Proteine, die in der Ausgangslösung vorhanden sind, eine Art Deckschicht auf der Membran bilden und somit die Filtration der Zucker beeinflussen. Durch diese Deckschicht scheint der Cut-off der Membran verringert zu werden, so dass Kohlenhydrate mit geringer Molmasse zurückgehalten werden können. Außerdem kann die stark veränderte Zusammensetzung der Ausgangslösung im Vergleich zur Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben (Kapitel 4.4.1.2.1) die Nanofiltration bzw. die Trennbedingungen der Membran beeinflussen.

Die Composite-Membranen sollten einen maximalen Cut-off von 500 Da besitzen, um die sauren Oligosaccharide 3'-SL und 6'-SL im Retentat zurückhalten zu können. Der Cut-off sollte mindestens 300 Da betragen, damit Lactose von den MOS abgetrennt werden kann. Eine Trennung von Lactose und MOS scheint somit bei Composite-Membranen mit einem Cut-off von ca. 300 Da bis 500 Da erfolgreich zu sein (siehe Abb. 4-49).

Der Einfluss der Nanofiltrationsmembranen auf den Flux (Permeatleistung) und den Permeatfluss ist in Abb. 4-50 dargestellt.

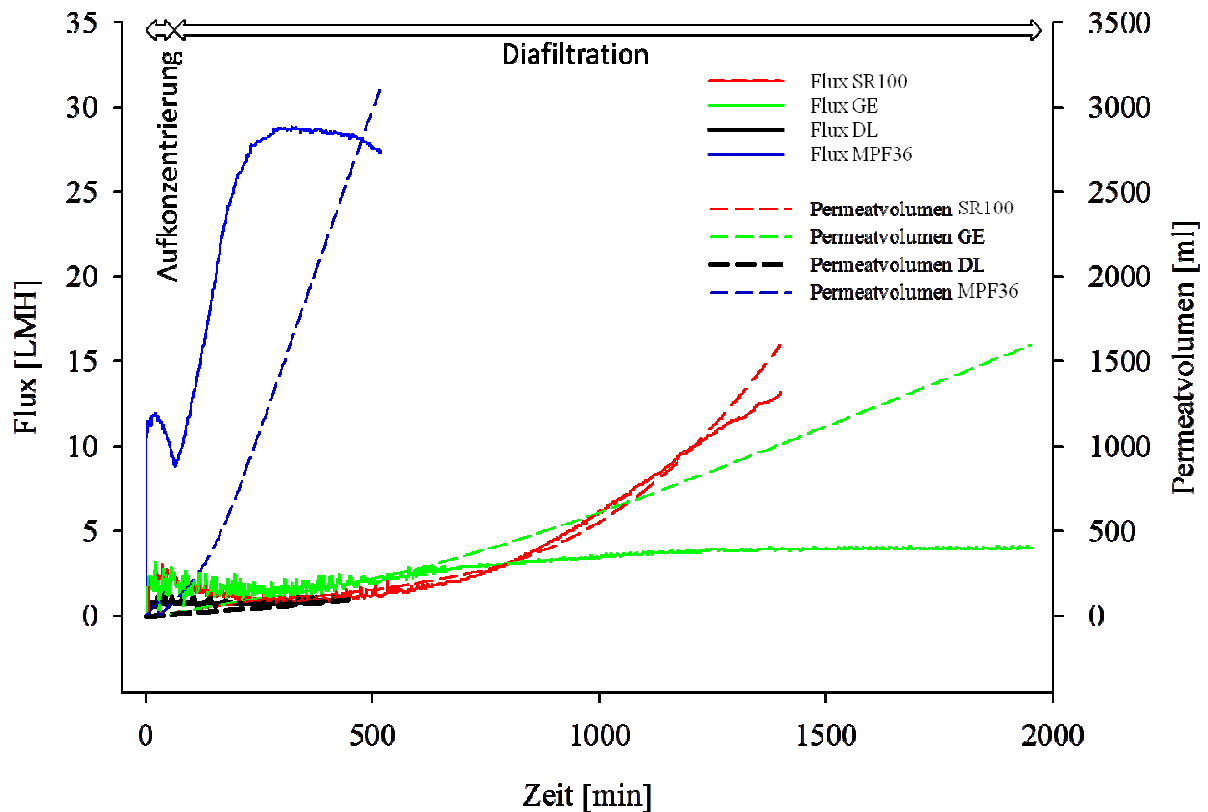


Abb. 4-50: Flux in LMH (Liter pro Membranfläche und Stunde) und Permeatvolumen in ml der Membranen SR100, GE, DL und MPF36 während der Nanofiltration (Ausgangssubstanz: UF-Magermilchpermeat, Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Waschfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min)

Analog zur Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1.2.1) werden mit Hilfe der Membran MPF36 nahezu keine Kohlenhydrate im Retentat zurückgehalten (siehe Abb. 4-49). Dadurch verringert sich die Viskosität der Lösung auf der Retentatseite, was zu einem starken und schnellen Anstieg des Fluxes und schließlich auch des Permeatflusses führt (siehe Abb. 4-50). So ist eine Diafiltration bis zu einem Waschfaktor von 30 möglich.

Mit den Membranen DL und SR100 können keine Trennungen zwischen den einzelnen Zuckerkomponenten erreicht werden. Die einzelnen Komponenten werden langsam, aber stetig aus dem Retentat herausgewaschen (siehe Abb. 4-49). Dadurch sinkt die Viskosität der

Lösung im Retentat. Der Flux und das Permeatvolumen steigen mit zunehmender Filtrationsdauer exponentiell an (siehe Abb. 4-50).

Die Membran GE, die die geeignetste Membran für die Trennung von Lactose und MOS ist (siehe Abb. 4-49), weist dauerhaft einen geringen Flux mit einem gleichmäßigen Anstieg des Permeatflusses auf (siehe Abb. 4-50). Membranen, die diese Eigenschaften aufweisen, scheinen für eine Trennung zwischen Lactose und MOS geeignet zu sein.

Die HPAEC-Chromatogramme der Nanofiltrationsretentate der vier Membranen sowie der Ausgangslösung sind in Abb. 4-51 gegenübergestellt.

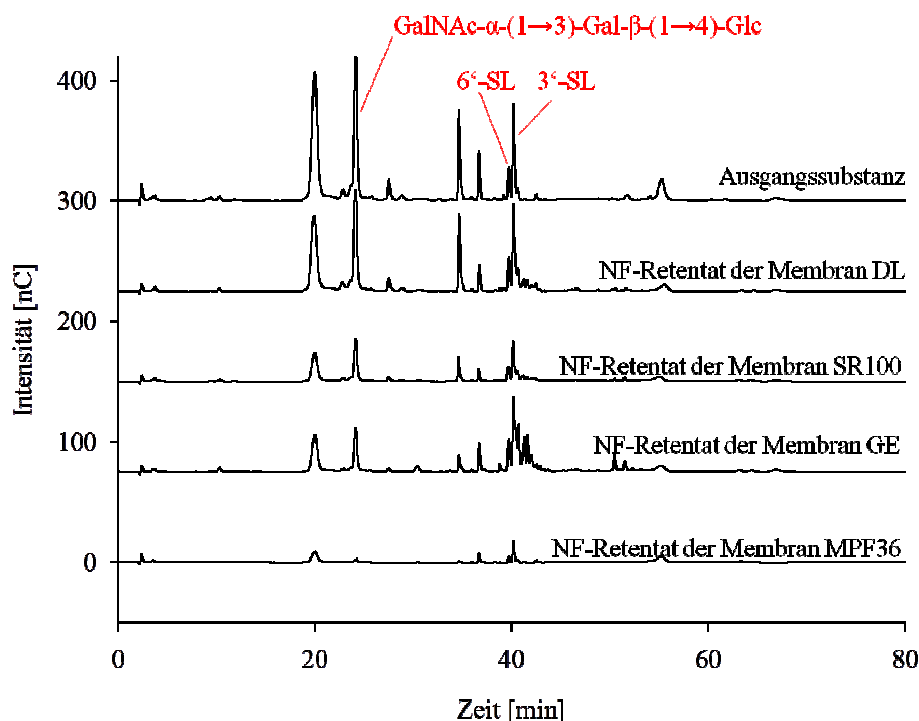


Abb. 4-51: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (UF-Magermilchpermeat) und das durch die diversen Membranen aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Aufkonzentrierung um den Faktor 2 und Diafiltration mit diversen Washfaktoren (GE, SR100: Faktor 15, MPF36: Faktor 30, DL: Faktor 1), Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min, Probenaufarbeitung für HPAEC-PAD: GCC-SPE (n = 2) (Anmerkung: Lactosepeak bei 21,0 min entspricht nicht dem tatsächlichen Lactosegehalt, sondern nur dem Rest-Lactosegehalt, der mittels GCC-SPE nicht abgetrennt werden konnte))

In dem Nanofiltrationsretentat der Membran MPF36 sind anhand der HPAEC-Chromatogramme nur sehr wenig Zuckeranalyten detektierbar (siehe Abb. 4-51), wodurch die gewonnenen Erkenntnisse der Wiederfindungen verschiedener Zuckeranalyten (siehe Abb. 4-49) bestätigt werden können.

Die Retentate der Membranen DL und SR100 zeigen eine deutliche Anwesenheit der MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL (siehe Abb. 4-51), wie es nach den bisher ermittelten Ergebnissen zu erwarten war (siehe Abb. 4-49). Das Oligosaccharidmuster der Ausgangssubstanz und der nach Nanofiltration erhaltenen Retentate der beiden Membranen weisen nach Analyse mittels HPAEC-PAD/IT-MS große Ähnlichkeiten auf. Es wurden keine neuen (eventuell unerwünschten) Analyten detektiert. Zudem wurden keine OS-Analyten vollständig abgetrennt.

Mit Hilfe der Membran GE können große Gehalte an GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL im Retentat gemessen werden (siehe Abb. 4-51). Im Bereich von ca. Minute 43 sind in dem HPAEC-Chromatogramm des Nanofiltrationsretentats neue Peaks sichtbar, die nicht in nachweisbaren Konzentrationen in der Ausgangsprobe vorhanden sind. Nach LC/MS-Analyse können diesen Analyten keine Zuckerverbindung zugeordnet werden. Diese unbekanntes Analyten konnten auch bei der Wiederholung des Versuchs detektiert werden. Die Analytik der MOS scheint dadurch nicht beeinflusst zu werden.

Der in Abb. 4-51 dargestellte Lactosepeak bei 21,0 min entspricht nicht dem tatsächlichen Lactosegehalt, sondern nur dem Rest-Lactose-Gehalt, der mittels GCC-SPE nicht abgetrennt werden konnte. Der Lactosegehalt kann nicht anhand des HPAEC-Chromatogramms abgeschätzt werden und muss daher enzymatisch bestimmt werden. Die Analysenwerte von Lactose - enzymatisch bestimmt - und der MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL - bestimmt nach GCC-SPE-Aufarbeitung mittels HPAEC - sowie deren Wiederfindungen während des Verlaufs der Nanofiltration mit der Membran GE sind in Abb. 4-52 dargestellt.

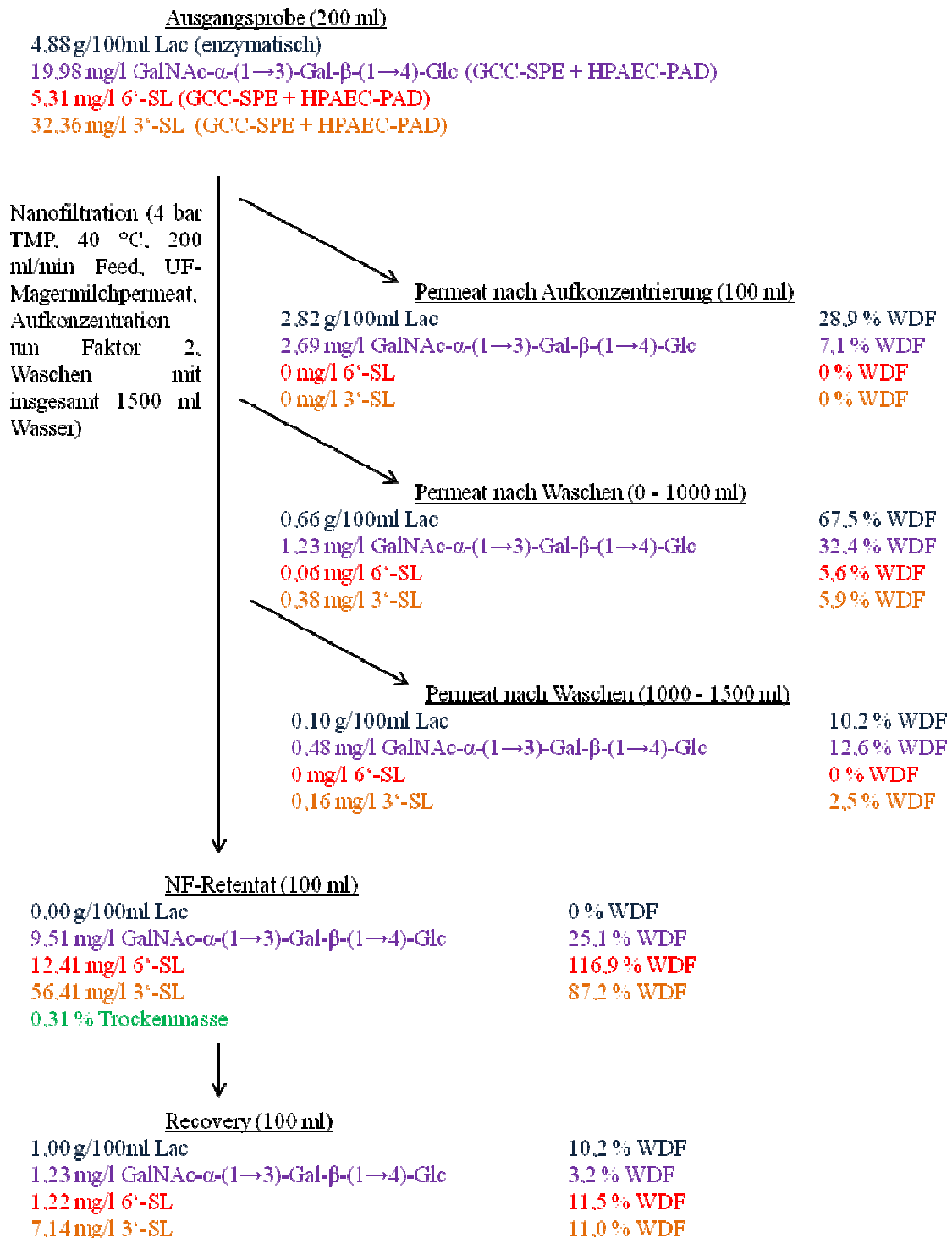


Abb. 4-52: Gehalte und Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL in den mit der Membran GE (ca. 500 Da, Composite) behandelten Proben (Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflowTM, Analytik der OS: HPAEC-PAD nach GCC-SPE-Aufreinigung, Analytik der Lac: enzymatische Bestimmung)

Der Großteil der Lactose konnte mit Hilfe der Membran GE nach Aufkonzentrierung der Retentatprobe und nach Diafiltration um den Faktor 10 ins Permeat überführt werden (siehe Abb. 4-52). Im Nanofiltrationsretentat konnte durch enzymatische Bestimmung keine Lactose gemessen werden, da die Lactosekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Geringe Reste an Lactose wurden in der Recovery detektiert.

Das Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc konnte nur zu ca. 25 % im Retentat zurückgehalten werden, während der Großteil des Oligosaccharids ins Permeat übergegangen ist (siehe Abb. 4-52). Zudem wurden geringe Mengen in der Recovery gemessen. Die sauren MOS 3'-SL und 6'-SL verblieben nahezu vollständig im Retentat (siehe Abb. 4-52).

Durch die Nanofiltration mit der Membran GE kann das Lactose-MOS-Verhältnis von ca. 1000:1 in Kuhmilch (siehe Kapitel 4.2.1) auf ca. 11,5:1 reduziert werden. Dabei wurde der Lactosegehalt im Retentat anhand der Nachweisgrenze der enzymatischen Bestimmung abgeschätzt. Der Anteil an Oligosacchariden am Gesamtzuckergehalt kann von ca. 0,1 % in Kuhmilch auf über 7,4 % im Nanofiltrationsretentat der GE-Membran erhöht werden. Bezogen auf die Trockenmasse besteht das Nanofiltrationsretentat der Membran GE zu 4,5 % aus den MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL. Rückstände von anderen Substanzen wie Milchsäure und -eiweiße könnten noch in der Probe vorhanden sein.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass durch die Nanofiltration von MOS-haltigen Proben im Labormaßstab eine Trennung zwischen Lactose und MOS möglich ist. Jedoch sind auch Verluste der MOS - v. a. neutrale Verbindungen - zu beobachten.

4.4.1.3 Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im Technikumsmaßstab mit der Anlage Pilot System Modell SW40

Nach der erfolgreichen Trennung von Lactose und MOS im Labormaßstab sollten das Verfahren in einen größeren Maßstab - dem Technikumsmaßstab - überführt werden. Dazu wurde die Anlage Pilot System Modell SW40 von MMS Membrane Systems mit Flachmembranen genutzt. Im Vergleich zum Labormaßstab konnten nur spezifisch für die Anlage nutzbare Membranen getestet werden (siehe Tab. 3-12 in Kapitel 3.7.1.3). Als Ausgangssubstanz wurde ein MOS-haltiges, konzentriertes Molkenpermeat der UTM verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Molke aus der Käseherstellung, die erhitzt, ultrafiltriert (zur Proteinabtrennung) und mittels Umkehrosmose (zur Aufkonzentrierung) behandelt wurde. Für Versuche in diesem Maßstab sind mindestens 20 Liter

Ausgangsmaterial notwendig. Eine Nanofiltration von GOS-haltigen Proben ist nicht möglich, da die benötigte Menge noch nicht im großtechnischem Maßstab enzymatisch hergestellt werden können.

Alle Nanofiltrationsretentate und Ausgangsproben wurden mit Hilfe des Perjodat-Resorcinol-Tests auf deren Gehalt an sialinsäurehaltigen MOS untersucht. Bei einem deutlich messbaren Anteil an sialinsäurehaltigen Oligosacchariden im Retentat sowie einer signifikanten Abtrennung der Lactose - bestimmt durch enzymatische Analyse - erfolgte eine detailliertere Analyse mittels HPAEC-PAD nach GCC-SPE-Aufreinigung. Ein Vergleich von HPAEC-PAD und Perjodat-Resorcinol-Test findet im Kapitel 4.4.1.4 statt. Der Resorcinol-Schwefelsäure-Test wurde verwendet, um den Gehalt an neutralen Zucker (v. a. Lactose) abzuschätzen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch die enzymatische Lactosebestimmung bestätigt. Die Wiederfindungen von Lactose, des MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat der verwendeten Membranen sind in Abb. 4-53 dargestellt. Die Analysenwerte des Retentats berechnen sich aus der Differenz zwischen Ausgangsprobe und Permeat, da nur diese Proben zur Verfügung standen.

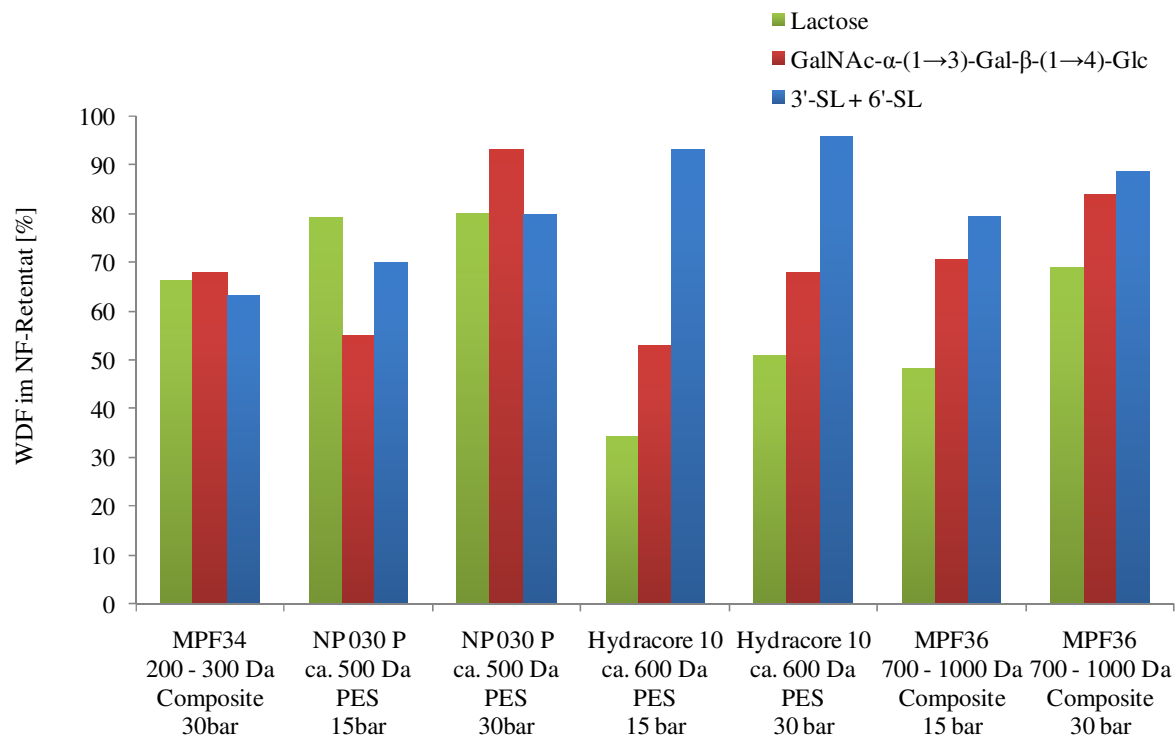


Abb. 4-53: Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc und der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat verschiedener Membranen (Ausgangssubstanz: konzentriertes Molkenpermeat, Durchführung: reine Filtration ohne Diafiltration, Maßstab: Technikum, Anlage: Pilot System Modell SW40, Feed-Druck: 15 bar bzw. 30 bar, Temperatur: 10 °C - 15 °C, Feed: 500 l/h, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung)

Mit den Membranen MPF34 und NP 030 P kann keine Zuckertrennung erreicht werden, da ein Großteil der Kohlenhydrate im Retentat verblieb (siehe Abb. 4-53). Mit Hilfe der Membran MPF36 ist eine Trennung zwischen Lactose und MOS sichtbar, die jedoch nicht ausreichend ist. Die beste Trennung kann mit der Membran Hydracore 10 erzielt werden, wobei mit 15 bar bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit 30 bar (siehe Abb. 4-53). Mit dieser Membran können die sauren MOS 3'-SL und 6'-SL nahezu vollständig im Retentat zurückgehalten werden. Nach Grandison et al. [2003] beeinflussen elektrisch geladene Zucker die Nanofiltration, wodurch die Trennung von Lactose und MOS verbessert werden kann. Die Membranen Nano SW, Hydracore 50, Hydracore 70 pHT und GE wurden ebenfalls getestet, zeigten jedoch nur eine sehr geringe Abtrennung von max. 20 % der Lactose aus dem

Nanofiltrationsretentat. Da diese Lactoseabtrennung nicht ausreichend ist, erfolgten keine weiteren Versuche mit diesen Membranen.

Im Gegensatz zur Nanofiltration im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2), bei der die beste Trennung mit der Membran GE erzielt werden konnte, kann im Technikumsmaßstab mit dieser Membran keine ausreichende Trennung von Lactose und MOS erreicht werden. Die Membran MPF36 zeigt im Technikumsmaßstab deutliche Rückhalte der Kohlenhydrate, was im Gegensatz zu den Nanofiltrationsergebnissen im Labormaßstab (nahezu vollständige Abtrennung der Kohlenhydrate) steht. Diese Unterschiede könnten v. a. durch die Veränderung des Drucks (4 bar im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2) vs. 15 bar - 30 bar im Technikumsmaßstab), des Volumenstroms (12 l/h vs. 500 l/h), der Temperatur (40 °C vs. 15 °C) und dem Ausgangsmaterial (UF-Magermilchpermeat vs. konzentriertes Molkenpermeat) hervorgerufen werden.

Eine Erhöhung des Drucks hat nach Atrá et al. [2005], Botelho-Cunha et al. [2010], Feng et al. [2009], Goulas et al. [2002] und Grandison et al. [2003] einen Anstieg der Zuckerrückhalte im Retentat zur Folge. Dieser Effekt ist für Zuckermoleküle mit geringer Molmasse größer als für höhermolekulare Kohlenhydrate. Die Differenz zwischen den Rückhalten von Mono- und Trisacchariden sinkt somit [Botelho-Cunha et al., 2010], wodurch die Trennung zwischen nieder- und höhermolekularen Kohlenhydraten verschlechtert wird. Die oben dargestellte Literaturmeinung konnte durch die Nanofiltrationsergebnisse der Membranen Hydracore 10 und MPF36 bei 15 bar bzw. 30 bar bestätigt werden (siehe Abb. 4-53). So sind auch die wesentlichen Unterschiede zwischen der Zuckertrennung mit der Membran GE und der Membran MPF36 im Labor- bzw. Technikumsmaßstab erklärbar. Die Kohlenhydrattrennung bei geringem Druck ist somit deutlich effektiver als bei höheren Drücken. Jedoch sind diese geringen Drücke großtechnisch nicht umsetzbar, da die Nanofiltrationsdauer und die damit verbundenen Kosten unverhältnismäßig ansteigen würden. Ein Kompromiss zwischen geringer Nanofiltrationsdauer (bei hohem Druck) und erfolgreicher Trennung von Lactose und MOS (bei geringem Druck) muss daher gefunden werden.

Die Veränderung des Volumenstroms (12 l/h im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2) vs. 500 l/h im Technikumsmaßstab) hat ähnliche Auswirkungen wie eine Veränderung des Drucks [[Atrá et al., 2005], [Goulas et al., 2002], [Grandison et al., 2003], [Kolfshoten et al., 2011] und [Pruksasri, 2007]]. Durch die Erhöhung des Volumenstroms wird die Differenz zwischen den Rückhalten an Mono- und Trisacchariden verringert, wodurch die

Kohlenhydrattrennung verschlechtert wird. Ein geringer Volumenstrom scheint für die Trennung von Lactose und MOS vorteilhaft. Dadurch steigt die Nanofiltrationsdauer und die damit verbundenen Kosten. Daher muss auch bei dem Volumenstrom ein Kompromiss gefunden werden.

Eine Erhöhung der Temperatur verringert die Zuckerviskosität der Lösung und weitet die Membranporen [[Feng et al., 2009] und [Goulas et al., 2002]]. Dadurch können im Labormaßstab (40 °C) alle Kohlenhydratkomponenten während der Nanofiltration mit der Membran MPF36 ins Permeat übergehen. Bei einer geringeren Temperatur von 15 °C - wie im Technikumsmaßstab - werden dagegen die Zuckeranalyten im Retentat zurückgehalten. Grundsätzlich wird durch einen Anstieg der Temperatur die Differenz zwischen den Rückhalten von Monosacchariden und höhermolekularen Zuckern erhöht [[Botelho-Cunha et al., 2010], [Feng et al., 2009], [Goulas et al., 2002] und [Grandison et al., 2003]].

Für eine möglichst große Differenz zwischen den Rückhalten an Monosacchariden und höhermolekularen Zuckern sollten demnach ein geringer Druck, ein geringer Volumenstrom und eine hohe Temperatur vorherrschen.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Analysenwerte der enzymatisch bestimmten Lactose sowie der MOS GalNAc- α -(1→3)-Gal- β -(1→4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL - bestimmt nach GCC-SPE-Aufarbeitung mittels HPAEC - und deren Wiederfindungen nach der Nanofiltration mit der Membran Hydracore bei 15 bar dargestellt.

<u>Ausgangssprobe</u>		
12,0 g/100ml Lac (enzymatisch)		
44,15 mg/l GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc (GCC-SPE + HPAEC-PAD)		
11,92 mg/l 6'-SL (GCC-SPE + HPAEC-PAD)		
58,53 mg/l 3'-SL (GCC-SPE + HPAEC-PAD)		
Nanofiltration (15 bar, 500 ml/min Feed, 10 - 15 °C, LC20 = konzentriertes Molkenpermeat)		
	↘	
		↘
	<u>NF-Permeat</u>	
	7,90 g/100ml Lac	65,8 % WDF
	20,74 mg/l GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	47,0 % WDF
	3,60 mg/l 6'-SL	30,2 % WDF
	17,83 mg/l 3'-SL	30,5 % WDF
	↓	
	<u>NF-Retentat*</u>	
	4,10 g/100ml Lac	34,2 % WDF
	23,41 mg/l GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc	53,0 % WDF
	8,32 mg/l 6'-SL	69,8 % WDF
	40,70 mg/l 3'-SL	69,5 % WDF

Abb. 4-54: Gehalte und Wiederfindungen von Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL in den mit der Membran Hydracore 10 (ca. 600 Da, PES) behandelten Proben (Ausgangssubstanz: konzentriertes Molkenpermeat, Durchführung: reine Filtration ohne Diafiltration, Maßstab: Technikum, Anlage: Pilot System Modell SW40, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Lac: enzymatische Lactosebestimmung, *Werte durch Differenzrechnung aus Ausgangsmaterial und Permeat bestimmt)

Mit Hilfe der Membran Hydracore 10 konnte bei einem Druck von 15 bar die Lactose im Nanofiltrationsretentat zu 65,8 % abgetrennt und die Sialyllactosen 3'-SL und 6'-SL zu ca. 70 % wiedergefunden werden (siehe Abb. 4-54). Die Wiederfindung des neutralen Oligosaccharids GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc betrug 53,0 %.

Das Lactose-MOS-Verhältnis kann von ca. 1000:1 in Kuhmilch (siehe Kapitel 4.2.1) auf 566:1 reduziert werden. Der Anteil der MOS (GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL) am Gesamtzuckeranteil (Summe aus MOS und Lactose) wird von 0,1 % in Kuhmilch auf 0,18 % erhöht. Beim Vergleich der Nanofiltrationsergebnisse im Technikumsmaßstab (ohne Waschen) mit den Ergebnissen im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2, Waschfaktor von 15, Lac-MOS-Verhältnis: ca. 11,5:1, Anteil der MOS am Gesamtzucker: über 7,4 %) kann festgehalten werden, dass bessere Ergebnisse im Labormaßstab erzielt werden. Dies könnte auf das Waschen der Probe zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Nanofiltration im Technikumsmaßstab eine Trennung zwischen Lactose und MOS sichtbar ist, die auf Grund veränderter Prozessparameter (Druck, Temperatur und Volumenstrom) im Vergleich zum Labormaßstab jedoch höhere Lactoserückhalte und größere MOS-Verluste im Retentat aufweisen.

4.4.1.4 Cross-Flow-Filtration von MOS-haltigen Proben im großtechnischem Maßstab mit der Membranfiltrationsanlage

Die bisher entwickelten Nanofiltrationsverfahren aus dem Labor- und Technikumsmaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2 und 4.4.1.3) wurden in den großtechnischen Maßstab überführt. Dazu wurde die Membranfiltrationsanlage von UFI-TEC Institut für Membrantechnologie GmbH mit Spiralwickelmodulen genutzt. Für diese Versuche wurden die Spiralwickelmodule MPF36 und SR50/SR2 genutzt, welche mit den Flachmembranen MPF36 und SR100 der Versuche im Labor- bzw. Technikumsmaßstab vergleichbar sind. Als Ausgangssubstanz wurde ein lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat verwendet. Durch die Hydrolyse der Lactose und der damit verbundenen Entstehung der Monosaccharide Galactose und Glucose sollte die Abtrennung der Mono- bzw. Disaccharide von den MOS erleichtert werden (siehe Kapitel 4.4.1.2.1). Die MOS-Gehalte werden dabei nur geringfügig verändert (siehe Kapitel 4.3.4).

Des Weiteren wurde Melasse als mögliche Ausgangssubstanz getestet. Die Melasse ist eine wirtschaftlich günstige Ausgangssubstanz zur MOS-Gewinnung, da es ein Abfallprodukt aus der Lactosekristallisation der milch- und molkeverarbeitenden Industrie ist. Bei der Melasse konnte jedoch nur eine ungenügende Lactosehydrolyse und eine unzureichende Lactoseabtrennung durch die Nanofiltration erzielt werden. Der Grund hierfür könnte der hohe Anteil an Mineralien und Salzen im Vergleich zur Kuhmilch sein. Melasse eignet sich somit nicht als Ausgangsmaterial für die Nanofiltration.

Die Durchführung der Nanofiltration erfolgte durch Waschen des Ausgangsmaterials um ca. den Faktor sieben und Aufkonzentrierung des Nanofiltrationsretentats um ca. den Faktor fünf (siehe Kapitel 3.7.1.4). Nach den Ergebnissen der Cross-Flow-Filtration im Technikumsmaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.3) ist das Waschen des Retentats notwendig, um eine ausreichende Trennung zwischen niedermolekularen Zuckern und MOS zu erreichen. Dabei sollte das Volumen des zur Aufreinigung genutzten Wassers aus wirtschaftlichen Gründen möglichst gering gehalten werden. Die Wiederfindungen von Galactose, Lactose,

des Oligosaccharids GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat sind in Abb. 4-55 gegenübergestellt.

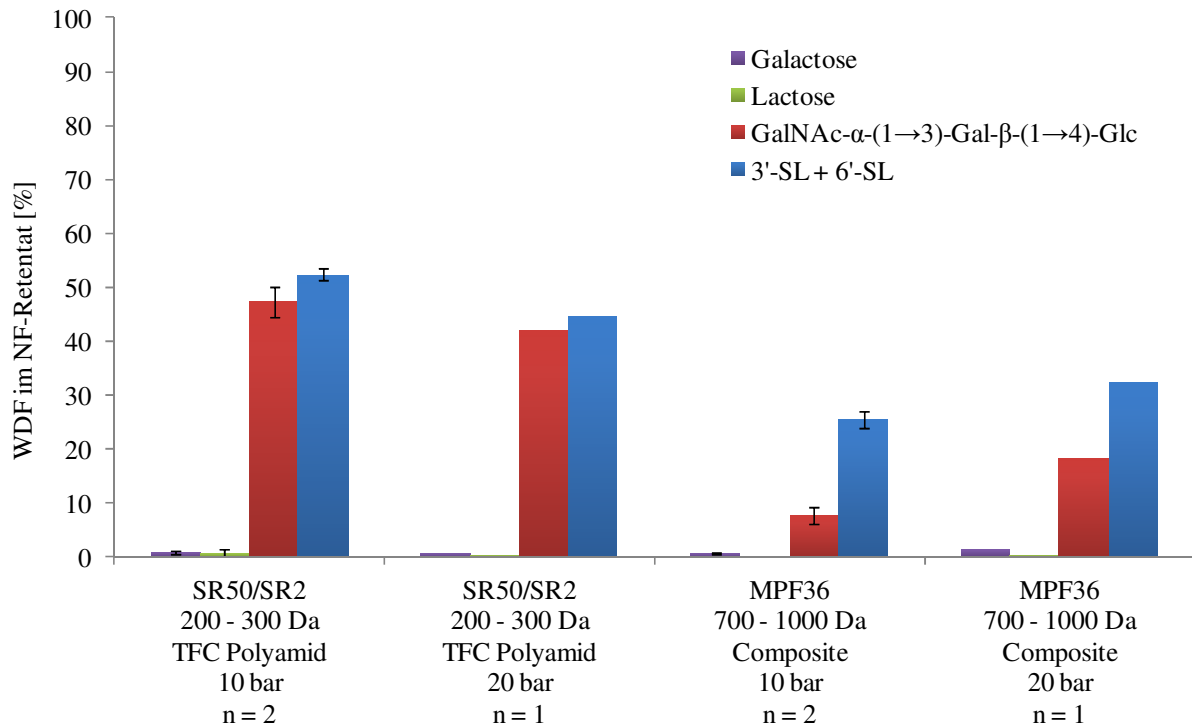


Abb. 4-55: Wiederfindungen von Galactose, Lactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie der Summe aus 3'-SL und 6'-SL im Nanofiltrationsretentat (Ausgangssubstanz: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat), Durchführung: Waschen um ca. Faktor 7 und Aufkonzentrierung um ca. Faktor 5, Maßstab: großtechnischer Maßstab, Anlage: Membranfiltrationsanlage, Druck: 10 bar bzw. 20 bar, Temperatur: ca. 40 °C, Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Gal und Lac: enzymatische Bestimmung)

Mit Hilfe der Membran SR50/SR2 konnte sowohl Lactose als auch Galactose nahezu vollständig aus dem Retentat entfernt werden. Die Wiederfindung der MOS lag dabei zwischen 42,1 % und 52,4 % (siehe Abb. 4-55). Eine nahezu vollständige Abtrennung von Galactose und Lactose sowie eine Wiederfindung der MOS von 7,7 % bis 25,5 % konnten mit der Membran MPF36 erzielt werden (siehe Abb. 4-55).

Die Wiederfindung der MOS im Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 liegt dabei deutlich höher als die Wiederfindung, die durch die Membran MPF36 erzielt werden konnte. Die besser geeignete Membran zur Trennung von Lactose und MOS stellt im großtechnischem Maßstab somit die Membran SR50/SR2 dar. Wie im Technikumsmaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.3) kann mit einem geringen Druck (10 bar) eine bessere Trennung von Lactose und MOS erzielt werden, da der Rückhalt der MOS im Retentat höher ist [ebenso: [Atra et al., 2005], [Botelho-Cunha et al., 2010], [Feng et al., 2009], [Goulas et al., 2002] und [Grandison et al., 2003]].

Die HPAEC-Chromatogramme der Nanofiltrationsretentate sowie der Ausgangslösung sind in Abb. 4-56 gegenübergestellt.

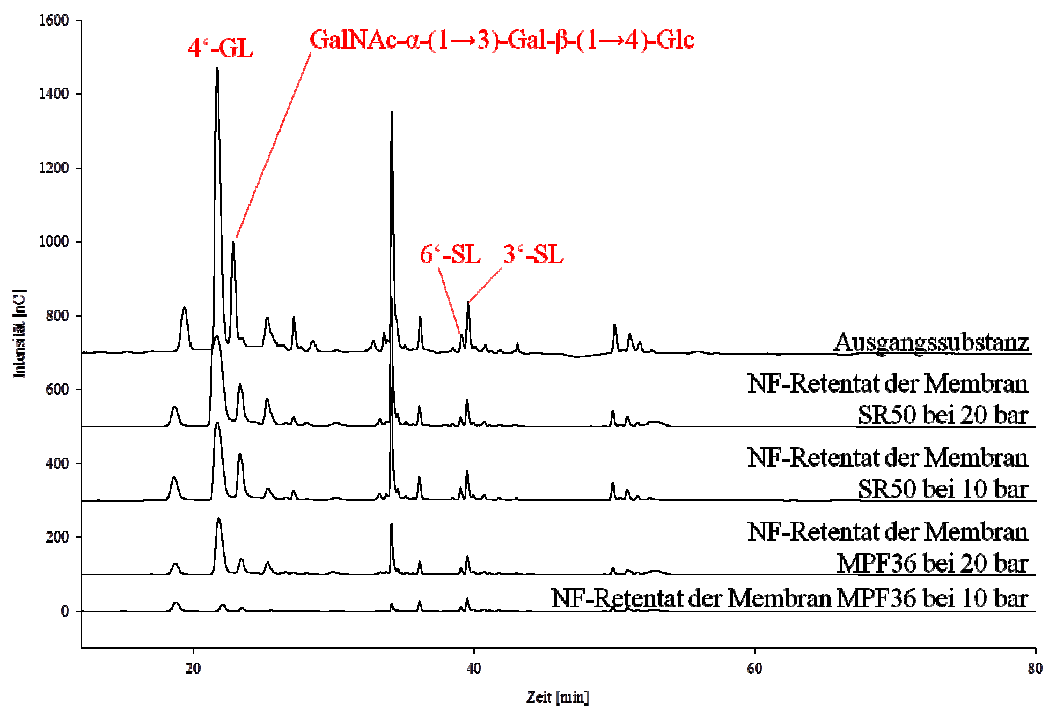


Abb. 4-56: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat) und das durch verschiedene Membranen bei 10 oder 20 bar aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Waschen um ca. Faktor 7 und Aufkonzentrierung um ca. Faktor 5, Maßstab: großtechnischer Maßstab, Anlage: Membranfiltrationsanlage, Temperatur: ca. 40 °C, Probenaufarbeitung für HPAEC-PAD: GCC-SPE (n = 2))

Die HPAEC-Chromatogramme der Nanofiltrationsretentate weisen im Vergleich zur Ausgangssubstanz keine zusätzlichen Peaks auf. Des Weiteren sind keine Peaks komplett verloren gegangen. Das Oligosaccharidmuster zwischen Ausgangssubstanz und der Nanofiltrationsretentate weisen somit große Ähnlichkeiten auf (siehe Abb. 4-56). Im Vergleich zu den Retentaten der MPF36 besitzt das Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 bei gleicher HPAEC-Verdünnung signifikant größere Peakflächen und damit verbunden höhere Rückhalte der Oligosaccharide. Dies trifft v. a. auf die quantifizierbaren MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL sowie auf das durch Hydrolyse mit der β -Galactosidase entstandene 4'-GL zu.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Analysenwerte der enzymatisch bestimmten Galactose und Lactose sowie der MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 3'-SL und 6'-SL - bestimmt nach GCC-SPE-Aufarbeitung mittels HPAEC - und der sialinsäurehaltigen Zucker nach Bestimmung mittels Perjodat-Resorcinol-Tests während der Nanofiltration mit der Membran SR50/SR2 bei 10 bar und 20 bar dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden Wiederfindungen der Kohlenhydrate angegeben. Der Resorcinol-Schwefelsäure-Test wurde verwendet, um den Gehalt an neutralen Zucker (v. a. Lactose) abzuschätzen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch die enzymatische Lactosebestimmung bestätigt.

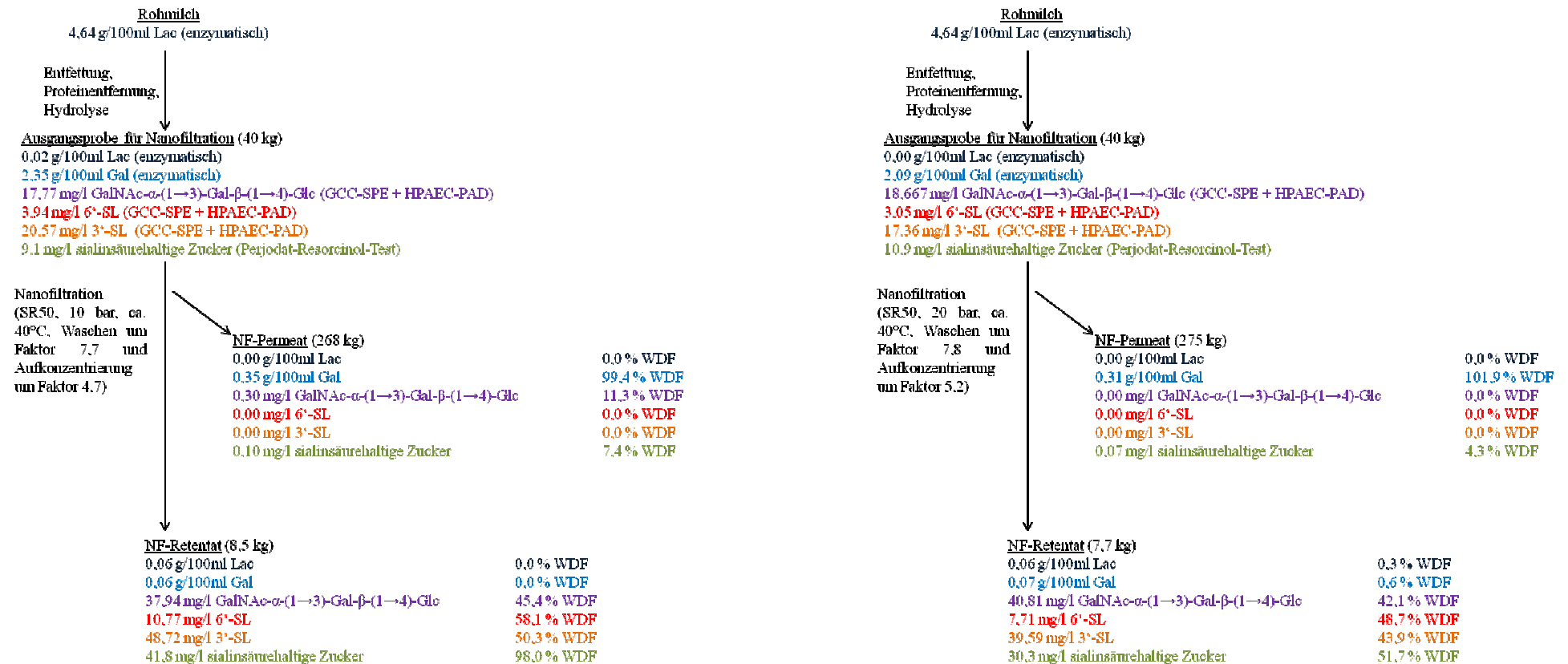


Abb. 4-57: Gehalte und Wiederfindungen (in Bezug auf die Ausgangssprobe, Ausnahme: Lactose-WDF auf Rohmilch bezogen) von Lactose, Galactose, GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL sowie sialinsäurehaltigen Zucker in den mit der Membran **SR50/SR2** (200 Da - 300 Da, Thin Film Composite) behandelten Proben (großtechnischer Maßstab, Druck: **10 bar (links)** bzw. **20 bar (rechts)**), Analytik der OS: HPAEC-PAD, Probenvorbereitung der OS: GCC-SPE (n = 2), Analytik der Gal und Lac: enzymatische Bestimmung, Analytik der sialinsäurehaltigen Zucker: Perjodat-Resorcinol-Test)

Die Gesamtwiederfindung der Lactose im Retentat und Permeat war bei beiden Versuchen wegen der vorangegangenen Hydrolyse erwartungsgemäß nahezu Null (siehe Abb. 4-57). Die Gesamtwiederfindung der MOS im Nanofiltrationsretentat und -permeat sollte nahe 100 % liegen. Wenn dies nicht erreicht wird, könnte analog zur Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2) vermutet werden, dass die restlichen Kohlenhydrate auf der Membran hängen geblieben sind und mit der Recovery (Waschen der Membran) detektiert werden könnten.

Der Perjodat-Resorcinol-Test zur Bestimmung der sialinsäurehaltigen Zucker wurde mit allen Nanofiltrationsproben durchgeführt. Damit sollte eine weitere, aufwendige Analyse mittels GCC-SPE und HPAEC-PAD vermieden werden, falls keine sialinsäurehaltigen Zucker im Retentat detektiert werden konnten. In allen gemessenen Nanofiltrationsretentaten konnten nachweisbare Mengen an sialinsäurehaltigen Kohlenhydraten gemessen werden.

Die sialinsäurehaltigen Zucker in Kuhmilch bestehen v. a. aus den MOS 3'-SL und 6'-SL (siehe Tab. 6-2 im Anhang). Eine Gegenüberstellung dieser beiden Analyten - gemessen mittels HPAEC-PAD nach GCC-SPE-Aufreinigung - und den sialinsäurehaltigen Zuckern - gemessen mittels Perjodat-Resorcinol-Tests - ist somit möglich. Bei der Nanofiltration mit 20 bar (siehe Abb. 4-57, rechts) stimmen die Gehalte und Wiederfindungen der Summe aus 3'-SL und 6'-SL mit den sialinsäurehaltigen Zuckern gut überein. Im Gegensatz dazu sind bei der Nanofiltration mit 10 bar große Unterschiede in Bezug auf die Wiederfindungen - jedoch nicht auf die Gehalte - messbar (siehe Abb. 4-57, links). Bei der Nanofiltration mit 10 bar ist die Wiederfindung der Summe aus 3'-SL und 6'-SL nach HPAEC-PAD-Analyse nur etwa halb so groß wie die Wiederfindung der sialinsäurehaltigen Zucker nach der Bestimmung mittels Perjodat-Resorcinol-Test (51,6 % vs. 98,0 % Wiederfindung). Durch die Nanofiltration bei 10 bar scheint eine andere Deckschicht als bei der Filtration mit 20 bar gebildet worden zu sein. Des Weiteren steigt bei einem geringeren Druck der Rückhalt der Kohlenhydrate im Retentat an [[Atra et al., 2005], [Botelho-Cunha et al., 2010], [Feng et al., 2009], [Goulas et al., 2002] und [Grandison et al., 2003]]. Bei einem Druck von 10 bar werden offensichtlich Substanzen zurückgehalten, die im Perjodat-Resorcinol-Test positiv reagieren und dadurch die Wiederfindung der sialinsäurehaltigen Zucker verändern. Bei der Nanofiltration mit 20 bar scheinen diese Substanzen abgetrennt zu werden, so dass die Wiederfindung der Summe aus 3'-SL und 6'-SL (HPAEC-PAD) sehr ähnlich zu der Wiederfindung der sialinsäurehaltigen Zucker (Perjodat-Resorcinol-Test) ist.

Beim Vergleich der Gehalte an Sialyllactosen (Summe aus 3'-SL und 6'-SL, gemessen nach GCC-SPE-Aufarbeitung mittels HPAEC, ca. 20 mg/l) in der Nanofiltrationsausgangsprobe mit den Analysenwerten für die sialinsäurehaltigen Zucker (gemessen mittels Perjodat-Resorcinol-Test, ca. 10 mg/l) sind ca. doppelt so hohe Werte anhand der HPAEC messbar (siehe Abb. 4-57). Die Gehalte der sialinsäurehaltigen Zucker im photometrischen Testsystem werden mit Hilfe einer N-Acetylneuraminsäure-Kalibrierung berechnet. Die molare Masse der N-Acetylneuraminsäure beträgt 309,3 g/mol und ist somit im Vergleich zu den zu quantifizierenden Substanzen (Sialyllactosen mit 633,6 g/mol) nur etwa halb so groß. Dadurch wird die Kalibriergerade des Testsystems sowie die errechneten Konzentrationen an sialinsäurehaltigen Zuckern maßgeblich um ca. den Faktor 2 beeinflusst. Mit Hilfe einer Sialyllactose-Kalibrierung würden daher doppelt so hohe Werte im Perjodat-Resorcinol-Test erwartet werden. Diese Werte würden gut mit den HPAEC-Werten übereinstimmen. Eine Kalibrierung mit Sialyllactose ist jedoch auf Grund der geringen Verfügbarkeit und den hohen Kosten des Standards nicht realisierbar. Da die Wiederfindungen beider Analysemethoden (HPAEC-PAD mit GCC-SPE-Aufarbeitung: 50,4 % Wiederfindung an 3'-SL und 66,4 % an 6'-SL (siehe Kapitel 4.1.1.2.3), Perjodat-Resorcinol-Test: 49,8 % Wiederfindung der sialinsäurehaltigen Zucker (siehe Kapitel 4.1.2.2)) annähernd gleich sind, sollten die Analysenwerte der beiden Methoden ca. um den oben beschriebenen Faktor 2 abweichen. Nach Abb. 4-57 sind in den Nanofiltrationsretentaten die Werte des Perjodat-Resorcinol-Tests jedoch nur ca. 30 % (bei 10 bar) bis 36 % (bei 20 bar) geringer als die HPAEC-PAD-Analysenwerte. Erhöhte Analysenwerte des Schnelltests im Vergleich zur HPAEC-PAD werden dabei v. a. im Retentat der Nanofiltration mit 10 bar gemessen, da scheinbar Substanzen zurückgehalten werden, die im Perjodat-Resorcinol-Test reagieren. Trotzdem ist eine Abschätzung der MOS-Aufreinigung bei den Nanofiltrationsversuchen mittels Perjodat-Resorcinol-Test möglich.

Das Mono-/Disaccharid-MOS-Verhältnis kann durch die Nanofiltration mit der Membran SR50/SR2 von ca. 1000:1 in Kuhmilch (siehe Kapitel 4.2.1) auf 22,7:1 bei einem verwendeten Druck von 20 bar bzw. auf 18,5:1 bei 10 bar reduziert werden (siehe Abb. 4-57). Das Verhältnis wird somit um das 50fache verbessert. Der Anteil der Oligosaccharide am Gesamtzuckergehalt wird von 0,1 % auf 4,2 % bei einem Druck von 20 bar bzw. auf 5,1 % bei 10 bar erhöht. Es kommt somit zu einer deutlichen Aufreinigung der MOS durch die Nanofiltration mit der Membran SR50/SR2, wobei die MOS-Aufreinigung bei 10 bar erfolgreicher als bei 20 bar ist.

Das Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 bei 10 bar wies eine Trockenmasse von 0,83 %, einen pH-Wert von 6,63, einen Aschegehalt von 0,29 % mit 0,05 % Calcium in der Asche, einen Lactosegehalt von 0,06 g/100ml, einen Galactosegehalt von 0,06 g/100ml, einen GOS-Gehalt von ca. 0,02 % (berechnet mittels Lactosekalibrierung), einen NPN von 0,02 % und einen Gesamtstickstoffgehalt von 0,08 % auf. Mittels HPLC konnten nur sehr geringe Mengen an Peptiden detektiert werden. Nach Elektrophoreseanalytik wurde α -Lactalbumin als Hauptbestandteil der Restproteine in dem Retentat identifiziert. Bezogen auf die Trockenmasse konnten 0,7 % Sialyllactosen, 0,5 % GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 2,2 % 6'-GL (berechnet mittels externer Lactosekalibrierung), 21,7 % Mono- und Disaccharide, 34,9 % Minerale, 45,8 % Milcheiweiße und 2,4 % NPN in dem Nanofiltrationsretentat gemessen werden.

Die Zucker-DC des Nanofiltrationsretentats der Membran SR50/SR2 bei 10 bar sowie die Zuckerstandards Glucose, Lactose, Melezitose, 3'-SL und 6'-SL sind in Abb. 4-58 dargestellt.

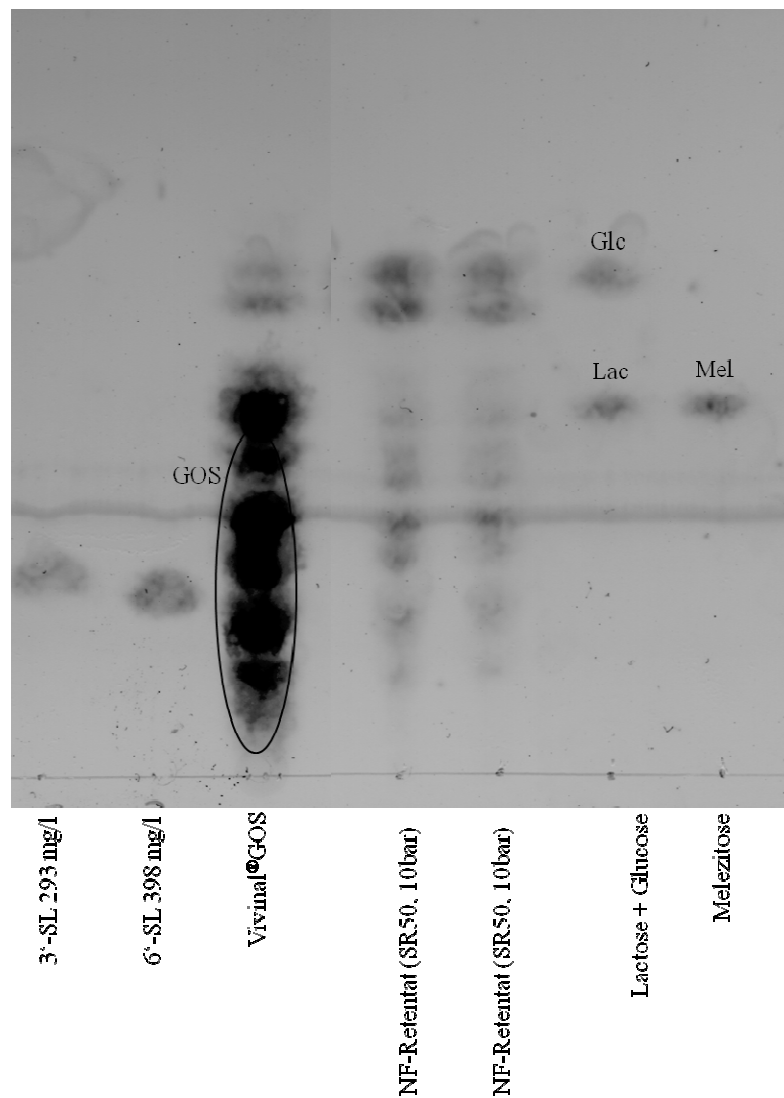


Abb. 4-58: Zucker-DC der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigte, MOS-haltige Probe (Probe: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat), der MOS-Standards 3'-SL und 6'-SL, des Vivinal®GOS-Sirups und der Kohlenhydratstandards Lactose, Glucose und Melezitose

Das Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 bei 10 bar weist neben Glucose, Galactose und Lactose einen hohen Anteil an höhermolekularen Zuckern mit geringer Retentionszeit der Zucker-DC auf (siehe Abb. 4-58). Neben den bisher quantifizierten Oligosacchariden 3'-SL und 6'-SL scheinen somit weitere MOS (oder mit Orcinol positiv reagierende Substanzen) in den Retentaten vorhanden zu sein. Durch die MOS-Aufreinigung mittels Nanofiltration konnte das Verhältnis von Mono-/Disacchariden zu MOS so stark

verbessert werden, dass - im Gegensatz zu Kuhmilch - neben den Mono- und Disacchariden auch MOS in der Zucker-DC deutlich sichtbar sind (siehe Abb. 4-58).

Mit Hilfe der Nanofiltration im großtechnischen Maßstab mit der Membran SR50/SR2 konnten bei 10 bar aus 40 kg UF-Magermilchpermeat 332,5 mg GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 91,5 mg 6'-SL und 414,1 mg 3'-SL gewonnen werden. Zusätzlich sind 5000 mg Lactose und 5100 mg Galactose in dieser gewonnenen Probe vorhanden. Bei der Herstellung einer Oligosaccharid-aufgereinigten Lösung aus dem Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 wären somit bei einem 5%igen Gehalt an Mono- und Disacchariden (analog zu Kuhmilch) 0,27 % MOS (GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 6'-SL und 3'-SL) in der Lösung vorhanden. Der MOS-Gehalt der so hergestellten Lösung wäre im Vergleich zu Kuhmilch mit ca. 0,005 % MOS deutlich größer. Die Ergebnisse der durch Nanofiltration aufgereinigten, MOS-haltigen Proben aus Kuhmilch sind auf Grund fehlender Literaturdaten schwer vergleichbar. Sarney et al. [2000] konnte aus einem Liter entfetteter, weitgehend proteinfreier und hydrolysiertes Humanmilch mittels Nanofiltration (30 bar) im Labormaßstab 6,7 g OS mit einer Reinheit von 97 % gewinnen. Martinez-Ferez et al. [2006] und Oliveira et al. [2012] konnten aus Ziegenmilch durch Ultrafiltration (50 kDa, Keramikmembran) und anschließender Nanofiltration (1 kDa, Keramikmembran) ein nahezu lactosefreies und salzfreies Endprodukt herstellen. Dabei konnten 80 % der originären Oligosaccharide der Ziegenmilch wiedergefunden werden. Beim Vergleich der Literaturdaten mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit können mit der analysierten Kuhmilch ähnlich gute Ergebnisse wie mit Ziegen- und Humanmilch erzielt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Nanofiltration - unabhängig vom Maßstab - MOS aus Kuhmilch deutlich aufgereinigt und Lactose bzw. Monosaccharide abgetrennt werden können. Dadurch kann das Mono-/Disaccharid-MOS-Verhältnis bei prozessoptimierten Bedingungen im großtechnischen Maßstab von ca. 1000:1 (in Kuhmilch) auf 18,5:1 verbessert sowie der Anteil der MOS am Gesamtzuckergehalt von 0,1 % auf 5,1 % erhöht werden.

4.4.2 **Aufreinigung der Oligosaccharide durch präparative Chromatographie an Aktivkohle**

4.4.2.1 Methodenentwicklung zur Aufreinigung der Oligosaccharide mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle

Die enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.3) und die durch Nanofiltration aufgereinigten, MOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1) müssen für weitere Untersuchungen - wie orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung - aufgereinigt werden. Dazu muss der Restlactosegehalt am Gesamtzuckergehalt auf unter 1 % gesenkt werden. Dies soll anhand einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle erfolgen.

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Hernández et al. [2009], Günther [2011] und der in dieser Arbeit entwickelten GCC-SPE-Aufarbeitung (siehe Kapitel 4.1.1.2.3). Die Versuche zur Entwicklung der Methode wurden mit enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Lösungen durchgeführt, da deren Analytik (Carrez-Fällung) im Vergleich zur MOS-Analytik einfacher durchführbar ist. Als Ausgangssubstanz wurde eine GOS-haltige Probe genutzt, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C und pH 4 (5 h) hergestellt wurde. Diese Probe enthielt 0,1 g/100 ml Galactose, 7,8 g/100 ml Glucose, 19,5 g/100 ml Lactose und 15,0 g/100ml GOS (entspricht allen Peaks des HPAEC-Chromatogramms (siehe Abb. 4-41) außer Galactose, Glucose und Lactose, Berechnung erfolgt mittels externer Lactosekalibrierung). Im Vergleich zur enzymatischen GOS-Synthese (siehe Kapitel 4.3.1.7) lagen leicht veränderte Analysenwerte vor, da die Synthese im Technikumsmaßstab durchgeführt wurde.

Die Eluation der Oligosaccharide von der Aktivkohle erfolgte analog zur GCC-SPE-Aufarbeitung mittels Ethanol. Ein linearer Gradient von 5 auf 50 % Ethanol sowie ein anschließender isokratischer Verlauf von 50 % Ethanol mit Ameisensäure (pH 2) wurde für die Zuckertrennung verwendet (siehe Tab. 4-15). Im Gegensatz zur GCC-SPE-Aufarbeitung mittels Acetonitril erfolgte die Eluation bei der präparativen Chromatographie an Aktivkohle mit Ethanol, da dieses Lösungsmittel in größeren Mengen und kostengünstig verfügbar ist. Des Weiteren konnte Ethanol am Vakuumrotationsverdampfer leichter als Acetonitril abgetrennt werden. Das Injektionsvolumen betrug 5 ml. Es wurden insgesamt 18 Fraktionen à fünf Minuten gesammelt.

Tab. 4-15: Trennprogramm für die Aufreinigung von OS mit Hilfe einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (Eluent A: Wasser, Eluent B: Ethanol, Eluent C: 50 % Ethanol mit 2,5 % HCOOH)

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Fluss [ml/min]
Injektion bei Minute Null				
0 - 30	95	5	0	1,0
30 - 60	50	50	0	1,0
60	0	0	100	0,75
60 - 90	0	0	100	0,75

In Vorversuchen wurden Ausgangsbedingungen mit einem Ethanolanteil von 0 % oder 5 % getestet. Dabei stellte sich die 5%ige Ethanollösung als geeigneter heraus, da Mono- und Disaccharide in kürzerer Zeit und erfolgreicher abgetrennt werden konnten. Durch weitere Optimierung konnte die Dauer des Gradienten auf 90 Minuten begrenzt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass maximal 5 ml einer 20%igen, GOS-haltigen Lösung auf eine mit ca. 7 g Aktivkohle gefüllte Chromatographiesäule gegeben werden kann, da anderenfalls keine Trennung zwischen den einzelnen Kohlenhydraten erfolgte.

Das Aktivkohle-Chromatogramm der aufgearbeiteten, GOS-haltigen Probe sowie die entsprechend aufgefangenen Fraktionen sind in Abb. 4-59 dargestellt.

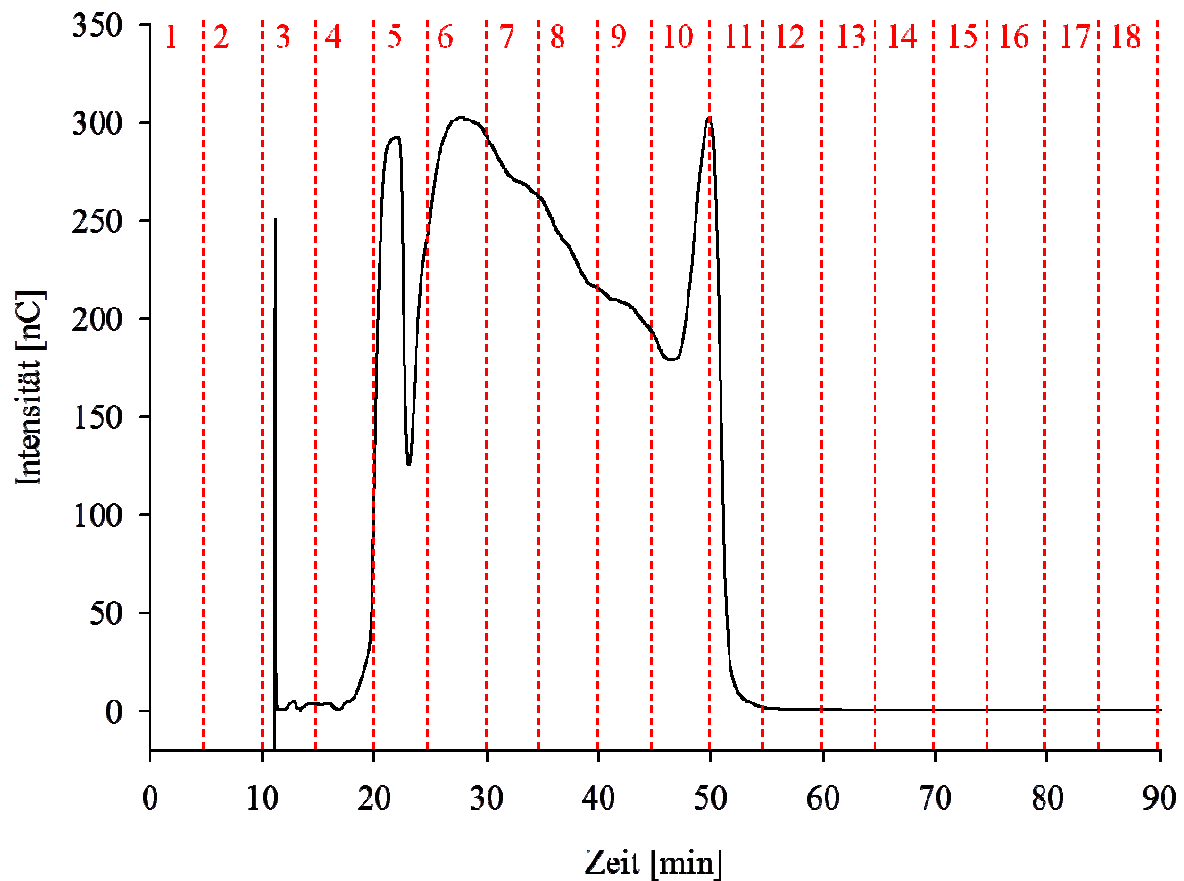


Abb. 4-59: Aktivkohle-Chromatogramm der mittels der β -Galactosidase aus *B. circulans* (12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h) hergestellten, aufgearbeiteten, GOS-haltigen Lösung (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Gradient: siehe Tab. 4-15)

Eine erfolgreiche Trennung der einzelnen Kohlenhydrate ist anhand des Aktivkohle-Chromatogramms nur zu erahnen (siehe Abb.4-59). Die einzelnen Fraktionen wurden deshalb mittels Zucker-DC (siehe Abb. 4-60) auf deren genaue Zusammensetzung hin untersucht.

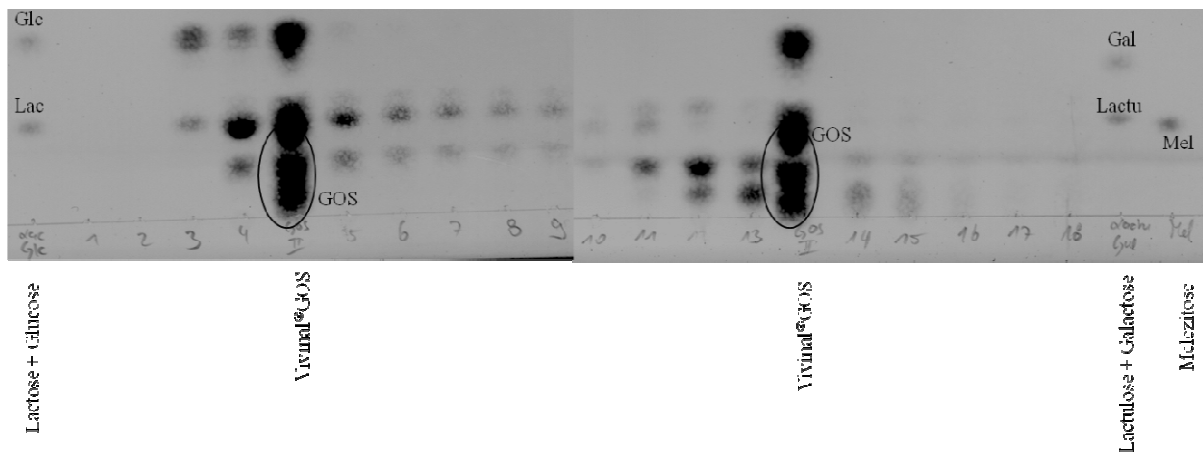


Abb. 4-60: Zucker-DC der mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* (12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h) hergestellten, GOS-haltigen Lösung nach Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (Aktivkohle: 90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Zucker-DC: Detektion mit Orcinol, Kieselgelplatte)

Die Monosaccharide eluieren v. a. in den Fraktionen drei und vier sowie geringfügig auch in Fraktion fünf. Das Disaccharid Lactose ist zum Großteil in den Fraktionen drei bis neun sowie in geringen Mengen in den Fraktionen zehn und elf messbar. Die Galacto-Oligosaccharide eluieren v. a. in den Fraktionen elf bis fünfzehn sowie zu geringen Anteilen in den Fraktionen vier bis zehn und sechzehn bis achtzehn (siehe Abb. 4-60).

In Übereinstimmung mit Packer et al. [1998] und Redmond and Packer [1999] eluieren von der Aktivkohle zuerst die Monosaccharide, gefolgt von den Disacchariden und den Oligosacchariden, wobei Kohlenhydrate mit höherer Molmasse später eluieren. Die Eluation der neutralen OS erfolgt analog zu Packer et al. [1998], Redmond and Packer [1999], Boon et al. [2000] und Hernández et al. [2009] mit Hilfe eines organischen Modifiers, in diesem Fall Ethanol. Nach Boon et al. [2000] weist Aktivkohle die höchste Affinität zu Trisacchariden und nur eine geringe Affinität zu Monosacchariden auf, wodurch eine Trennung der einzelnen Zuckerkomponenten möglich ist. Dies kann nach Auswertung der Zucker-DC bestätigt werden (siehe Abb. 4-60).

Nach den Ergebnissen der Zucker-DC können fünf Vereinigungen (V) aus den einzelnen Fraktionen gewonnen werden: V1 (Fraktion drei; bestehend aus Mono- und Disacchariden), V2 (Fraktionen vier und fünf; Mono- und Disaccharide sowie GOS), V3 (Fraktion sechs bis zehn; Disaccharide und GOS), V4 (Fraktion elf; Disaccharide und GOS) und V5 (Fraktionen zwölf bis achtzehn; GOS). Mittels HPAEC konnten die Zuckerzusammensetzungen der

einzelnen Vereinigungen bestätigt werden. Die Vereinigung V5 besteht demnach aus 0,02 g/100ml Glucose, 0,11 g/100ml Lactose und 2,35 g/100ml GOS (dies beinhaltet alle HPAEC-Peaks außer Galactose, Glucose und Lactose, berechnet mittels externer Lactosekalibrierung). Bezogen auf den Gesamtzuckergehalt entspricht dies 0,81 % Glucose, 4,44 % Lactose und 94,87 % GOS. In den 4 ml nach Aktivkohle-Aufreinigung erhaltenen Eluat sind somit 0,01 g Glucose, 0,02 g Lactose und 0,47 g GOS enthalten. Eine ca. 2,4%ige GOS-Lösung kann dementsprechend hergestellt werden.

Für orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung und für weitere Analysen wie NMR sowie Rückstellproben sind insgesamt 6 ml einer 5%igen OS-Lösung nötig. Die Aufreinigung mittels Aktivkohle wurde dafür fünffach durchgeführt (fünffache Injektion der Ausgangssubstanz sowie Vereinigung der Eluate). Die erhaltene Lösung wurde anschließend durch den Vakuumrotationsverdampfer um ca. den Faktor 3,3 aufkonzentriert. So sollten 6 ml einer 8%igen OS-Lösung hergestellt werden. Nach einer fünfmaligen Durchführung der Aktivkohle-Aufreinigung konnte eine aufgereinigte GOS-Lösung hergestellt werden, die 0,46 g/100ml Lactose (3,92 % des Gesamtzuckergehaltes) und 11,27 g/100ml GOS (96,08 % des Gesamtzuckergehaltes) enthält. Die Monosaccharide konnten dabei vollständig abgetrennt werden.

Für die orientierenden Studien zur gesundheitlichen Bewertung sollte der Anteil der Lactose am Gesamtzuckergehalt allerdings unter 1 % liegen, damit ausschließlich GOS-Analyten bei den Testsystemen untersucht werden. Aus diesem Grund wurde die aufgereinigte GOS-Lösung erneut einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle unterzogen. Da hierbei GOS-Verluste zu erwarten sind, musste das erhaltene Eluat mit Hilfe des Vakuumrotationsverdampfers stärker als bei den bisherigen Aufreinigungen aufkonzentriert werden. Durch die zweite Aktivkohle-Aufreinigungsphase konnte eine Lösung mit 0,03 g/100ml Lactose (0,55 % des Gesamtzuckergehaltes) und 5,39 g/100ml GOS (99,45 % des Gesamtzuckergehaltes) hergestellt werden. Die Wiederfindung der Galacto-Oligosaccharide nach beiden Aktivkohle-Aufreinigungsphasen beträgt im Vergleich zur Ausgangssubstanz 14,11 %, wohingegen nur 0,23 % Lactose und keine Monosaccharide wiedergefunden werden können.

Die Abtrennung der Mono- und Disaccharide von den GOS ist somit erfolgreich, obwohl ein beachtlicher Teil der GOS verloren ging. Die durch Aktivkohle aufgereinigten GOS-Analyten sind nur in geringen Mengen, aber in hoher Reinheit verfügbar. Der Einsatz dieser Methode zur Herstellung Oligosaccharid-angereicherter Lebensmittel im großtechnischen Maßstab

scheint daher unwirtschaftlich. Die Proben sind auf Grund ihres hohen Reinheitsgrades für orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung nutzbar.

4.4.2.2 Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle

Die in Kapitel 4.4.2.1 entwickelte Methode zur Aufreinigung der Oligosaccharide mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle wurde auf die verschiedenen enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (siehe Kapitel 4.3) angewendet. Dabei sollen GOS aufgereinigt sowie Mono- und Disaccharide abgetrennt werden. Die Wiederfindungen der verschiedenen Kohlenhydratkomponenten der GOS-haltigen Proben sind in Abb. 4-61 gegenübergestellt. Dabei erfolgt die Analytik der GOS anhand der Summe der HPAEC-Flächen außer Glucose, Galactose und Lactose sowie einer externen Lactosekalibrierung.

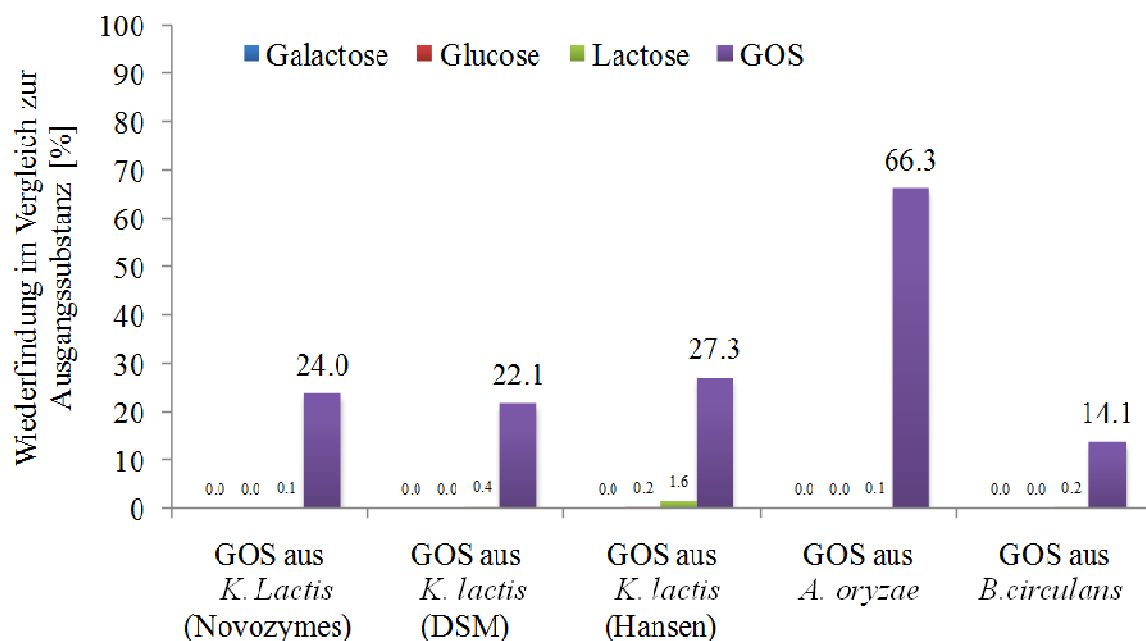


Abb. 4-61: Wiederfindungen von Galactose, Glucose, Lactose und GOS (berechnet mit externen Lactosekalibrierung, bestehend aus allen Analyten außer Glucose, Galactose und Lactose) nach Aktivkohle-Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (Reaktionsbedingungen: 12 U/g, 40 °C, pH 4 - 7, 4 h - 5 h je nach eingesetztem Enzym)

In allen GOS-haltigen Proben konnten die Monosaccharide und die Lactose von den GOS nach der zweiten Aktivkohle-Aufreinigungsphase nahezu vollständig abgetrennt werden (siehe Abb. 4-61). Dabei konnte der Lactosegehalt, bezogen auf den Gesamtzuckergehalt, auf unter 1 % reduziert werden. Dadurch sind orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung durchführbar. Die Ausnahme stellte die GOS-haltige Probe dar, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* des Herstellers Chr. Hansen A/S synthetisiert wurde, da der Restlactosegehalt - bezogen auf den Gesamtzuckergehalt - lediglich auf 1,6 % gesenkt werden konnte.

Trotz der unterschiedlichen Wiederfindungen der GOS - besonders in Bezug auf der mit der β -Galactosidase aus *A. oryzae* hergestellten, GOS-haltigen Probe (66,3 %) - konnten nach zwei Aktivkohle-Aufreinigungsphasen stets Gehalte von 5,0 g/100ml bis 6,3 g/100ml GOS detektiert werden. Bei einem hohen Lactosegehalt und einer geringen Konzentration an GOS - wie bei der GOS-haltigen Probe, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* hergestellt wurde (siehe Tab. 4-13) - ist die GOS-Wiederfindung nach Aktivkohle-Aufreinigung deutlich erhöht. Dagegen ist bei einem geringen Lactosegehalt und einer hohen GOS-Konzentration (wie bei der mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* hergestellten, GOS-haltigen Probe - siehe Tab. 4-13) mit höheren GOS-Verlusten zu rechnen. Die Aktivkohle-Trennung scheint somit von der Zusammensetzung der Ausgangslösung abhängig zu sein. Die Gehalte an Galactose, Glucose, Lactose und GOS, deren Anteil am Gesamtzucker sowie die Wiederfindungen der aufgereinigten Analyten sind im Anhang in Tab. 6-12 dargestellt. Zusätzlich zu den oben dargestellten Proben wurde Wasser als Kontrollprobe und der Vivinal®GOS-Sirup einmalig mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle aufgereinigt. Die HPAEC-Chromatogramme der aufgereinigten Proben nach Aktivkohle-Aufreinigung sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

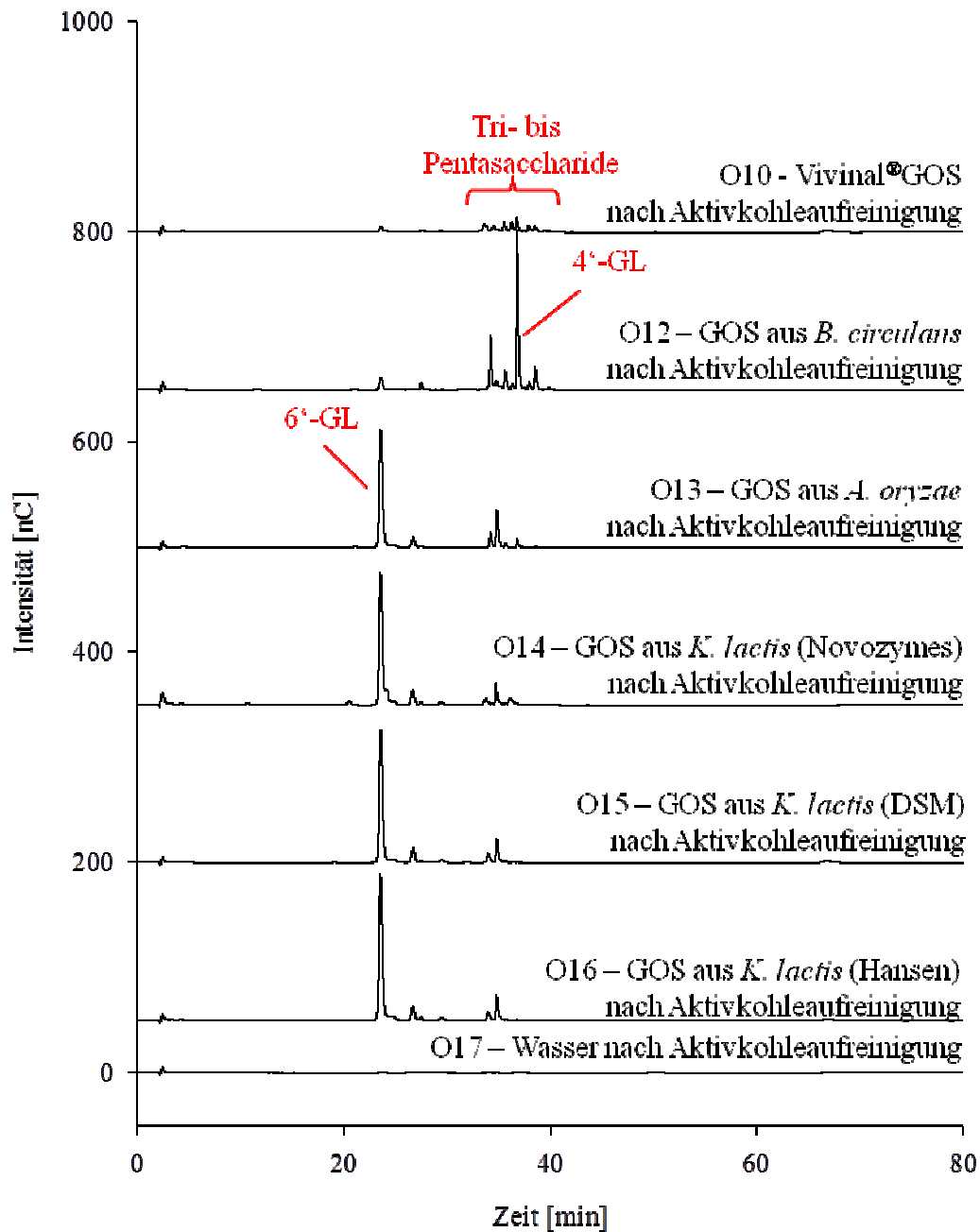


Abb. 4-62: HPAEC-Chromatogramme der mittels Aktivkohle aufgereinigten GOS-Lösungen (GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (Hersteller: Novozymes A/S bzw. Nutritional Products GmbH (DSM) bzw. Chr. Hansen A/S, 12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h), GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* (12 U/g, 40 °C, pH 4,5, 4 h), GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* (Hersteller: Chr. Hansen A/S, 12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h), Vivinal®GOS) sowie Wasser

Anhand der HPAEC-Chromatogramme wird sichtbar, dass die aufgereinigten GOS-Proben keine Mono- und Disaccharide (Peaks bis Minute 20) enthalten (siehe Abb. 4-62). In den

aufgereinigten GOS-Lösungen (O13 bis O16), die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae* hergestellt wurden, sind v. a. 6'-GL und Tri- bis Pentasaccharide detektierbar (siehe Abb. 4-62). 4'-GL sowie Tri-, Tetra- und Pentasaccharide können in den mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* hergestellten und mittels Aktivkohle aufgereinigten GOS-Proben (O12) detektiert werden (siehe Abb. 4-62). Der nach Aktivkohle aufgereinigte Vivinal[®]GOS-Sirup (O10) besteht v. a. aus Tri- bis Pentasacchariden. Die Peakflächen dieser Proben sind im Vergleich zu den anderen Proben deutlich geringer, da die Aktivkohle-Aufreinigung nur einfach durchgeführt wurde. In der aufgereinigten Wasserprobe können keine Zuckeranalyten detektiert werden (siehe Abb. 4-62).

Durch die Aktivkohle-Aufreinigung können somit Mono- und Disaccharide von den GOS erfolgreich abgetrennt werden. Dabei können aufgereinigte GOS-Proben mit hoher Reinheit erhalten werden, wodurch orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung durchführbar sind.

4.4.2.3 Aufreinigung von MOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle

MOS-haltige Proben wurden in Anlehnung an die in Kapitel 4.4.2.1 entwickelte Methode zur Oligosaccharidaufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle untersucht. Dabei wurde die Effektivität der Trennung durch einmalige Injektion der Ausgangslösung getestet. Als Ausgangsprobe wurde das Nanofiltrationsretentat der Membran SR50/SR2 aus dem großtechnischen Maßstab (siehe Kapitel 4.4.1.4) genutzt. Dieses Nanofiltrationsretentat ist zwar zur Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels geeignet, jedoch nicht für weitere Analysen - wie orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung - verwertbar. Dies liegt darin begründet, dass der Lactosegehalt - bezogen auf den Gesamtzuckergehalt - mit 31,6 % für die Testsysteme zu hoch ist.

Die Fraktionen eins bis achtzehn der nach Aktivkohle aufgereinigten MOS-Proben wurden auf Anwesenheit von Kohlenhydraten und Proteinen mittels Tüpfeltests überprüft (siehe Abb. 4-63). Im Vergleich zur Aufreinigung der GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.2.2) ist dies notwendig, da durch die vorangegangene Nanofiltration Proteine im Nanofiltrationsretentat aufkonzentriert werden könnten (siehe Kapitel 4.4.1.4).

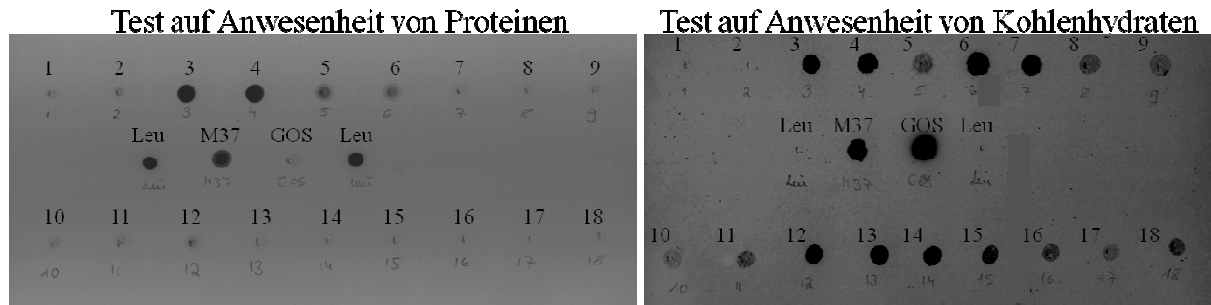


Abb. 4-63: Tüpfeltests zum Nachweis von Proteinen (links) und Kohlenhydraten (rechts) in den verschiedenen Eluaten nach Aktivkohle-Aufreinigung einer MOS-haltigen Probe (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min, Probe: der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigten MOS (Name: M37, Ausgangssubstrat: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat)

In den Fraktionen drei bis sechs sind Proteine nachweisbar (siehe Abb. 4-63, links), wodurch eine Analyse mittels HPAEC-PAD problematisch wird. Kohlenhydrate können in den Fraktionen drei bis achtzehn detektiert werden (siehe Abb. 4-63, rechts). Die Fraktionen drei, vier, sechs, sieben und zwölf bis fünfzehn weisen erhöhte Konzentrationen an Zuckern auf. Da eine Trennung der Kohlenhydrate mittels Tüpfeltest nicht abschätzbar ist, wurde eine Zucker-DC der Fraktionen eins bis achtzehn durchgeführt (siehe Abb. 4-64)

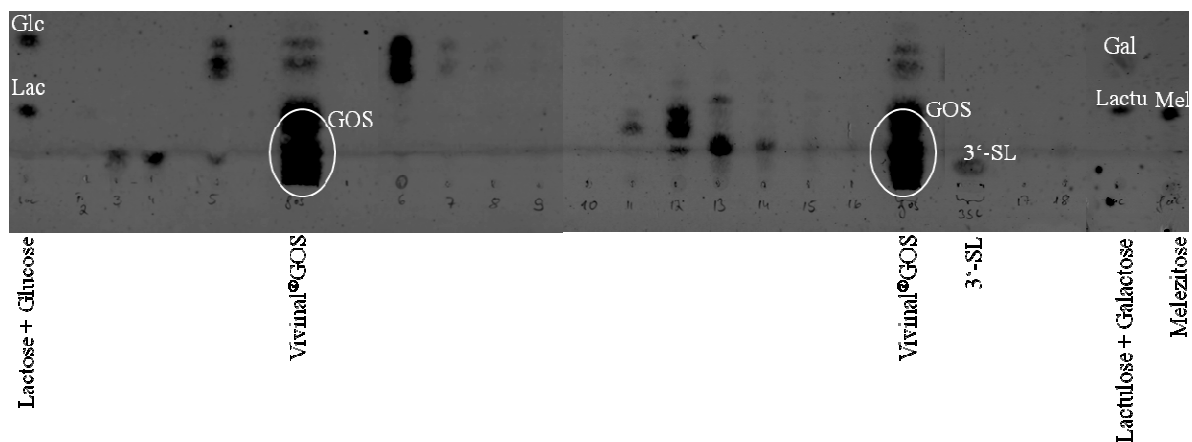


Abb. 4-64: Zucker-DC der verschiedenen Eluate nach Aktivkohle-Aufreinigung einer MOS-haltigen Probe (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min. Probe: der mit Hilfe der Membran SR50/SR2 (bei 10 bar) im großtechnischen Maßstab aufgereinigten MOS (Ausgangssubstrat: lactosehydrolysiertes UF-Magermilchpermeat, DC: +- Detektion mit Orcinol, Kieselgelplatte)

Nach Analyse der Zucker-DC können Monosaccharide überwiegend in den Fraktionen fünf bis sieben sowie geringfügig in Fraktion acht nachgewiesen werden (siehe Abb. 4-64). Das Disaccharid Lactose kann auf Grund der vorherigen Lactosehydrolyse (siehe Kapitel 4.4.1.4) nur zu sehr geringen Anteilen in den Fraktionen zwölf und dreizehn gemessen werden. Die Oligosaccharide werden überwiegend in den Fraktionen elf bis vierzehn sowie in geringeren Konzentrationen in den Fraktionen drei bis fünf und fünfzehn bis achtzehn detektiert (siehe Abb. 4-64). Eine Trennung zwischen Mono-/Disacchariden und MOS scheint somit durch präparative Chromatographie an Aktivkohle möglich. Die Fraktionen zwölf bis achtzehn besitzen nach Zucker-DC einen geringen Anteil an Mono- und Disacchariden sowie eine hohe Konzentration an höhermolekularen, noch nicht identifizierten Kohlenhydraten. Weitere höhermolekulare Zucker sind auch in den Fraktionen drei und vier messbar, wobei diese von den anderen höhermolekularen OS (Fraktionen zwölf bis achtzehn) abgetrennt wurden.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur Identifizierung der bisher unbekannt, höhermolekularen Kohlenhydrate wurde eine weitere Analyse mittels HPAEC-PAD durchgeführt. Die Fraktionen zwölf und dreizehn enthalten nach HPAEC-Analyse hauptsächlich GOS (6'-GL und Tri- bis Pentasaccharide), die auf Grund der Hydrolyse mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* vor der Nanofiltration gebildet wurden (siehe Kapitel 4.4.1.4). Zusätzlich zu den GOS kann in den Fraktionen zwölf bis vierzehn das milcheigene Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc detektiert werden. Das milcheigene Oligosaccharid 3'-SL liegt im Ausgangsprodukt in ähnlicher Größenordnung wie GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc vor, kann jedoch in den Fraktionen zwölf bis achtzehn nicht detektiert werden. Die Sialyllactosen werden somit durch die Aktivkohle-Aufreinigung abgetrennt und nicht wie die GOS bzw. das Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc aufgereinigt. Nach der Zucker-DC könnten die Sialyllactosen in den Fraktionen drei und vier detektiert werden, da die Retentionszeit der unbekannt Substanzen in diesen Fraktionen mit der Retentionszeit des Oligosaccharidstandards 3'-SL übereinstimmt. Auf Grund des hohen Proteinanteils der Fraktionen ist eine Bestätigung dieser Annahme mittels HPAEC-PAD nicht möglich. Da die Durchführung der präparativen Chromatographie an Aktivkohle analog zur GCC-SPE erfolgte (siehe Kapitel 4.1.1.2.3), werden ähnliche Sialyllactosewiederfindungen von ca. 50 % erwartet. Dies konnte experimentell nicht bestätigt werden, was auf eine Überladung der Säule, eine im Vergleich zur GCC-SPE anderen Konditionierung der Säule oder andere Zusammensetzung der stationären Phase zurückzuführen sein könnte.

Mit Hilfe der Aktivkohle-Aufreinigung von MOS-haltigen Ausgangsproben können die Mono- und Disaccharide (Fraktionen fünf bis sieben) von den GOS (Fraktionen zwölf und dreizehn) sowie dem MOS GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc (Fraktionen zwölf bis vierzehn) abgetrennt werden. Die Sialyllactosen gehen dabei nahezu vollständig verloren. Aus diesem Grund und der vermuteten gesundheitsfördernden Wirkung von Sialyllactosen (siehe Kapitel 2.2.2.2.3) sind Methoden Anpassungen verbunden mit weiteren Forschungsaktivitäten notwendig.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die präparative Chromatographie an Aktivkohle die enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.3) soweit aufgereinigt werden können, dass der Lactosegehalt am Gesamtzuckergehalt auf unter 1 % gesenkt werden konnte. Dadurch sind weitere Untersuchungen, wie orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung, möglich. Die Aufreinigung der durch Nanofiltration erzeugten, MOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1) war teilweise erfolgreich. Mono- und Disaccharide konnten von den Oligosacchariden abgetrennt werden, jedoch gingen die sauren MOS 3'-SL und 6'-SL, die nach Kapitel 2.2.2.2.3 vermutlich eine gesundheitsfördernde Wirkung besitzen, vollständig verloren. In diesem Bereich sind daher weitere Forschungsarbeiten notwendig.

4.4.3 Vergleich der Methoden zur Aufreinigung von Oligosacchariden (Nanofiltration vs. präparativer Chromatographie an Aktivkohle)

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der OS-Aufreinigung mittels Nanofiltration und präparativer Chromatographie an Aktivkohle gegenübergestellt. Ein direkter Vergleich beider Methoden ist nur anhand der GOS-haltigen Probe möglich, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (Hersteller: Novozymes A/S, pH 7, 40 °C, 12 U/g, 5 h) hergestellt wurde. Diese Ausgangsprobe wurde sowohl durch Cross-Flow-Filtration im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.4.1.2.1) als auch mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.4.2.2) aufgereinigt. Die HPAEC-Chromatogramme dieser aufgereinigten Proben und der Ausgangsprobe sind Abb. 4-65 dargestellt.

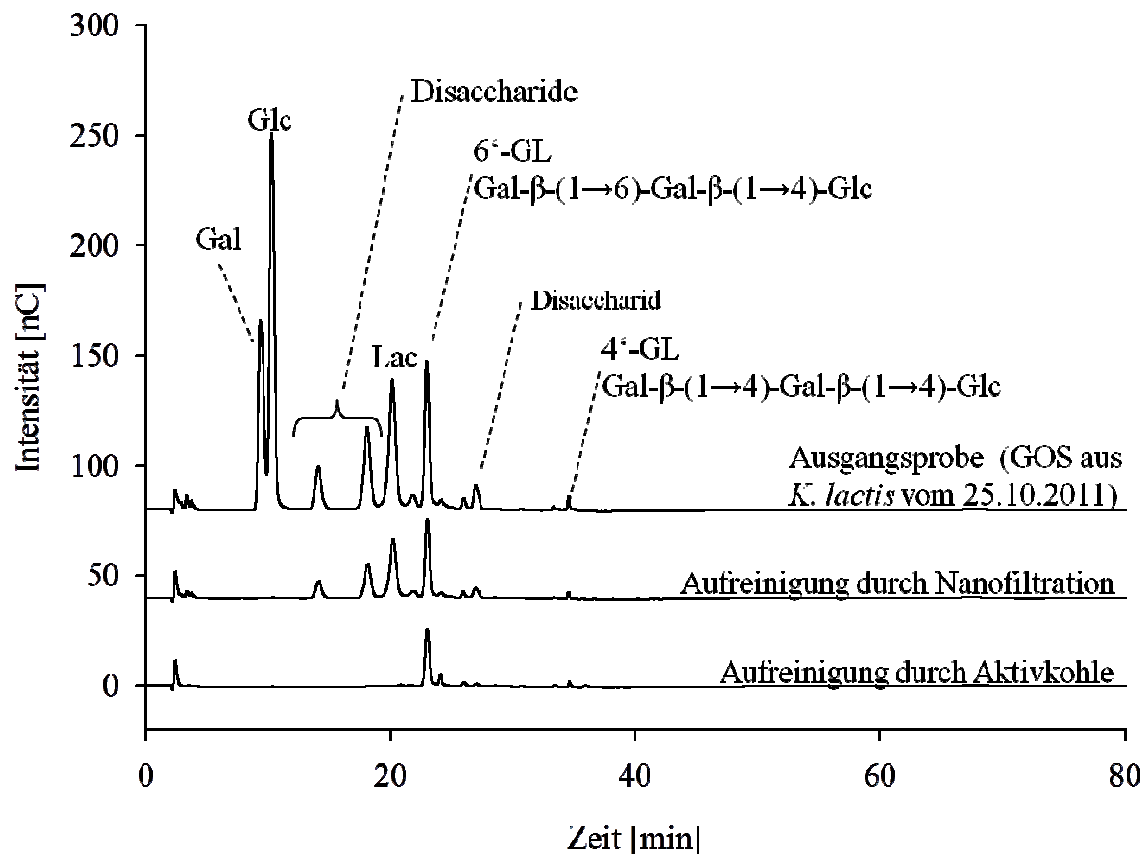


Abb. 4-65: HPAEC-Chromatogramme der mit β -Galactosidase aus *K. lactis* (12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h) hergestellten, GOS-haltigen Lösung (Ausgangssprobe) sowie nach Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (90min-Lauf, Fraktionen à 5 min) und Aufreinigung mittels Nanofiltration (Membran SR100 (ca. 400 Da, TFC polyamid), Durchführung: Diafiltration mit einem Waschfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min)

Mit Hilfe der Aktivkohle-Aufreinigung können Mono- und Disaccharid abgetrennt sowie Trisaccharide aufgereinigt werden. Dagegen können mittels Nanofiltration nur Monosaccharide abgetrennt werden. Disaccharide und GOS verblieben im Nanofiltrationsretentat (siehe Abb. 4-65). Das Nanofiltrationsretentat der aufgereinigten, GOS-haltigen Probe besteht aus 0,01 g/100ml Galactose (0,1 % Anteil am Gesamtzucker; 0,7 % Wiederfindung im Vergleich zur Ausgangslösung), 0,18 g/100ml Glucose (2,5 % Anteil am Gesamtzucker; 6,3 % Wiederfindung), 0,49 g/100ml Lactose (6,9 % Anteil am Gesamtzucker; 54,4 % Wiederfindung) und 6,45 g/100ml GOS (90,5 % Anteil am Gesamtzucker; 41,1 % Wiederfindung). Die GOS werden dabei anhand aller HPAEC-Peaks

außer den Analyten Galactose, Glucose und Lactose mit Hilfe einer externen Lactosekalibrierung ermittelt. Die zu Lactose isomeren Disaccharide werden somit in den Analysenwert für GOS eingeschlossen. Die nach präparativer Chromatographie an Aktivkohle aufgereinigte GOS-Lösung besteht aus 0,01 g/100ml Lactose (0,2 % Anteil am Gesamtzucker; 0,1 % Wiederfindung) und 5,79 g/100ml GOS (99,8 % Anteil am Gesamtzucker; 24,0 % Wiederfindung). Somit können GOS - v. a. das Trisaccharid 6'-GL - aufgereinigt und Mono- sowie Disaccharide abgetrennt werden. Die GOS-Aufreinigung mittels Aktivkohle ist demnach effektiver als die Aufreinigung mittels Nanofiltration.

Durch die Aktivkohle-Aufreinigung können sehr reine Substanzen (ca. 99,8 %) gewonnen werden, wodurch weitere Analysen - u. a. orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung - möglich sind. Die Herstellung eines funktionellen Lebensmittels ist auf Grund der geringen Verfügbarkeit dieser Substanzen nur bedingt möglich. Mit Hilfe der Nanofiltration können aufgereinigte Oligosaccharid-Lösungen (Reinheitsgrad von 90,5 %) hergestellt werden, die auf Grund der großen, verfügbaren Mengen zur Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels geeignet sind. Orientierende Studien sind auf Grund des geringeren Reinheitsgrades nicht möglich. Analog zu Hernández et al. [2009] konnte mit Hilfe der präparativen Chromatographie an Aktivkohle eine bessere OS-Aufreinigung erzielt werden als durch die Aufreinigung mittels Nanofiltration.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass durch die Nanofiltration MOS aus Kuhmilch aufgereinigt werden können. Das Lactose-MOS-Verhältnis in Kuhmilch konnte im großtechnischen Maßstab von ca. 1000:1 auf 22,7:1 zu Gunsten der MOS verbessert werden. Die aufgereinigte, MOS-haltige Lösung könnte auf Grund der hohen, verfügbaren Mengen zur Herstellung eines funktionellen Lebensmittels verwendet werden. Für die gesundheitliche Bewertung - wie orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung - sind weitere Aufreinigung, die den Restlactosegehalt am Gesamtzuckergehalt auf unter 1 % senken, notwendig. Dies erfolgte mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle. Enzymatisch synthetisierte, GOS-haltige Proben (siehe Kapitel 4.3) konnten mit dieser Methode erfolgreich aufgereinigt werden und sind somit für orientierende Studien nutzbar. Bei der Aktivkohle-Aufreinigung der durch Nanofiltration gewonnenen, MOS-haltigen Proben (siehe Kapitel 4.4.1) bedarf es weiterer Forschung, da Mono- und Disaccharide von neutralen MOS abgetrennt werden konnten, aber saure MOS gleichzeitig verloren gingen.

4.5 Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung von Oligosacchariden

Für die Herstellung potentiell funktioneller Lebensmittelinhaltsstoffe wurden GOS enzymatisch hergestellt (siehe Kapitel 4.3) sowie MOS durch Nanofiltration aus Kuhmilch aufgereinigt (siehe Kapitel 4.4.1). Diese Oligosaccharide sind auf Grund ihrer großen, verfügbaren Mengen direkt im Lebensmittel einsetzbar. Orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung sind jedoch erst nach Abtrennung der verbliebenen Lactose möglich. Nach einer präparativen Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.4.2) konnte der Lactosegehalt - bezogen auf den Gesamtzuckergehalt - der GOS-haltigen Proben auf unter 1 % gesenkt werden. Somit sind orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung möglich. Damit soll die Funktionalität der eingesetzten Oligosaccharide belegt werden.

Die Aktivkohle-Aufreinigung der MOS-haltigen Proben ist noch nicht abgeschlossen. Hierbei liegt die besondere Herausforderung in der Vermeidung des Verlustes der sauren MOS. Folglich konnten keine orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung der MOS-haltigen Proben durchgeführt werden.

Die in Kapitel 4.4.2.2 aufgereinigten GOS-Proben (siehe Tab. 4-16) wurden auf einen Gesamtzuckergehalt von 5 % (50 g/l) eingestellt und auf ihre bifidogene Wirkung untersucht. Für diese orientierenden Studien wurde eine konstante Zuckerkonzentration genutzt, damit die Analyten untereinander vergleichbar sind. Die Standardsubstanzen Glucose und Lactose erreichen bei der menschlichen Verdauung den Wirkort der Oligosaccharide - den Dickdarm - nicht und wurden daher als Positivkontrolle mitgeführt. Des Weiteren wurde die als bifidogen anerkannte Lactulose als Kontrollsubstanz analysiert. Als Negativkontrolle wurde der durch einmalige Aktivkohle-Aufreinigung behandelte Wasserblindwert genutzt.

Tab. 4-16: Enzymatisch hergestellte und mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle aufgereinigte, GOS-haltige Proben, die für die orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung zur Verfügung stehen (DGL = Digalactosyllactose = Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, TGL = Trigalactosyllactose = Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc)

Probenname	Probenbeschreibung	Inhaltsstoffe
O12	aufgereinigte GOS-Lösung, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>B. circulans</i> (pH 4, 12 U/g, 40 °C, 5 h, 25.10.2011)	Gesamtzuckeranteil: 5 % (d.h. 50 g/l) 0,60 % vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 99,40 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 5,82 % 6'-GL, 15,97 % 4'-GL, 6,23 % Tetrasaccharid bei 34,8 min, 48,53 % DGL, 7,30 % TGL, 15,55 % andere GOS)
O13	aufgereinigte GOS-Lösung, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (pH 4,5, 12 U/g, 40 °C, 4 h, 25.10.2011)	Gesamtzuckeranteil: 5 % (d.h. 50 g/l) 0,59% vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 99,41 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 67,74 % 6'-GL, 5,79 % 4'-GL, 12,27 % Tetrasaccharid bei 34,8 min, 13,65 % andere GOS)
O14	aufgereinigte GOS-Lösung, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (Enzymhersteller: Novozymes A/S, pH 7, 12 U/g, 40 °C, 5 h, 05.03.2012)	Gesamtzuckeranteil: 5 % (d.h. 50 g/l) 0,14 % vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 99,86 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 75,06 % 6'-GL, 3,58 % 4'-GL, 7,18 % Tetrasaccharid bei 34,8 min, 14,04 % andere GOS)
O15	aufgereinigte GOS-Lösung, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (Enzymhersteller: DSM Nutritional Products GmbH, pH 7, 12 U/g, 40 °C, 5 h, 05.03.2012)	Gesamtzuckeranteil: 5 % (d.h. 50 g/l) 0,03 % vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 99,97 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 73,58 % 6'-GL, 4,02 % 4'-GL, 7,11 % Tetrasaccharid bei 34,8 min, 15,26 % andere GOS)

Probenname	Probenbeschreibung	Inhaltsstoffe
O16	aufgereinigte GOS-Lösung, hergestellt mit Hilfe der β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (Enzymhersteller Chr. Hansen A/S, pH 7, 12 U/g, 40 °C, 5 h, 05.03.2012)	Gesamtzuckeranteil: 5 % (d.h. 50 g/l) 0,02 % vom Gesamtzuckeranteil = Galactose 0,97 % vom Gesamtzuckeranteil = Glucose 1,61 % vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 97,42 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 57,97 % 6'-GL, 2,69 % 4'-GL, 5,62 % Tetrasaccharid bei 34,8 min, 31,14 % andere GOS)
O17	Leerwert (Wasser)	Gesamtzuckeranteil: 0,02 % (d.h. 0,2 g/l) 0,00 % vom Gesamtzuckeranteil = Galactose 100,00 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (davon: 100,00 % 6'-GL)
O10	aufgereinigte GOS-Lösung von Vivinal®GOS	Gesamtzuckeranteil: 4,7 % (d.h. 47 g/l) 0,38 % vom Gesamtzuckeranteil = Lactose 99,62 % vom Gesamtzuckeranteil = GOS (viele verschiedene Tri- bis Pentasaccharide)

Die orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung wurden anhand eines *in-vitro*-Testsystems mit dem Mikroorganismus *Bifidobacterium longum* (untersuchte Stämme: F 011 A3 und F 024 A1) durchgeführt (siehe Abb. 4-66). Dieses Bakterium wurde verwendet, da es aerob wachsen und somit eventuell als Synergetikum im Lebensmittel eingesetzt werden kann. In Vorversuchen wurde zusätzlich der Mikroorganismus *Bifidobacterium bifidum* (Stamm: F 002 A1) verwendet. Mit *B. bifidum* konnten im Vergleich zu den Stämmen von *B. longum* deutlich geringe optische Dichten (oD) erzielt werden. Auf Grund der höheren optischen Dichten wurden ausschließlich die Stämme von *Bifidobacterium longum* für alle weiteren Tests genutzt (siehe Abb. 4-66).

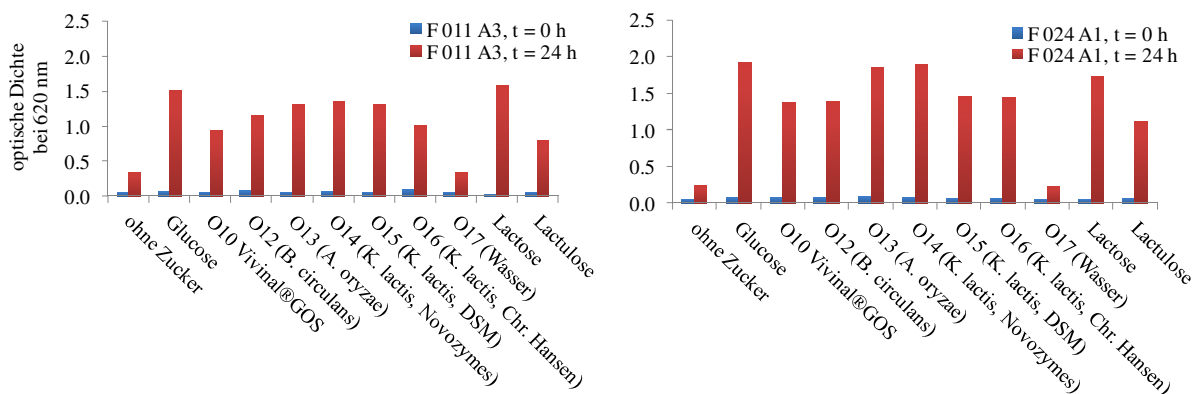


Abb. 4-66: Ergebnisse der Untersuchung für die orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung (n = 3) mit aufgereinigten, GOS-Proben (O10 bis O17) sowie 5%ige Standardsubstanzen (Glucose, Lactose und Lactulose) (F 011 A3 und F 024 A1 = Stämme von *Bifidobacterium longum*, Bifidogenitätsmessung durch Ermittlung der optischen Dichte bei 620 nm vor und nach Inkubation (24 h) des Mediums)

Bei den untersuchten Stämmen des Bakteriums *Bifidobacterium longum* konnten die höchsten optischen Dichten mit dem Zuckerstandard Glucose gemessen werden (siehe Abb. 4-66). Dieser Standard kann somit als Positivkontrolle für das *in-vitro*-Testsystems genutzt werden. Zur Bewertung der übrigen Zuckeranalyten wurde der Glucosestandard auf 100 % gesetzt und die optischen Dichten der weiteren Zuckeranalyten ins Verhältnis zu dem Glucosestandard gesetzt. Die Lactosestandards zeigten bei den Testsystemen ähnliche Ergebnisse wie Glucose (90,5 % bis 104,2 % je nach Stamm im Vergleich zur Glucose).

Die als bifidogen anerkannte Lactulose [Olano and Corzo, 2009] erzielt analog zu den Oligosacchariden - im Gegensatz zu Glucose und Lactose - ihre bifidogene Wirkung im Dickdarm. Im Vergleich zur Glucose wies Lactulose je nach eingesetztem Stamm eine 52,3%ige bis 58,4%ige Wirkung auf (siehe Abb. 4-66).

Die im Testsystem mitgeführte Negativlösung - eine durch Aktivkohle aufgereinigte Wasserprobe - zeigte im Vergleich zur Glucose nur einen 11,5%igen bis 22,6%igen Anstieg des Wachstums an *Bifidobakterien* (siehe Abb. 4-66). Bei der mitgeführten zuckerfreien Lösung (Wachstumsanstieg: 12,6 % bis 23,0 %) konnten ähnliche Werte wie bei der Negativkontrolle erzielt werden. Außerdem wird deutlich, dass die vorherige Aktivkohle-Behandlung der Probe keinen Einfluss auf das *in-vitro*-Testsystem zur Bestimmung der potentiell bifidogenen Wirkung hat, da keine erhöhten Werte der Negativprobe im Vergleich zur zuckerfreien Lösung gemessen werden konnten (siehe Abb. 4-66).

Der mit Aktivkohle aufgereinigte Vivinal®GOS-Sirup zeigte im Vergleich zu Glucose einen 62,4%igen bis 71,5%igen Anstieg des Wachstums an *Bifidobakterien* (siehe Abb. 4-66). Der aufgereinigte Vivinal®GOS-Sirup weist somit eine potentiell bifidogene Wirkung auf. Prasad et al. [2013] und Walton et al. [2012] konnten ebenfalls einen Anstieg des Wachstums an *Bifidobakterien* durch Vivinal®GOS-Sirup im Zellkultursystem und in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Crossover-Studie messen. In einer Humanstudie konnte ein Anstieg des Wachstums der Gesamt-*Bifidobakterien* im menschlichen Stuhl durch Vivinal®GOS-Sirup nachgewiesen werden [Alander et al., 2001]. Ein Wachstumsanstieg von *B. longum* konnte mit einer aufgereinigten Lösung an Vivinal®GOS-Sirup im Zellkultursystem detektiert werden [Barboza et al., 2009]. Durch die Erkenntnisse der in dieser Arbeit genutzten *in-vitro*-Zellkultursysteme sowie den oben dargestellten Forschungsergebnissen konnte ein potentiell bifidogener Effekt des aufgereinigten Vivinal®GOS-Sirups bestätigt werden.

Die mit Aktivkohle aufgereinigten GOS-Proben (O11 - O16) wiesen im Vergleich zur Glucose einen 67,3%igen bis 98,6%igen Anstieg des Wachstums von *B. longum* (F 011 A3: 67,3 % - 93,6 %, F 024 A1: 72,3 % - 98,6 %) auf (siehe Abb. 4-66). Alle analysierten GOS-Proben zeigen somit im Testsystem eine deutliche potentiell bifidogene Wirkung. Dabei fällt die Reaktion mit dem Stamm F 024 A1 geringfügig höher aus als mit dem Stamm F 011 A3. Die mit Aktivkohle aufgereinigten GOS-Proben (O11 - O16) zeigen eine stärkere potentiell bifidogene Reaktion als Lactulose, aber deutlich geringere Reaktionen als Glucose und Lactose. Im Vergleich zum Vivinal®GOS-Sirup scheinen die aufgereinigten, enzymatisch

hergestellten GOS-Lösungen eine stärkere bifidogene Wirkung zu besitzen (Vivinal®GOS: 62,4 % bis 71,5 % vs. enzymatisch hergestellte GOS-Lösungen: 67,3 % bis 98,6 %). Depeint et al. [2008] konnte ebenfalls durch eine enzymatisch hergestellte GOS-Lösung (mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. bifidum*) in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Crossover-Studie einen größeren Wachstumsanstieg der *Bifidobakterien* (v. a. *B. longum*) nachweisen als durch den Vivinal®GOS-Sirup. Ein direkter Vergleich der Messwerte der optischen Dichten mit anderen Literaturquellen gestaltet sich allerdings schwierig, da keine einheitlichen Messsysteme (unterschiedliche Mikroorganismen, Inkubationszeiten und Konzentrationen etc.) verwendet wurden. Ein Wachstumsanstieg der *Bifidobakterien* durch GOS-Lösungen kann durch andere Arbeitsgruppen im Zellkultursystem [[Rabiu et al., 2001], [Kondepudi et al., 2012], [Rehman et al., 2012] und [Maathuis et al., 2012]] und in *in-vivo*-Modellen [[Gopalakrishnan et al., 2012] und [Rehman et al., 2012]] bestätigt werden.

Nach Sanz et al. [2005] erfolgt ein größerer Wachstumsanstieg der *Bifidobakterien* durch β 1 \rightarrow 2- oder β 1 \rightarrow 6-verknüpfte Kohlenhydrate als durch β 1 \rightarrow 4-verknüpfte Zucker. Somit sollten die GOS-Proben, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* oder *A. oryzae* gebildet wurden (O13 bis O16 in Abb. 4-66; Hauptreaktionsprodukt: 6'-GL), eine größere potentiell bifidogene Wirkung zeigen als die GOS-Proben, die mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* synthetisierten wurden (O12 in Abb. 4-66; Hauptreaktionsprodukt: 4'-GL). Bei dem Stamm F 024 A1 konnte analog zu Sanz et al. [2005] der geringste Wachstumsanstieg der *Bifidobakterien* mit der GOS-Lösung gemessen werden, die zu 71,8 % aus β 1 \rightarrow 4-verknüpften GOS besteht (O12). Die GOS-Proben, die v. a. β 1 \rightarrow 6-verknüpfte Kohlenhydrate besitzen (O15 und O16), weisen jedoch nur geringfügig höhere optische Dichten auf. Der Stamm F 011 A3 zeigt dagegen das geringste Wachstum der *Bifidobakterien* bei einer Probe, die überwiegend aus β 1 \rightarrow 6-verknüpften Kohlenhydraten besteht (O16). Der zweitgeringste Wachstumsanstieg kann mit Hilfe der GOS-Lösung detektiert werden, die hauptsächlich β 1 \rightarrow 4-verknüpfte Kohlenhydrate beinhaltet (O12). Die These von Sanz et al. [2005] - ein größerer Wachstumsanstieg der *Bifidobakterien* durch β 1 \rightarrow 2- oder β 1 \rightarrow 6-verknüpfte Kohlenhydrate als durch β 1 \rightarrow 4-verknüpfte Zucker - kann dementsprechend nur bis zu einem gewissen Maß bestätigt werden.

Während der 24stündigen Inkubation kam es zur Entwicklung eines stark sauren Geruchs. Nach Garrido et al. [2013], Maathuis et al. [2012], Motherway et al. [2013] und Walton et al. [2012] kommt es während des Wachstumsanstiegs der *Bifidobakterien* auch zur Bildung von

kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acid, SCFA), wie Acetat und Lactat, die den sauren Geruch hervorrufen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle enzymatisch synthetisierten und mittels Aktivkohle aufgereinigten GOS-Proben eine potentiell bifidogene Wirkung im *in-vitro*-Testsystem zeigen. Diese Substanzen besitzen somit eine Funktionalität und können zur Herstellung von funktionellen Lebensmitteln genutzt werden. Den MOS-haltigen Proben konnte noch keine potentiell bifidogene Wirkung nachgewiesen werden, da diese noch nicht ausreichend - für das *in-vitro*-Testsystem - aufgereinigt werden konnte (siehe Kapitel 4.4.2.3).

4.6 Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Milchprodukts im Labormaßstab

Nachdem GOS-haltige Proben enzymatisch mittels β -Galactosidase synthetisiert werden konnten (siehe Kapitel 4.3) und deren potentiell bifidogene Wirkung nach Aktivkohle-Aufreinigung bestätigt wurde (Aktivkohle-Aufreinigung: siehe Kapitel 4.4.2, orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung: siehe Kapitel 4.5), findet nun eine Überprüfung der GOS-Stabilität in einem Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittel statt.

Zur Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels wurde eine Probe eines ausreichend verfügbaren Produktstroms der milch- und molkeverarbeitenden Industrie als Grundmatrix genutzt. Dabei handelte es sich um eine entfettete, durch Calciumfällung und Ultrafiltration weitgehend proteinfreie Sauermolke (0,17 % Protein; 3,45 % Lactose; 0,69 % Asche; 5,37 % Trockenmasse). Als Oligosaccharidzusatz wurde die GOS-haltige Lösung verwendet, die mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* (Hersteller: Chr. Hansen A/S) hergestellt wurde. Dieses Enzym ist in ausreichenden Mengen zum großtechnischen Einsatz verfügbar und bildet v. a. β 1 \rightarrow 6-verknüpfte Kohlenhydrate, die eine höhere potentiell bifidogene Wirkung als β 1 \rightarrow 4-GOS besitzen [[Sanz et al., 2005] sowie Kapitel 0]. Im Rahmen anderer Forschungsarbeiten (siehe Tab. 6-1 im Anhang) wurden 0,5 % bis 2 % Testsubstanz in den Testsystemen (*in-vitro*-Systeme, *in-vivo*-Systeme oder Humanstudien) eingesetzt, um eine potentiell gesundheitsfördernde Wirkung zu erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 2,5%ige GOS-Lösung als Oligosaccharidzusatz zur Grundmatrix gewählt. Diese GOS-haltige Lösung besteht - bezogen auf den Gesamtzuckergehalt - aus 22,3 % Galactose, 36,1 % Glucose, 8,9 % Lactose und 32,7 % GOS. Der GOS-Anteil - bezogen auf die 2,5%ige Lösungen - beträgt somit 0,8 %. Zusätzlich zu der Oligosaccharidmischung wurde eine 5%ige Fruchtzubereitung als Geschmackskomponente zur Grundmatrix zugegeben. Analog zu einer großtechnischen Lebensmittelherstellung wurde das Probeprodukt pasteurisiert (75 °C, 30 sec) oder hocherhitzt (90 °C, 2 min), um eventuell vorhandene, aktive Mikroorganismen abzutöten. Nach dem Mischen und Erhitzen wurde das Probeprodukt für sechs Wochen bei 4 °C gelagert. Die Analyse des Probeprodukts erfolgte nach Carrez-Fällung mittels HPAEC-PAD.

Durch HPAEC-Analyse des Probeprodukts konnte nach Pasteurisierung oder Hocherhitzung das gleiche OS-Muster und die gleiche Zuckerkonzentrationen detektiert werden. Die Art der Erhitzung hat somit keinen Einfluss auf die Zuckerzusammensetzung und die Zuckergehalte des Probeprodukts.

Die Kohlenhydratzusammensetzung der Grundmatrix des Probeprodukts bestand überwiegend aus Galactose und Lactose. Durch den Zusatz der Fruchtzubereitung wurden zusätzlich die Analyten Glucose und Fructose in das Probeprodukt eingebracht. Zwei Disaccharide und das Trisaccharid 6'-GL wurden durch den GOS-Zusatz in das Probeprodukt hinzugefügt. Die Kohlenhydratzusammensetzung des Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels bestand somit aus den Analyten Galactose (19,2-Flächenprozent der HPAEC), Glucose (24,3-Flächenprozent der HPAEC), Lactose (34,4-Flächenprozent der HPAEC), Fructose, zwei Disacchariden (Summe an Fructose ($R_t = 13,3\text{min}$) und Disaccharid bei 13,3 min: 10,5-Flächenprozent der HPAEC, Disaccharid bei 16,7 min: 3,9-Flächenprozent der HPAEC), 6'-GL (4,2-Flächenprozent der HPAEC) und kleineren, unbekanntem Analyten (3,5-Flächenprozent der HPAEC). Die Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels war somit erfolgreich und konnte problemlos durch HPAEC-PAD analysiert werden.

Während der Lagerung des Probeprodukts fand kein Abbau der verschiedenen Zuckeranalyten statt. Die Analysendaten variierten um maximal 5 %. Diese Schwankungen sind u. a. auf die Messungenauigkeit des Messsystems zurückzuführen. Alle Zuckeranalyten des Probeprodukts waren über sechs Wochen stabil.

Die Herstellung des Oligosaccharid-angereicherten Probeprodukts mit GOS ist erfolgreich verlaufen und weist über sechs Wochen stabile Analysendaten auf. Probeprodukte mit MOS konnten aus den in Kapitel 4.4.2 und 4.5 ausführlich beschriebenen Gründen noch nicht hergestellt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung neuer humanmilchähnlicher, funktioneller und bioaktiver Lebensmittel (z. B. Trinkmilch oder Joghurt), die Oligosaccharide mit einer möglichen Gesundheitswirkung enthalten („Health Claim“), sind für die menschliche Ernährung von besonderem Interesse. Ziel dieser Arbeit war es daher, geeignete Verfahren zu entwickeln, um - unter Ausnutzung der Transferaseaktivität von β -Galactosidase - komplexe Galacto-Oligosaccharide aus Lactose zu synthetisieren und nicht-proteingebundene, komplexe milcheigene Oligosaccharide aus Kuhmilch aufzureinigen und zu charakterisieren.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Oligosaccharide wurden zunächst hochempfindliche Analysemethoden etabliert (siehe Kapitel 4.1). Da Oligosaccharide Minorkomponenten in der Milch sind, mussten diese von Fetten, Proteinen und Lactose abgetrennt werden. Die Entfettung erfolgte durch Zentrifugation in der Kälte. Die Proteinabtrennung war unter Verwendung einer 10kDa-Ultrafiltrations-Membran optimal (siehe Kapitel 4.1.1.1). Die Abtrennung der Lactose von den Oligosacchariden stellte die größte Herausforderung dar, da beide Stoffklassen zu den Kohlenhydraten gehören und sich nur geringfügig in ihren Molmassen unterscheiden. Des Weiteren liegt Lactose in Kuhmilch im ca. 1000-fachen Überschuss im Vergleich zu den Oligosacchariden vor. Beim Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden zur Lactoseabtrennung stellte sich die Festphasenextraktion an Aktivkohle (GCC-SPE) als am besten geeignet heraus. Mit dieser Methode wurde - im Gegensatz zur ebenfalls untersuchten Größenausschlusschromatographie - eine hohe Reproduzierbarkeit der Analyten erreicht. Während bei der Größenausschlusschromatographie das Kuhmilch-Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc nahezu vollständig verloren ging, konnten nach GCC-SPE-Aufarbeitung fast 100 % des Analyten wiedergefunden werden (siehe Kapitel 4.1.1.2)

Zur Charakterisierung der Oligosaccharide wurde eine hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie mit pulsierender amperometrischen Detektion (HPAEC-PAD) etabliert. Parallel zur hochempfindlichen Detektion mittels PAD wurde zur direkten Strukturaufklärung von underivatisierten Zuckern eine Online-Kopplung an einen Massendetektor (IT-MS) aufgebaut. Einzelne Analyten konnten mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Oligosaccharidstandards identifiziert und quantifiziert werden (siehe Kapitel 4.1.1.3). Als weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Oligosaccharide wurden photometrische Schnelltests entwickelt (siehe Kapitel 4.1.2). Zur Absicherung der

HPAEC-PAD-Analysendaten sollten zukünftig weitere Analysemethoden etabliert werden (z. B. enzymatischer Verdau der Oligosaccharide, Analyse der Monosaccharide nach Hydrolyse der OS, HILIC-HPLC).

Die entwickelte HPAEC-PAD-Methode wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von Oligosacchariden in Milchproben verschiedener Nutztierarten (siehe Kapitel 4.2.1) und in Produktströmen der milch- und molkeverarbeitenden Industrie (siehe Kapitel 4.2.2) verwendet. Die Untersuchungen von Milchproben unterschiedlicher Nutztierarten zeigten, dass jede Milch hinsichtlich der MOS einzigartig ist. Dies konnte anhand der verschiedenen, identifizierten MOS mit unterschiedlichen Konzentrationen belegt werden. Der höchste MOS-Gehalt konnte in Humanmilch detektiert werden, gefolgt von Kamelmilch, Schafsmilch, Ziegenmilch, Kuhmilch und Stutenmilch (siehe Kapitel 4.2.1). Die Untersuchungen der Produktströme der milch- und molkeverarbeitenden Industrie zeigten, dass es während der Lactosekristallisation und der Aktivkohlebehandlung zu Verlusten an MOS kommt. Bei anderen Prozessschritten, wie Entfettung, Proteinabtrennung, Aufkonzentrierung oder Käseherstellung, war kein Einfluss auf die MOS-Konzentrationen ersichtlich (siehe Kapitel 4.2.2). Die entwickelte Methode zur OS-Bestimmung mittels HPAEC-PAD könnte zukünftig auf die Analysen proteingebundener Oligosaccharide ausgedehnt werden [[Grey, 2009] und [Weiß, 2001]].

Zur Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels wurden Galacto-Oligosaccharide enzymatisch - unter Ausnutzung der Transferaseaktivität von β -Galactosidase - aus Lactose synthetisiert (siehe Kapitel 4.3). Für die Entwicklung des Verfahrens wurden verschiedene β -Galactosidasen (Enzyme aus *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* und *Bacillus circulans*) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen getestet. Die höchste GOS-Ausbeute (19,8 Flächenprozent der HPAEC an Haupt-Trisaccharid, 40,5 % GOS) konnte mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei pH 4, 40 °C und 12 U/g erreicht werden. Dabei wurden v. a. Tri- bis Pentasaccharide gebildet. Das Hauptreaktionsprodukt war das Trisaccharid 4'-Galactosyllactose (4'-GL). Mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae* konnte bei pH 4,5, 40 °C und 12 U/g die zweitgrößte GOS-Ausbeute (14,2 % Haupt-Trisaccharid, 19,7 % GOS) synthetisiert werden. Dabei wurden v. a. Tri- und Tetrasaccharide mit dem Hauptreaktionsprodukt 6'-Galactosyllactose (6'-GL) gebildet. Die geringste GOS-Ausbeute (10,5 % Haupt-Trisaccharid, 3,0 % GOS) wurde mit der β -Galactosidase aus *K. lactis* bei pH 7, 40 °C und 12 U/g erreicht. Di- und Trisaccharide sowie ein geringer Anteil an Tetrasacchariden konnten dabei synthetisiert

werden. Das Hauptreaktionsprodukt war hierbei das Trisaccharid 6'-GL. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die milcheigenen Oligosaccharide während der Lactosehydrolyse mit den drei getesteten β -Galactosidasen weitgehend erhalten bleiben (siehe Kapitel 4.3.4).

Neben den Galacto-Oligosacchariden, die nach enzymatischer Synthese direkt im Lebensmittel eingesetzt werden können, wurden milcheigene Oligosaccharide aus Kuhmilch aufgereinigt (siehe Kapitel 4.4.1). Zur Aufreinigung der MOS wurden Nanofiltrationsversuche in verschiedenen Maßstäben, mit unterschiedlichen Prozessparametern und diversen Membranen durchgeführt. Die im hohen Überschuss vorhandene Lactose wurde vor der Nanofiltration durch enzymatische Hydrolyse in ihre Monosaccharide gespalten, wodurch die Trennung von Monosacchariden und MOS verbessert wurde. Die Membran SR50/SR2 stellte sich für die MOS-Aufreinigung als am besten geeignet heraus. Mono- und Disaccharide konnten mit dieser Membran nahezu vollständig abgetrennt und MOS zu 42,1 % bis 52,4 % wiedergefunden werden. Das Verhältnis der Mono- und Disaccharide zu MOS konnte von ca. 1000:1 auf 18,5:1 zu Gunsten der MOS verändert werden. Der Anteil der Oligosaccharide am Gesamtzuckeranteil wurde von 0,1 % auf 5,1 % erhöht. Aus 40 kg hydrolysiertem Ultrafiltrations-Magermilchpermeat konnten 332,5 mg GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc, 414,1 mg 3'-SL und 91,5 mg 6'-SL gewonnen werden (Kapitel 4.4.1.4). Die durch Nanofiltration aufgereinigten, MOS-haltigen Proben sind für den Einsatz in einem potentiell funktionellen Lebensmittel geeignet.

Da der Restlactosegehalt der synthetisierten, GOS-haltigen Proben und der aufgereinigten, MOS-haltigen Proben für weitere Analysen - wie orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung - zu hoch war, erfolgte eine zweite Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle (siehe Kapitel 4.4.2). Dadurch konnten bei den synthetisierten, GOS-haltigen Proben die Monosaccharide vollständig entfernt, der Restlactosegehalt auf unter 1 % am Gesamtzuckeranteil gesenkt und GOS aufgereinigt werden. Durch die Aktivkohle-Aufreinigung der durch Nanofiltration aufgereinigten, MOS-haltigen Proben konnten Mono- und Disaccharide von dem milcheigenen Oligosaccharid GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glc sowie von den GOS - entstanden durch die vorherige Behandlung mit β -Galactosidase - abgetrennt werden. Die Sialyllactosen gingen dabei nahezu vollständig verloren. Auf Grund der vermuteten gesundheitsfördernden Wirkung der Sialyllactosen bedarf es weiterer Forschungsaktivitäten. Insbesondere ist eine Optimierung des Aufgabevolumens, der Konditionierung und der Wahl der stationären Phase wünschenswert.

Mit den durch Aktivkohle aufgereinigten GOS-Lösungen, die weniger als 1 % Mono- und Disaccharide am Gesamtzuckergehalt enthielten, wurden orientierende Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung durchgeführt (siehe Kapitel 4.5). Die orientierenden Studien mit *Bifidobacterium longum* ließen eine potentiell bifidogene Wirkung der untersuchten GOS-Lösungen erkennen. Diese GOS-Proben zeigten dabei eine stärkere bifidogene Wirkung als die bifidogene Referenzsubstanz Lactulose und der Vivinal®GOS-Sirup. Zukünftig sollten die Proben, die nach Beendigung der bakteriellen Reaktion gewonnen wurden, mittels HPAEC-PAD analysiert werden. Dadurch könnte der Kohlenhydratabbau bzw. die Bildung organischer Säuren untersucht werden. Der zeitliche Verlauf sowie der Einsatz anderer Mikroorganismen - wie *Lactobazillen* und *Clostridien* - könnten ebenfalls untersucht werden. Andere orientierende Studien, wie antiinflammatorische Tests, wären bei der weiteren Charakterisierung der Oligosaccharide hilfreich.

Die Herstellung eines Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels erfolgte im Labormaßstab unter Zusatz der potentiell bifidogenen GOS-Lösung, die mit Hilfe von β -Galactosidase aus *K. lactis* synthetisiert wurde. Die Art der Erhitzung des Lebensmittels - Pasteurisierung vs. Hoherhitzung - hatte keinen Einfluss auf die Zuckerzusammensetzung und die Zuckergehalte. Während einer anschließenden sechswöchigen Lagerung in der Kälte konnte kein Abbau der Kohlenhydrate detektiert werden.

Als Ausblick für weitere Forschungen ist die Bestätigung der potentiell bifidogenen Wirkung der MOS-haltigen Proben von primärer Bedeutung. Anschließend könnten Studien mit funktionellen, MOS-haltigen Lebensmitteln durchgeführt werden. Dabei sollte versucht werden, ein humanmilchähnliches Lebensmittel mit ca. 20 % sauren und ca. 80 % neutralen Oligosacchariden herzustellen. Die mittels Nanofiltration aufgereinigten, MOS-haltigen Proben könnten als saurer Zusatz und die enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben als neutraler Zusatz verwendet werden. Des Weiteren sollte eine Überprüfung der potentiell bifidogenen Wirkung sowie eine sensorische Prüfung des hergestellten Lebensmittels durchgeführt werden.

Sobald MOS durch Nanofiltration bzw. GOS mittels enzymatischer Synthese im großtechnischen Maßstab aufgereinigt bzw. hergestellt werden können, sind Humanstudien zur Bestätigung der Wirksamkeit von milcheigenen Oligosaccharide bzw. der Galacto-Oligosaccharide möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten potentiell funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe (enzymatisch synthetisierte, GOS-haltige Lösungen) und Lebensmittelinhaltsstoffe, deren vermutete Funktionalität noch nicht bestätigt wurde (durch Nanofiltration aufgereinigte, MOS-haltige Lösungen), hergestellt werden. Unter Verwendung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und der Erfüllung der im Ausblick geschilderten Bedingungen, ist eine großtechnische Produktion eines funktionellen, Oligosaccharid-angereicherten Lebensmittels möglich.

6 Anhang

6.1 Anhang zum theoretischem Teil

6.1.1 Literaturübersicht über Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden

Tab. 6-1: Eigenschaften von Galacto-Oligosacchariden (Vivinal®GOS = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma FrieslandCampina Domo EMEA, Purime™GOS = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma GTC Nutrition, Oligomate 55P® = enzymatisch hergestellter, GOS-haltiger Sirup der Firma Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., DP = Grad der Polymerisation der GOS-Substanz, SCFA = short chain fatty acid = kurzkettige Fettsäuren)

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
Potentiell prebiotische Eigenschaften				
GOS	Humanstudie mit 30 Freiwilligen	Pro Tag: 8,1 g GOS und /oder 3×10^{10} <i>B. lactis</i> Bb-12	<ul style="list-style-type: none"> • im Stuhl: <ul style="list-style-type: none"> • ansteigendes Wachstum der Anzahl an Gesamt-Bifidobakterien • Geringer Abfall der Konzentration von <i>C. perfringens</i> bei alleiniger Gabe von GOS 	Alander et al. [2001]
Aufgereinigtes Vivinal®GOS	Zellkultursystem	0,5-2 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums der Bifidobakterien <i>B. breve</i> ATCC 15700, <i>B. longum subsp. infantis</i> ATCC 15697, <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 und <i>B. longum subsp. longum</i> DJO10A • höchstes Wachstum: <i>B. longum subsp. infantis</i> ATCC 15697 (bei 0,5-2 % GOS-Zusatz) • geringstes Wachstum: <i>B. longum subsp. longum</i> DJO10A (bei 0,5 % GOS-Zusatz) • unterschiedlicher Abbau der GOS durch die einzelnen Bakterien 	Barboza et al. [2009]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
GOS, hergestellt mit β -Galactosidase aus <i>Bifidobacterium bifidum</i> ; Vivinal®GOS	randomisierte, doppelblinde, crossover, Placebo-kontrollierte Interventionsstudie	3,6-7 g/d in FFMP (fat-filled milk powder = fettfreies Milchpulver)	<ul style="list-style-type: none"> • größerer Anstieg des Bifidobakterienwachstums, v.a. <i>B. bifidum</i>, <i>B. longum</i> mit GOS aus <i>B. bifidum</i> als mit Vivinal®GOS • <i>B. bifidum</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. longum</i>, <i>B. animalis</i>: besseres Wachstum mit GOS aus <i>B. bifidum</i> als mit Glucose • signifikanter Anstieg der <i>Clostridium perfringens-histolyticum</i>-Untergruppe • Dosisabhängige Effekte • bei 6%: abdominale Beschwerden 	Depeint et al. [2008]
Purime™GOS	Zellkultursystem	0,5 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums von 22 Stämmen von <i>B. longum subsp. infantis</i> • Wachstum der Bifidobakterien ist stammabhängig • GOS mit DP1-3: Wachstum aller Stämme • GOS mit DP>3: sehr unterschiedliches Wachstum • Bildung von SCFA (v.a. Acetat und Lactat, stammspezifisch) 	Garrido et al. [2013]
GOS	Tierversuch mit SMAD3-Knock-out-Mäusen (infiziert mit <i>H. hepaticus</i>)	5000mg/kg Körpergewicht	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstumsanstieg der <i>Bifidobacterium ssp.</i> im Stuhl 	Gopalakrishnan et al. [2012]
GOS	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Abbau der GOS durch <i>Bifidobacterium breve</i> 46, <i>Bifidobacterium lactis</i> 8:8, <i>Bifidobacterium longum</i> 6:18, <i>B. breve</i> CCUG 24611, <i>B. lactis</i> JCM 10602 und <i>B. pseudocatenulatum</i> JCM 1200 → Folge: Anstieg des Wachstums dieser Mikroorganismen • kein Abbau der GOS durch <i>C. difficile</i>, <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i> und <i>S. enterica</i> 	Kondepudi et al. [2012]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
GOS (0,2 % Gal, 0,3 % Glc, 1,0 % Lac, 98,5 % GOS)	<i>In-vitro</i> Colon-Model „TIM-2“ (gefüllt mit Stuhlproben von 8 Volontären)	1 g pro Experiment	<ul style="list-style-type: none"> • Steigerung des Wachstums diverser Bifidobakterien (v.a. <i>B. bifidum</i> und <i>B. catenulatum</i>) • Steigerung des Wachstums diverser Lactobazillen (v.a. <i>L. gasseri</i> und <i>L. salivarius</i>) • Abfall des Wachstums an <i>Bacteroides</i>-Spezies, <i>Eubacterium halii</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Lactococcus</i> • Anstieg der Bildung SCFA, v. a. von Acetaten (+49%) und Lactaten (+23%) • Reduktion der Metaboliten zur Fäulnisregung (u.a. Schwefelwasserstoff, Ammoniak) ist reduziert (-55%) 	Maathuis et al. [2012]
Aufgereinigtes Vivinal®GOS	Zellkultursystem		<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums von 13 verschiedenen Stämmen an <i>Bifidobakterium breve</i> UCC2003 • stammspezifischer, schwankender Abbau der höher molekularen GOS stammabhängig → abhängig von der Anwesenheit von extrazelluläre Endogalactanase "GalA • Bildung von SCFA 	Motherway et al. [2013]
Oligomate 55P®	Zellkultursystem	1 g/100ml	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des bakteriellen Wachstums • gesteigertes Wachstum von <i>B. adolescentis</i>, <i>B. catenulatum</i>, <i>S. thermophilus</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> 	Padalino et al. [2012]
Vivinal®GOS	Zellkultursystem	2,0 %	<ul style="list-style-type: none"> • verbessertes Wachstum von <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> ATCC 11842 und <i>Bifidobakterium</i> • erhöhte Konzentration an Milchsäure und Essigsäure 	Prasad et al. [2013]
GOS, hergestellt mit β -Galactosidase aus <i>B. angulatum</i> ; Oligomate 55P®	Zellkultursystem	1 % (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> • GOS aus <i>B. angulatum</i>: Anstieg des Wachstums an <i>Lactobacillen</i> und <i>Bifidobakterien</i>, Abfall des Wachstums an <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>Clostridien</i> • Oligomate 55P®: Anstieg des Wachstums an <i>Lactobacillen</i> und <i>Bifidobakterien</i>, Abfall des Wachstums an <i>Bacteroiden</i> 	Rabiu et al. [2001]
GOS	<i>In-vitro</i> / <i>in-vivo</i> (Masthähnchen)	0,1 / 0,2 oder 0,5%	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der <i>Bifidobakterium</i> • kein Einfluss auf die Population von <i>E.coli</i>, <i>Clostridien</i> und <i>Lactobacillen</i> im Blinddarm 	Rehman et al. [2012]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
Disaccharide (verschiedenen glycosidische Verknüpfungen und unterschiedliche Monomere)	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums an <i>Bifidobakterien</i> (v.a. durch 1→2- und 1→6-Verknüpfungen) • leichter Anstieg des <i>Clostridien</i>wachstums (v.a. 1→4-Verknüpfungen) • leichter Abfall des <i>Clostridien</i>wachstums bei 1→6- und 1→3-Verknüpfungen • leichter Anstieg von <i>Bacteroiden</i>, <i>Eubakterien</i> und <i>Lactobazillen</i> • Disacch. mit Glc und Gal: Anstieg der <i>Bifidobakterien</i> (bei Glc-Glc höher als bei Gal-Gal) • Disacch. mit Fru: Anstieg der <i>Lactobazillen</i> • typische Fermentationsendprodukte: Acetat und Lactat (Butyrat bei <i>Clostridien</i> und <i>Eubakterien</i>) 	Sanz et al. [2005]
Vivinal®GOS	Randomisierte, doppelblinde, Placebo- kontrollierte, crossover Studie	4g zweimal täglich (2 x 250ml/d)	<ul style="list-style-type: none"> • im Stuhl: <ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums an <i>Bifidobakterien</i> und <i>Lactobacillen</i> • Abfall des Wachstums an <i>E. coli</i> • Anstieg der SCFA (v.a. Butyrate) • Reduktion der Propionate 	Walton et al. [2012]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
Potentiell antiinflammatorische Eigenschaften				
GOS	Tierversuch mit <i>SMAD3</i> -Knock-out-Mäusen (infiziert mit <i>H. hepaticus</i>)	5000mg/kg Körpergewicht	<ul style="list-style-type: none"> erhöhter Anteil der NK-Zellen (natürliche Killerzellen) in der Milz Reduktion der Schwere von Dickdarmentzündung Stimulation der IL-15-Produktion im Kolon 	Gopalakrishnan et al. [2012]
GOS + Probiotik	Randomisierte, kontrollierte Studie (Patienten mit Ulcerative Colitis)	Probiotik: 1 g/0,33d (10 ⁹ CFu/g) GOS: 5,5 g/d	<ul style="list-style-type: none"> verbesserter klinischer Status der Patienten Abfall des Gehaltes an Myeloperoxidase (MPO, korreliert positiv mit der Schwere von UC) 	Ishikawa et al. [2011]
GOS, hergestellt mit der β -Galactosidase aus <i>B. bifidum</i>	Zellkultursystem mit induzierter Inflammation durch TNF- α	1-10 g	<ul style="list-style-type: none"> Anstieg der IL-8-Produktion Anstieg der Produktion von MIP-3α 	Tzortzis et al. [2010]
GOS, hergestellt mit der β -Galactosidase aus <i>B. bifidum</i>	<i>In-vivo</i> Studie, induzierte Colitis, Mausmodell	1-10 g	<ul style="list-style-type: none"> Auslösung der IL-6-Sekretion Auslösung der MIP-2-Sekretion 	Tzortzis et al. [2010]
Allgemeine Eigenschaften				
GOS (DP \geq 3)	Tierversuch mit Ratten	1 % (w/w)	<ul style="list-style-type: none"> Verdauungsrate im Ileum: 52,9 %\pm2,7% \rightarrow partielle Verdauung 1\rightarrow 6- und 1\rightarrow 2-Verknüpfungen zwischen Glc und Gal: viel resistenter vor der gastrointestinalen Verdauung als 1\rightarrow4-Verknüpfung 	Hernández-Hernández et al. [2012]

6.1.2 Literaturübersicht über Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden

Tab. 6-2: Vorkommen und Gehalte von milcheigenen Oligosacchariden (m/z = Molmasse; I = Anzahl der bisher detektierten, möglichen Isomere, pp = postpartum, Q = Quadrupol)

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₁ -		N-Acetyl-	383,36	Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(HexNAc) ₁		lactosamin		Kuhkolostrum		2	GLC/MS und ¹³ C-NMR	Saito et al. [1984]
				Kuhkolostrum		2	GLC/MS und ¹³ C-NMR	Saito et al. [1987]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(HexNAc) ₂		Di-Acetyl- chitobiose	424,41	Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(Hex) ₁ -		Sialyl-hexose	471,42	Kuhkolostrum		2	HPLC-ESI-MS	Pan and Melton [2005]
(Neu5Ac) ₁								
(Hex) ₁ -		Glycolyl-	487,42	Schafkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Neu5Gc) ₁		neuraminyl- hexose						

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₂ - (Fuc) ₁	FL	Fucosyl- lactose	488,45	Fäzes von gestillten Säuglingen			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch		2	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch	2'-FL: 0,70-1,36 g/l 3-FL: 0,03-0,32 g/l	2	HPLC-MS	Bao et al. [2013]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	2'-FL: 0,37-0,48 g/l 3-FL: 0,03-0,04 g/l	2	HPLC	Bode et al. [2012]
				Humanmilch	2'-FL: 2,56-2,66 g/l 3-FL: 0,36-0,44 g/l	2	HPAEC-PAD	Coppa et al. [2011]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch (5-10d pp)	2'-FL: (0,22±0,37) g/l 3-FL: (1,67±0,82) g/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch (> 10d pp)	2'-FL: (0,69±0,81) g/l 3-FL: (2,35±1,39) g/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch	2'-FL: (3,85±0,51) g/l		HPLC	Morrow et al. [2004]
				Humanmilch	2'-FL: (3,85±0,51) g/l 3-FL: (0,28±0,47) g/l	2	RP-HPLC	Newburg et al. [2004]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	2'-FL: 1,84 g/l 3-FL: 0,46 g/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch	2'-FL: (0-4,57) g/l 3-FL: (0,15-1,79) g/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Lane et al. [2012]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃	GL	Galactosyl-lactose	504,45	Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		2	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		1	HPLC und ¹³ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kamelmilch (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		4	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum		2	GLC/MS und ¹³ C-NMR	Saito et al. [1987]
				Kuhkolostrum			GC-MS, ¹³ C-NMR	Urashima et al. [1991]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		4	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Stutenmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	0,03-0,05 g/l	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₁ -		Fucosyl-N-	529,50	Kuhkolostrum		1	GLC/MS und ¹³ C-NMR	Saito et al. [1987]
(HexNAc) ₁ -		Acetyl-		Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
(Fuc) ₁		lactosamin						
(Hex) ₂ -	LN-Triose	N-Acetyl-	545,50	Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
(HexNAc) ₁		Hexos-		Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
		aminyl-		Kuhkolostrum	(1±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
		lactose		(zweites Melken)				
				Kuhkolostrum	(1±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				(viertes Melken)				
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum			GC-MS, ¹³ C-NMR	Urashima et al. [1991]
				Kuhmilch		5	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch 1	(2,6±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch 2	(3,4±0,4) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmilch, homogenisiert	(2,4±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch, unpasteurisiert	LOD		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch	(4±0,5) mg/l	1	HPAEC-PAD	McJarrow and Amelsfort- Schoonbeek [2004]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Säulingsnahrung 1	LOD		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säulingsnahrung 2	LOD		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Stutenmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	(20-40) mg/l	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₂ - (Neu5Ac) ₁	SL	Sialyl-lactose	633,56	Humankolostrum	3'-SL: (296,67±96,29) mg/l	2	RP-HPLC	Asakuma et al.
				(Tag 1-3)	6'-SL: (369,86±108,19) mg/l			[2007]
				Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	3'-SL: (114,1-143,3) mg/l	1	HPLC	Bode et al. [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch		2	HPLC	Martín-Sosa et al.
								[2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	3'-SL: (240-310) mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
					6'-SL: (1140-1310) mg/l			
				Humanmilch	3'-SL: 150 mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
	6'-SL: 420 mg/l							
Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]				
Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]				

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		2	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		2	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kamelmilch (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum (zweites Melken)	3'-SL: (1245±82) mg/l 6'-SL: (85±6) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhkolostrum (viertes Melken)	3'-SL: (739±53) mg/l 6'-SL: (73±2) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Lane et al. [2012]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-ESI-MS	Pan and Melton [2005]
				Kuhkolostrum	3'-SL: 95,03 mg/l 6'-SL: 19,01 mg/l	2	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhkolostrum		2	Papier-chromatographie und Neuraminidase-behandlung	Schneir and Rafelson [1966]
				Kuhkolostrum		2	GLC	Veh et al. [1981]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch 1	3'-SL: (51±4) mg/l 6'-SL: (6,3±0,4) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch 2	3'-SL: (55±4) mg/l 6'-SL: (9±0,2) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch, homogenisiert	3'-SL: (48±4) mg/l 6'-SL: (9,6±0,8) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch, unpasteurisiert	3'-SL: (47±4) mg/l 6'-SL: (3,6±0,3) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein Friesian)	3'-SL: (83,10±22,37) mg/l 6'-SL: (22,22±2,90) mg/l	2	RP-HPLC	Goto et al. [2010]
				Kuhmilch (Angus)	3'-SL: (127,06±13,98) mg/l 6'-SL: (18,91±2,78) mg/l	2	RP-HPLC	Goto et al. [2010]
				Kuhmilch (Eringer)	3'-SL: (139,23±11,19) mg/l 6'-SL: (23,69±4,68) mg/l	2	RP-HPLC	Goto et al. [2010]
				Kuhmilch (Limousin)	3'-SL: (64,29±13,70) mg/l 6'-SL: (23,97±7,15) mg/l	2	RP-HPLC	Goto et al. [2010]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmilch (Limousin X Red Holstein)	3'-SL: (115,13±8,81) mg/l 6'-SL: (19,29±3,07) mg/l	2	RP-HPLC	Goto et al. [2010]
				Kuhmilch		2	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
				Kuhmilch	3'-SL: (42±3) mg/l 6'-SL: (17±3) mg/l	2	HPAEC-PAD	McJarrow and Amelsfort- Schoonbeek [2004]
				Kuhmilch (0-2d pp)	3'-SL: (717±27) mg/l 6'-SL: (64±6) mg/l	2	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (3-6d pp)	3'-SL: (557±175) mg/l 6'-SL: (52±10) mg/l	2	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (7-10d pp)	3'-SL: (262±76) mg/l 6'-SL: (40±5) mg/l	2	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (11-14d pp)	3'-SL: (135±73) mg/l 6'-SL: (18±10) mg/l	2	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch			HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Säuglingsnahrung 1	3'-SL: (17±4) mg/l 6'-SL: (3,8±0,2) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säuglingsnahrung 2	3'-SL: (19±1) mg/l 6'-SL: (4,6±0,5) mg/l	2	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säuglingsurin	3'-SL: 12,67 mg/48hr 6'-SL: 1,90 mg/48hr	2	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	3'-SL: (30-60) mg/l 6'-SL: (50-70) mg/l	2	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₂ -	DF-L /LDFT	Difucosyl-	634,60	Humanmilch		3	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(Fuc) ₂		lactose		Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch		1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	(140±190) mg/l	1	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch	(0,0004±0,005) mg/l		HPLC	Morrow et al. [2004]
				Humanmilch	(0,0004±0,005) mg/l	1	RP-HPLC	Newburg et al. [2004]
				Humanmilch	(0-410) mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
				Humanmilch	170 mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Säuglingsurin	(50±60) mg/l	1	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle	
(Hex) ₂ - (Neu5Gc) ₁		N-Glycolyl- neuraminyl- lactose	649,56	Kuhkolostrum	1,30 mg/l	1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]	
				Kuhkolostrum				HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]	
				Kuhkolostrum		1	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]	
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]	
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]	
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]	
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Schafsmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Ziegenmilch		(40-60) mg/l	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke				HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ - (Fuc) ₁		Fucosyl- galactosyl- lactose	650,60	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(Hex) ₄		Di- galactosyl- lactose	666,60	Kuhkolostrum Kuhmilch Kuhmilch (Holstein-Friesian) Kuhmolke Schafskolostrum Ziegenkolostrum		1 5 1	GLC/MS und ¹³ C-NMR HPLC-Chip/ TOF MS HPLC-Chip/TOF-MS	Saito et al. [1987] Barile et al. [2011] Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₁ - (HexNAc) ₁ - (Neu5Ac) ₁	SLN	Sialyl- lactosamin	674,61	Humanmilch Kuhkolostrum Kuhkolostrum (zweites Melken) Kuhkolostrum (viertes Melken) Kuhkolostrum Kuhkolostrum Kuhkolostrum	6'-SLN: 119±7 mg/l 6'-SLN: 117±10 mg/l	2 3 1 1 1 1 1	HPLC-Chip/TOF-MS HPLC-Chip/ TOF MS HILIC HPLC-HRSRM-MS HILIC HPLC-HRSRM-MS HILIC-HPLC/MS HILIC-HPLC/MS HPLC-ESI-MS	Wu et al. [2011] Barile et al. [2010] Fong et al. [2011] Fong et al. [2011] Lane et al. [2012] Marino et al. [2011] Pan and Melton [2005]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhkolostrum	6'-SLN: 47,22 mg/l	1	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]
				Kuhkolostrum		1	GLC	Veh et al. [1981]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch 1	6'-SLN: (0,13±0,02) mg/l	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch 2	6'-SLN: (0,10±0,02) mg/l	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch, homogenisiert	6'-SLN: (0,10±0,03) mg/l	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch, unpasteurisiert	LOD	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Kuhmilch		2	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
				Kuhmilch	6'-SLN: (11±0,6) mg/l	1	HPAEC-PAD	McJarrow and Amelsfort- Schoonbeek [2004]
				Kuhmilch (0-2d pp)	6'-SLN: (100±7) mg/l	1	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (3-6d pp)	6'-SLN: (75±17) mg/l	1	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (7-10d pp)	6'-SLN: (74±4) mg/l	1	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmilch (11-14d pp)	6'-SLN: (64±22) mg/l	1	NP-HPLC	Nakamura et al. [2003]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Säuglingsurin 1	LOD	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säuglingsurin 2	LOD	1	HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säuglingsurin	3'-SLN: 5,40 mg/48hr	2	HPLC, Papier-	Parkkinen and Finne
					6'-SLN: 2,70 mg/48hr		chromatographie	[1987]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₁ -		N-Glycolyl-	690,61	Kuhkolostrum		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
(HexNAc) ₁ -		neuraminyl-		Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(Neu5Gc) ₁		lactosamin		Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₂ -			691,65	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(HexNAc) ₁ -				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(Fuc) ₁				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₁	LnNT/LNT	Lacto-N- (neo)- tetraose	707,65	Fäzes von gestillten Säuglingen			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch		3	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch	LNT: (87-498) mg/l LNnT: (162-687) mg/l	2	HPLC-MS	Bao et al. [2013]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	LNT: (531,9-620,7) mg/l LNnT: (98,9-158,3) mg/l	2	HPLC	Bode et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch	LNT: (1310±590) mg/l LNnT: (200±290) mg/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch	LNT: (898,72±559,04) mg/l LNnT: (297,21±183,99) mg/l	2	RP-HPLC	Newburg et al. [2004]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Ninonuevo et al. [2008]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch			HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	LNT: (849,18-1188,85) mg/l LNnT: (77,84-226,45) mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
				Humanmilch	LNT: 860 mg/l LNnT: 110 mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Kuhkolostrum		4	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhmilch		4	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		4	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Säuglingsurin	LNT: (3900±1860) mg/l LNnT: (460±360) mg/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Schafsmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Stutenmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(HexNAc) ₂ - (Neu5Ac) ₁		Sialyl-di- Acetyl- chitobiose	715,66	Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₂ - (HexNAc) ₂			748,70	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al. [2006]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₁ - (Neu5Ac) ₁ - (Neu5Gc) ₁			778,67	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₂ -			779,71	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Fuc) ₁ -				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Neu5Ac) ₁				Humanmilch		1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch		1	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
				Kuhmilch		1	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
(Hex) ₃ -	SGL	Sialyl-	795,71	Kamelkolostrum		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
(Neu5Ac) ₁		hexosyl- lactose		(Camelus bactrianus)		1	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		1	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-ESI-MS	Pan and Melton [2005]
				Kuhkolostrum	2,39 mg/l	1	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]
				Kuhkolostrum		1	GLC	Veh et al. [1981]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₃ - (Fuc) ₂		Difucosyl- hexosyl- lactose	796,74	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(Hex) ₃ - (Neu5Gc) ₁		N-Glycolyl- neuraminyl- hexosyl- lactose	811,71	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₄ - (Fuc) ₁			812,74	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₁ - (HexNAc) ₁ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			820,76	Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]
(Hex) ₅			828,74	Kuhkolostrum		1	GLC/MS und ¹³ C-NMR	Saito et al. [1987]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ -	LNFP-I/-II/-	Lacto-N-	853,79	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₁ -	III, F-LNT	fucopentaose		Säuglingen				
(Fuc) ₁		I-V		Fäzes von gestillten	LNFP-II: (0,35-0,84) mg/g		HPTLC	Stepans et al. [2006]
				Säuglingen				
				Humanmilch		3	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch	LNFP-I: (840-1797) mg/l LNFP-II: (18-207) mg/l LNFP-III: (63-255) mg/l LNFP-V: (1-15) mg/l LNFP-VI: (1-27) mg/l	5	HPLC-MS	Bao et al. [2013]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	LNFP II + III: (121,2-178,1) mg/l LNFP I: (106,0-138,6) mg/l	3	HPLC	Bode et al. [2012]
				Humanmilch	LNFP-II: (450-480) mg/l LNFP-I: (1180-1250) mg/l	2	HPAEC-PAD	Coppa et al. [2011]
				Humanmilch		4	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	LNFP I: (350 ±450) mg/l	3	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
					LNFP II/III: (2770± 2410) mg/l			
				Humanmilch	LNFP-I: (0,003±0,002) mg/l		HPLC	Morrow et al. [2004]
				Humanmilch	LNFP-I: (2740,67±1494,13) mmol/l	2	RP-HPLC	Newburg et al. [2004]
					LNFP-II/III: (981,86±683,03) mmol/l			
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Ninonuevo et al. [2008]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch	LNFP-II: (2,7-9,0) mg/l		HPTLC	Stepans et al. [2006]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	LNFP I: (0-3180) mg/l	3	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
					LNFP II: (0-1250) mg/l			
					LNFP III: (310-380) mg/l			
				Humanmilch	LNFP I: 670 mg/l	3	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
					LNFP II: 200 mg/l			
					LNFP III: 280 mg/l			

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch		3	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		4	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Säuglingsurin	LNFP I: (260 ±580) mg/l LNFP II/III: (5300±1410) mg/l	3	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ -			869,79	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₁				Kuhkolostrum			ICR MS	[2006]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhkolostrum			GC-MS, ¹³ C-NMR	Urashima et al. [1991]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Stutenmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ -			910,84	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₂							ICR MS	[2006]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch		5	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al.
				(Holstein-Friesian)				[2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle	
(Hex) ₂ - (Neu5Ac) ₂	DSL	Disialyl- lactose	924,82	Kuhkolostrum	(126±8) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				(zweites Melken)					
				Kuhkolostrum	(80±7) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				(viertes Melken)					
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Lane et al. [2012]	
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]	
				Kuhkolostrum		2	HPLC-ESI-MS	Pan and Melton [2005]	
				Kuhkolostrum	27,74 µmol/l	1	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]	
				Kuhkolostrum		2	GLC	Veh et al. [1981]	
				Kuhmilch 1	(1,5±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				Kuhmilch 2	(2,1±0,3) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				Kuhmilch, Homogenisiert	(3,1±0,2) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				Kuhmilch, unpasteurisiert	(0,54±0,01) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]	
				Kuhmilch	(4 ±1) mg/l	1	HPAEC-PAD	McJarrow and Amelsfort- Schoonbeek [2004]	
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]	

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Säuglingsnahrung 1	(0,8±0,1) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Säuglingsnahrung 2	(0,5±0,02) mg/l		HILIC HPLC-HRSRM-MS	Fong et al. [2011]
				Ziegenmilch	(1-5) mg/l	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₂ -		Sialyl-N-	940,82	Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(Neu5Ac) ₁ -		glycolyl-		Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
(Neu5Gc) ₁		neuraminyl-lactose		Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₂ -		Di-N-	956,82	Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Neu5Gc) ₂		glycolyl-neuraminyl-lactose						
(Hex) ₄ -		Sialyl-	957,85	Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Neu5Ac) ₁		dihexosyl-lactose						
(Hex) ₁ -		Di-Sialyl- N-	965,87	Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
(HexNAc) ₁ -		Acetyl-		Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
(Neu5Ac) ₂		lactosamin		Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
(Hex) ₆			990,89	Kuhmilch		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				(Holstein-Friesian)				

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₃ -	S-LNT bzw.	Sialyllacto-	998,90	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₁ -	LST a/b/c	N-tetraose		Säuglingen				
(Neu5Ac) ₁		a/b/c		Humanmilch		3	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch	LST a: (141,13±106,76) mg/l	3	RP-HPLC	Asakuma et al. [2007]
				(Tag 1-3)	LST b: (64,64±24,57) mg/l			
					LST c: (686,32±264,1) mg/l			
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Humanmilch		3	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch		3	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	LST a: (40-60) mg/l	3	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
					LST b: (80-110) mg/l			
					LST c: (210-310) mg/l			

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	LST a: 13 mg/l LST b: 40 mg/l LST c: 68 mg/l	3	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]
				Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kuhkolostrum		4	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
(Hex) ₃ -	LNDFH-I/II,	Lacto-N-	999,94	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₁ -	DF-LNT	difuco-		Säuglingen				
(Fuc) ₂		hexaose I/II		Humanmilch		2	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	LNDFH-I: (147-1215) mg/l LNDFH-II: (0-24) mg/l	2	HPLC-MS	Bao et al. [2013]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	LNDFH-II: (200-230) mg/l	1	HPAEC-PAD	Coppa et al. [2011]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]
				Humanmilch (5-10d pp)	LNDFH I: (740 ±680) mg/l LNDFH II: (960±440) mg/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch (> 10d pp)	LNDFH I: (1310±1710) mg/l LNDFH II: (690±780) mg/l	2	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				Humanmilch	LNDFH-I: (0,001±0,001) mg/l		HPLC	Morrow et al. [2004]
				Humanmilch	(1259,92±999,94) mg/l	1	RP-HPLC	Newburg et al. [2004]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch	LNDFH I: (0-1280) mg/l LNDFH II: (0-450) mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch	LNDFH I: 580 mg/l LNDFH II: 250 mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
(Hex) ₃ -			1014,90	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(HexNAc) ₁ -				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
(Neu5Gc) ₁				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₄ -			1015,94	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₁ -							ICR MS	[2006]
(Fuc) ₁								
(Hex) ₅ -			1031,94	Schafkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(HexNAc) ₁								
(Hex) ₂ -			1039,95	Kuhkolostrum		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
(HexNAc) ₂ -				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
(Neu5Ac) ₁				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ -			1056,99	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(HexNAc) ₂ -				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(Fuc) ₁				Humanmilch			ICR MS	[2006]
				Humanmilch			HPLC-Chip/TOF-MS	Ninonuevo et al. [2008]
(Hex) ₄ -	LNH/LNnH/	(para)-Lacto-	1072,99	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₂	pLNH/	N-(neo)-		Säuglingen				
	pLNnH	hexaose		Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch	LHnH: (140±110) mg/l	1	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				(5-10d pp)				
				Humanmilch	LHnH: (20±20) mg/l	1	RP-HPLC	Leo et al. [2009]
				(> 10d pp)				
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
				Humanmilch			ICR MS	[2006]
				Humanmilch			HPLC-Chip/TOF-MS	Ninonuevo et al. [2008]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch			HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	LNH: (85,84-118,03) mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
				Humanmilch	LNH: 130 mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		1	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		1	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			MALDI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Kuhmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Stutenmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmilch	LNH: (1-5) mg/l	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₃ - (Neu5Ac) ₂		Disialyl- hexosyl- lactose	1086,96	Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₃ - (Neu5Ac) ₁ - (Neu5Gc) ₁		Sialyl-N- Glycolyl- neuraminyl- hexosyl- lactose	1102,96	Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₃			1114,04	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Strum et al. [2012]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Schafskolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Ziegenmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ - (Neu5Gc) ₂		Di-N- Glycolyl- neuraminyl- hexosyl- lactose	1118,96	Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₁ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁	FS-LNT bzw. SLNFP-I bzw. F-LST	Sialyl- fucosyl- lacto-N- tetraose I/II	1145,05	Fäzes von gestillten Säuglingen Humanmilch Humanmilch Humankolostrum (Tag 1-3) Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch	SLNFP-I: (78,00±52,72) mg/l	1 1 1 1 1 2 1 1 1 1	CE-LIF CE-LIF CE-LIF RP-HPLC HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPAEC-PAD/FAB-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPLC-Chip/TOF-MS HPLC-Chip/TOF-MS HPLC-Chip/TOF-MS	Albrecht [2011] Albrecht et al. [2011] Albrecht [2011] Asakuma et al. [2007] Bode [2003] Finke [2000] Kunz et al. [1996] Ninonuevo et al. [2006] Tao et al. [2011] Totten et al. [2012] Wu et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₇			1153,03	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₁ - (Neu5Ac) ₁		Sialyl-lacto- N-novo- pentaose	1161,05	Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		2	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		1	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kuhkolostrum		3	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				Kuhmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Kuhmolke			nESI-FTICR	Barile et al. [2009]
				Ziegenkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₁ - (Fuc) ₂			1162,08	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₁ - (HexNAc) ₁ - (Neu5Ac) ₂	DSGGN		1169,06	Säuglingsurin	3μmol/48hr	2	HPLC, Papier- chromatographie	Parkkinen and Finne [1987]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₁ - (Neu5Gc) ₁			1177,05	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₂ - (Neu5Ac) ₁			1202,10	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Kuhkolostrum		3	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
				(Holstein-Friesian)				
				Kuhmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₃ -			1203,13	Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(HexNAc) ₂ -				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(Fuc) ₂							ICR MS	[2006]
(Hex) ₄ -	F-LNH		1219,13	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₂ -				Säuglingen				
(Fuc) ₁				Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch			HPLC-Chip/MALDI-TOF-MS	Blank [2012]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch	FLNH-II: (380-450) g/l	1	HPAEC-PAD	Coppa et al. [2011]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
							ICR MS	[2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch	2'-F-LNH: (0-260) mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
					3'-F-LNH: (130-350) mg/l			
				Humanmilch	2'-F-LNH: 140 mg/l	2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
					3'-F-LNH: 320 mg/l			
				Humanmilch		2	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1997]
				Humanmilch		4	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		6	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ -			1235,13	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
(HexNAc) ₂				Kuhmilch (Holstein-Friesian) Ziegenkolostrum		1	HPLC-Chip/TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS	Sundekilde et al. [2012] Finke [2000]
(Hex) ₃ -			1260,18	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
(HexNAc) ₃ -				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(Fuc) ₁							ICR MS	[2006]
(Hex) ₄ -			1276,18	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al.
(HexNAc) ₃				(Holstein-Friesian) Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	[2012] Martinez-Ferez et al. [2006]
(Hex) ₃ -	DS-LNT	Disialyl-	1290,16	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₁ -		lacto-N-		Säuglingen				
(Neu5Ac) ₂		tetraose		Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humankolostrum (Tag 1-3)	(462,12±128,45) mg/l	1	RP-HPLC	Asakuma et al. [2007]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Humanmilch		1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Kunz et al. [1996]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Humanmilch		1	HPLC	Martín-Sosa et al. [2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch	(340-420) mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [2010]
				Humanmilch	100 mg/l	1	HPAEC-PAD	Thurl et al. [1996]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]
(Hex) ₈			1315,18	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			1323,19	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₂ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			1348,24	Säuglingsurin			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ -	S-LNH	(Mono)sialyl	1364,24	Fäzes von gestillten Säuglingen			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₂ -		-lacto-N-		Humanmilch		2	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(Neu5Ac) ₁		(neo)hexaose		Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch		3	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch		2	HPLC-Chip/TOF-MS	Totten et al. [2012]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]
				Humanmilch		4	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]
				Kamelkolostrum (Camelus bactrianus)		1	HPLC-MALDI-TOF-MS und ¹ H-NMR	Fukuda et al. [2010]
				Kamelmilch (Camelus dromedarius)		1	HPLC und ¹ C-NMR	Alhaj et al. [2013]
				Kuhkolostrum		2	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2010]
				Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
				Kuhkolostrum		2	HILIC-HPLC/MS	Marino et al. [2011]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
				Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2008]
				Ziegenmilch	Spuren	1	HPAEC-PAD/FAB-MS	Martinez-Ferez et al. [2006]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₂ - (Fuc) ₁			1381,28	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₂			1397,28	Kuhmilch (Holstein-Friesian) Schafskolostrum Stutenmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS	Sundekilde et al. [2012] Finke [2000] Finke [2000]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₃ - (Neu5Ac) ₁			1405,29	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₁			1422,33	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₁ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₂	FDS-LNT		1436,30	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃			1438,33	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₂ - (HexNAc) ₄ - (Neu5Gc) ₁			1462,34	Schafsmolke			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₁			1463,38	Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₄			1479,38	Kuhmilch Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1 1	HPLC-Chip/ TOF MS HPLC-Chip/TOF-MS	Barile et al. [2011] Sundekilde et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ -	FS-LNH		1510,39	Fäzes von gestillten Säuglingen			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₂ -				Humanmilch		1	CE-LIF	Albrecht et al. [2011]
(Fuc) ₁ -				Humanmilch			CE-LIF	Albrecht [2011]
(Neu5Ac) ₁				Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch			ICR MS	[2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]
				Humanmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Tao et al. [2011]
				Humanmilch		7	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₃ - (Neu5Ac) ₁			1567,44	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₁	F-LNO		1584,47	Fäzes von gestillten Säuglingen Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch			CE-LIF CE-LIF 1 CE-LIF 1 HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPAEC-PAD/FAB-MS 7 HPLC-Chip/TOF-MS	Albrecht [2011] Albrecht [2011] Albrecht et al. [2011] Ninonuevo et al. [2006] Rudloff et al. [2012] Wu et al. [2010]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₄ - (Neu5Ac) ₁			1608,49	Kuhkolostrum			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₁			1625,52	Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₄			1641,52	Kuhmilch Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1 1	HPLC-Chip/ TOF MS HPLC-Chip/TOF-MS	Barile et al. [2011] Sundekilde et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₄ -	DS-LNH		1655,50	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(HexNAc) ₂ -				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Neu5Ac) ₂								
(Hex) ₄ -	DFS-LNH		1656,53	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(HexNAc) ₂ -				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Fuc) ₂ -				Humanmilch	1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.	
(Neu5Ac) ₁				Humanmilch	2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2011]	
(Hex) ₄ -			1657,57	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₂ -						ICR MS	[2006]	
(Fuc) ₄								
(Hex) ₅ -			1673,57	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₂ -						ICR MS	[2006]	
(Fuc) ₃								
(Hex) ₄ -			1682,57	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al.
(HexNAc) ₅				(Holstein-Friesian)			[2012]	
(Hex) ₃ -			1723,62	Kuhmilch		1	HPLC-Chip/ TOF MS	Barile et al. [2011]
(HexNAc) ₆				Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₁			1787,67	Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₂ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₂	FDS-LNH		1801,64	Humanmilch Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS	Bode [2003] Finke [2000]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₂ - (Fuc) ₃ - (Neu5Ac) ₁			1802,68	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄	LND		1803,67	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1 1	CE-LIF HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Albrecht et al. [2011] Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₁			1828,72	Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]
(Hex) ₃ - (HexNAc) ₆ - (Fuc) ₁			1869,77	Kuhmilch (Holstein-Friesian)		1	HPLC-Chip/TOF-MS	Sundekilde et al. [2012]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ -	FS-LNO		1875,73	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(HexNAc) ₃ -				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Fuc) ₁ -				Humanmilch	1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.	
(Neu5Ac) ₁				Humanmilch	2	ICR MS HPLC-Chip/TOF-MS	[2006] Wu et al. [2011]	
(Hex) ₅ -	TF-LNO		1876,76	Fäzes von gestillten			CE-LIF	Albrecht [2011]
(HexNAc) ₃ -				Säuglingen				
(Fuc) ₃				Humanmilch		CE-LIF	Albrecht [2011]	
				Humanmilch		HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]	
				Humanmilch		HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]	
				Humanmilch	1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.	
				Humanmilch		ICR MS	[2006]	
				Humanmilch		HPAEC-PAD/FAB-MS	Rudloff et al. [2012]	
	Humanmilch	2	HPLC-Chip/TOF-MS	Wu et al. [2010]				
(Hex) ₆ -			1892,76	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(HexNAc) ₃ -						ICR MS	[2006]	
(Fuc) ₂								
(Hex) ₈ -			1898,72	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT	Ninonuevo et al.
(Fuc) ₂ -						ICR MS	[2006]	
(Neu5Ac) ₁								

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₉ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			1914,72	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₄ - (HexNAc) ₂ - (Neu5Ac) ₃	TS-LNH		1946,75	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₁	F-LND		1949,81	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1 1	CE-LIF HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPAEC-PAD/FAB-MS	Albrecht et al. [2011] Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006] Rudloff et al. [2012]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₂ - (Neu5Ac) ₁	DFS-LNO		2021,87	Humanmilch Humanmilch Humanmilch Humanmilch		 1 2	HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPLC-Chip/TOF-MS	Bode [2003] Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006] Wu et al. [2011]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₂			2166,98	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₃ - (Neu5Ac) ₁			2168,02	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1	HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/TOF-MS	Bode [2003] Finke [2000] Wu et al. [2011]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅			2169,01	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			2241,07	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1	HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Bode [2003] Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₃			2242,10	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1 3	HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPLC-Chip/TOF-MS	Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006] Wu et al. [2010]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₂ - (Neu5Ac) ₂	Fuc2- Neu5Ac2- LNO		2313,13	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₄ - (Neu5Ac) ₁	Fuc4- Neu5Ac- LNO		2314,16	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₁			2315,15	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₂ - (Neu5Ac) ₁			2387,21	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1	HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Bode [2003] Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₄			2388,25	Humanmilch Humanmilch Humanmilch		1 1 1	HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS HPLC-Chip/TOF-MS	Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006] Wu et al. [2010]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₃ - (Neu5Ac) ₂	Fuc3- Neu5Ac2- LNO		2459,27	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₅ - (HexNAc) ₃ - (Fuc) ₅ - (Neu5Ac) ₁	Fuc5- Neu5Ac- LNO		2460,31	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₂			2461,30	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₃ - (Neu5Ac) ₁	Fuc3- Neu5Ac- LND		2533,36	Humanmilch			HPAEC-PAD/ESI-Q-TOF-MS	Bode [2003]
(Hex) ₆ - (HexNAc) ₄ - (Fuc) ₅			2534,39	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
				Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₁ - (Neu5Ac) ₁			2606,41	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₃			2607,44	Humanmilch Humanmilch		1	HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₈ - (HexNAc) ₆ - (Fuc) ₁			2680,49	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₂ - (Neu5Ac) ₁			2752,55	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]
(Hex) ₇ - (HexNAc) ₅ - (Fuc) ₄			2753,59	Humanmilch Humanmilch		1	HPAEC-PAD/MALDI-MS HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Finke [2000] Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₈ - (HexNAc) ₆ - (Fuc) ₄			3118,83	Humanmilch			HPAEC-PAD/MALDI-MS	Finke [2000]

Struktur	Abkürzung*	Substanz*	m/z	Vorkommen	Gehalt	I	Analysenmethode	Quelle
(Hex) ₈ - (HexNAc) ₆ - (Fuc) ₂ - (Neu5Ac) ₃			3700,40	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]
(Hex) ₈ - (HexNAc) ₆ - (Fuc) ₅ - (Neu5Ac) ₃			4138,84	Humanmilch		1	HPLC-Chip/MS-MALDI-FT ICR MS	Ninonuevo et al. [2006]

6.1.3 Literaturübersicht über Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden

Tab. 6-3: Eigenschaften von milcheigenen Oligosacchariden (HMOS = Humanmilch-Oligosaccharide, BMO = bovine, milcheigene Oligosaccharide, DP = Grad der Polymerisierung)

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
Potentiell prebiotische Eigenschaften				
Neutrale HMOS	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums an <i>B. longum subsp. infantis</i> JCM1222 → Folge: Abbau aller HMOS + Anstieg von Lac, Fuc, Gal und Glc • Anstieg des Wachstums an <i>B. bifidum</i> JCM1254 → Folge: Abbau aller HMOS + Anstieg von Fuc und Gal + vorübergehender Anstieg sowie anschließender Abfall der Glc-Konzentration • Abbau von ausschließlich Lacto-N-tetraose durch <i>B. longum subsp. longum</i> JCM1217 und <i>B. breve</i> 	Asakuma et al. [2011]
HMOS	Zellkultursystem	Wie beim stillen	<ul style="list-style-type: none"> • Detektion von <i>Ruminococcus</i> im Stuhl • Le(a-b+): dominante Spezies im Stuhl = <i>B. breve</i> gefolgt von <i>B. longum</i> und <i>B. bifidum</i> • Le(a+b-): dominante Spezies im Stuhl = <i>B. catenulatum</i>, <i>B. longum</i>, <i>B. breve</i>, <i>E.coli</i> und <i>B. longum</i> • Le(a-b-): dominante Spezies im Stuhl = <i>B. longum</i> und <i>B. bifidum</i> • Le(a+b+): dominante Spezies im Stuhl = <i>B. breve</i>, <i>B. bifidum</i>, <i>B. adolescentis</i>, kein <i>B. catenulatum</i> 	Coppa et al. [2011]
HMOS/LNT	Zellkultursystem	0,5 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums von 22 verschiedenen Stämmen an <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> • Bildung von Acetat und Lactat 	Garrido et al. [2013]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
HMOS	Zellkultursystem	10 g/l	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums von <i>Staphylokokken</i> • kein Abbau der HMOS • Anstieg des <i>Staphylokokken</i>-Wachstums evtl. durch Aminosäuren • evtl. Wirkung als Wachstumsstimulanz der HMOS 	Hunt et al. [2012]
HMOS (besteht v.a. aus 2'-FL, LNT und LNnT), LNnT- Standard	<i>In-vitro</i>	0,5 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstum an <i>Bifidobakterien</i>, <i>Clostridium cluster IV</i>, <i>XIVa</i> und <i>Bacteroides vulgatus</i> • LNnT-Standard-Fermentation: Produktion von größeren Mengen Gas und SCFA (v. a. Acetat und Butyrat), Anstieg des Wachstums vom <i>C. aerofaciens</i>, <i>C. ramosum</i>, <i>C. clostridioforme</i>, <i>Ruminococcus obeum</i>, <i>B. vulgatur</i> und <i>Bifidobakterien</i> • HMOS-Fermentation: Produktion von größeren Mengen an Propionat und Lactat, moderate Gasproduktion, Anstieg des Wachstums an <i>C. aerofaciens</i>, <i>C. clostridioforme</i>, <i>B. vulgatur</i>, <i>E. coli</i>, <i>Oscillibacter sp.</i> und <i>Bifidobakterien</i> • <i>Lactobazillen</i>: können HMOS nicht nutzen, aber HMOS-Metabolite wie HexNAc, Mono- und Disaccharide 	Li et al. [2012]
HMOS	Zellkultursystem	2 %	<ul style="list-style-type: none"> • höhere Konsumraten von OS mit m/z = 732,3 (Gruppe der LNT, LNnT); 878,3 (Gruppe der LNFP I/II/III/IV); 1097,4 (Gruppe der LNH, LNnH, pLNH und pLNnH); 1243,3 (Gruppe der F-LNH I/II/III-Isomere) und 1389,5 (Gruppe der DF-pLNnH, DF-pLNH und DF-LNH-Isomere) durch <i>Bifidobacterium longum bv. infantis</i> im Vergleich zu anderen <i>Bifidobacterium</i> stränge (<i>B. longum bv. longum</i>, <i>B. breve</i>) • Verbrauch an OS: 63,9% durch <i>B. infantis</i> (v. a. fucosylierte OS), 35,2% durch <i>B. longum bv. longum</i>, 24,2% durch <i>B. breve</i> • bifidogener Effekt, wenn mind. eines der oben genannten OS verdaut wird, bei Konzentration von 100 µg/l bis 25 g/l 	Mills et al. [2012] (Patent)

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
HMOS	Zellkultursystem	2 %	<ul style="list-style-type: none"> gesteigertes Wachstums der <i>Bifidobakterien</i> bakterienspezifischer Abbau der OS <i>E. coli</i>: Reduktion der OS um 20% <i>L. gasseri</i>: Reduktion der OS um 45% <i>B. longum bv. infantis</i>: 50% Reduktion der OS 	Ninonuevo et al. [2007]
OS aus Ziegenmolke (DP >2)	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> Anstieg des Wachstums an <i>Bifidobacterium ssp.</i> und <i>Bacteroiden</i> kein Anstieg an <i>Clostridium</i> und <i>Propionibacteriaceae</i> Bildung von SCFA, v.a. Milchsäure, Butyrate, Acetat und Propionsäure 	Oliveira et al. [2012]
HMOS	Zellkultursystem	2 g/l	<ul style="list-style-type: none"> gesteigertes Wachstum von <i>Bifidobacterium bifidum</i> und <i>B. breve</i> → Folge: Abbau der HMOS kein gesteigertes Wachstum von <i>B. adolescentis</i> und <i>B. longum subsp. longum</i> → kein Abbau der HMOS 	Rockova et al. [2012]
Lacto-N-biose I (LNB), GOS	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> LNB: signifikanter Anstieg der totalen <i>Bifidobakterien</i>-Population → höherer Anstieg durch LNB als durch GOS erhöhtes Wachstum von <i>B. bifidum</i>, <i>B. longum ssp longum</i>, <i>B. breve</i>, <i>B. longum ssp infantis</i> und <i>B. pseudocatenulatum</i> kein ansteigendes Wachstum von <i>Lactobazillus</i> und <i>Staphylococcus</i> LNB: Bildung von geringer Konzentration an Milchsäure und höhere Konzentration an Essigsäure (im Vergleich zu GOS) Spezies-spezifische Verdauung der OS 	Satoh et al. [2013]
HMOS	Zellkultursystem	1 g/100ml	<ul style="list-style-type: none"> Anstieg des Wachstums an <i>Bifidobakterien</i>, <i>Bacteroiden</i> und <i>Clostridien cluster XIVa</i> keine Unterstützung des Wachstums der <i>Clostridium perfringens-histolyticum</i>-Gruppe Bildung von SCFA, v.a. Acetat und Propionat 	Shen et al. [2011]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
HMOS	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. longum biovar infantis</i>: höchste Wachstumssteigerung (3 mal so hoch als mit den anderen Bakterien) → Abbau von HMOS sowie weiterer Abbau von Glucosamin, Fucose, Gal, Glc und Sialinsäure • <i>B. bifidum</i>: zweithöchstes, moderates Zellwachstum → Abbau der HMOS → Bildung von Sialinsäure, Fucose und N-Acetylglucosamin → weiterer Abbau von Gal und Glc → kein weiterer Abbau von Fucose • <i>B. longum bv. longum</i>: geringer Abbau der HMOS • <i>B. breve</i>: geringer Abbau der HMOS → weiterer Abbau von Glucosamin, Fucose und Sialinsäure abbauen • <i>B. adolescentis</i>: geringer Abbau der HMOS 	Ward et al. [2007]
HMOS, BMO	Zellkultursystem	1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums an <i>B. longum bv. infantis</i> • stärkeres Wachstum durch BMO als durch HMOS 	Ward [2009]
HMOS und 2'-FL-Standard	<i>In-vitro</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der Zahl an <i>Bifidobakterien</i>, <i>Bacteroiden</i> und <i>Lactobazillen</i> • konstante Zahl der <i>E. coli</i> und <i>Clostridium perfringens</i> • Bildung vom Milchsäure 	Yu et al. [2012]
HMOS, Standards 2'-FL, 3-FL und DFL	Zellkultursystem	HMOS: 5 g/l; 2'-FL, 3-FL: 2 g/l; DFL: 1 g/l	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg des Wachstums an <i>Bifidobacterium ssp.</i> • HMOS: Anteil an <i>Escherichia</i> und <i>Clostridium perfringens</i> gesunken • Bildung von organische Säuren • Bildung von SCFA (v.a. Lactat) → Folge: pH-Wert-Absenkung • <i>E. coli</i> und <i>C. perfringens</i>: kein Abbau von fucosylierte OS • Stuhl-Mikrobiota: Konsumierung von über 90% von 2'-FL und DFL sowie 53% der 3-FL, höherer Anstieg an Bifidobakterien als bei einzelnen Stämmen durch HMOS • Spezies-spezifisch OS-Nutzung → Entstehung spezifischer Endprodukte 	Yu et al. [2013]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
Potentiell antiinflammatorische Eigenschaften				
Saure HMOS (v. a. 3'-SL und 3'-Sialyl- 3-fucosyl- lactose)	TNF- α -aktivierte HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) unter Stress	(12,5-125) $\mu\text{g/ml}$	<ul style="list-style-type: none"> • signifikante Inhibition der Leukozytenadhäsion • Inhibition der Monozyten-Adhäsion (Effekt v.a. von 3'-SL, kein Effekt von 6'-SL; höherer Effekte von sauren HMOS-Mischung als durch einzelne Standards) • höchste Wirkung bei 125$\mu\text{g/ml}$ 	Bode et al. [2004]
HMOS	Case-controll Studie (mit HIV infizierte Milch)		<ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung der Übertragung der HIV-Infektion von Müttern auf Säugling während des Stillen • reduzierte HIV-Übertragung von Mutter auf Kind bei hohen Konz an Lacto-N-neotetraose (LNnT) • keine Assoziation zwischen höhere Konzentration an nicht-3'-SL-HMOS mit Schutz gegen postnatal HIV-Übertragung • Anstieg des Risikos an HIV-Übertragung bei hohen Gehalt an 3'-SL an Gesamt-HMOS 	Bode et al. [2012]
OS aus Ziegenmilch	Ratten (durch Trinitrobenzen- sulfonsäure induzierte Colitis)	Oral: 500 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme der Appetitlosigkeit • Abnahme des Körpergewichtverlustes durch Erkrankung • Reduktion der Darmwandeindickung • Downregulierung der Darmexpression von Interleukin 1β 	Daddaoua et al. [2006]
HMOS- Standards	Zellkultursystem (Automated molecular docking simulation)	Bis zu 300 μM	<ul style="list-style-type: none"> • HMOS-Standards (Hex)₂-Fuc, (Hex)₃-HexNAc, 2 Isomere an (Hex)₃-HexNAc-Fuc und (Hex)₄-Fuc: Bindung an Toxin A und Toxin B (exprimiert aus <i>Clostridium difficile</i>) • Toxin A: Affinität zu 8 HMOS (5 neutrale und 3 saure) • Toxin B: Affinität zu 11 HMOS (9 neutral und 2 sauer) • keine Bindung von 3'-SL, 6'-SL und 3-FL an beide Toxine 	El-Hawiet et al. [2011]
Standards (3'-SL, 6'-SL, Neu5Ac)	Zellkultursystem	Bis zu 5 mM	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition von Rotaviren-Stämmen Typ 3 durch 3'-SL • Inhibition von Hämagglutination durch 3'-SL, 6'-SL und Neu5Ac 	Iskarpatyoti et al. [2012]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
HMOS, Disialyllacto- N-tetraose (DSLNT), GOS	Neonatale Ratten	HMOS: 10 mg/ml GOS: 8 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Verbesserung des 96h-Überleben der Baby-Ratten bei NEC-Erkrankung (Necrotisierende Enterokolitis) • DSLNT = protektives OS → kein Effekt mehr, wenn ein Neu5Ac-Reste entfernt wurde • Reduktion der NEC • kein Effekt von GOS 	Jantscher-Krenn et al. [2012]
HMOS, Vivinal®GOS	Zellkultursystem	HMOS: 20 mg/ml GOS: 8 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Ablösen der <i>Entamoeba histolytica</i> (=Parasit) von humanen Epithelzellen → Zerstörung der Zellen durch <i>E. histolytica</i> verhindert • Dosis-abhängig • kein Effekt von fucosylierter oder sialylierter Lactose sowie LNFP I • positiver Effekt von GOS und LNT sowie LNFP II/III • Schlussfolgerung: freies terminales Gal (ohne Fuc-Rest) für Effekt nötig • kein Abbau oder Metabolisierung der HMOS 	Jantscher-Krenn et al. [2012]
HMOS	Zellkultursystem	(0,3-0,6) µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Blockierung der Bindung des Norovirus-Isolate „VA387“, „VA207“ und „Norwalk“ an Speichelproben • keine Zusammenhang zwischen Noroviren-Bindung und freien/isolierten HMOS-Standards • Schlussfolgerung: evtl. positive Reaktion durch Glycoproteine wie Muzin 	Jiang et al. [2004]
2'-FL	Biosensor based assay	50 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung von 2'-FL an <i>C. jejuni</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> 	Lane et al. [2011]
OS aus Kuhkolostrum	Zellkultursystem	20 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Abbau der OS durch <i>E. coli</i>-Bakterien in folgender Reihenfolge: 3'-Sialyllactose, Disialyllactose und 6'-Sialyllactosamin • keine Reaktion zwischen <i>E. coli</i> und 6'-Sialyllactose • Verhinderung der <i>E.coli</i>-Adhäsion an Darmzellen (HT29) durch OS aus Kuhkolostrum (3'-SL, DSL, 6'-Sialyllactosamin) • höherer Einfluss durch Mix der OS aus Kuhkolostrum als der einzelne Standard 3'-SL 	Lane et al. [2012]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
HMOS			<ul style="list-style-type: none"> • Assoziation von 2'-FL mit Schutz gegen Diarrhö durch <i>C. jejuni</i> • Assoziation von LDFH-I (=LNDFH-I) mit Schutz gegen Calicivirus-Diarrhö • Assoziation von LNF-I (=LNFP-I), 2'-FL und LDFH-I (=LNDFH-I) mit Schutz gegen Diarrhö 	Morrow et al. [2004]
HMOS			<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition vom E.coli-Toxin durch α-(1→2)-verknüpften Fuc • verringertes Risiko an Diarrhö bei hohem Gehalt an α-(1→2)-verknüpften fucosylierten OS 	Newburg et al. [2004]
HMOS	Mutter-Säuglings-Paare	Wie beim Stillen	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse: Ratio von α-(1→2)- fucosylierte-OS zu nicht-α-(1→2)-fucosylierte-OS • geringere Anzahl an Diarrhö-Vorfällen durch hohen Ratio • geringer Ratio: ansteigendes Risiko an <i>E. coli</i>-Toxin 	Newburg et al. [2004]
OS aus Kuhkolostrum	Zellkultursystem	5 mM	<ul style="list-style-type: none"> • Bindungsspezifität der α-(2→3)-verknüpften Neu5Ac an 9 <i>E. coli</i>-Stämme → Folge: Verlust der Hämagglutinationsaktivität der <i>E. coli</i>-Stämme • Reaktion nur mit α-(2→3)-verknüpften Neu5Ac, keine/geringe Reaktion mit α-(2→6)-verknüpften Neu5Ac 	Parkkinen et al. [1983]
HMOS, 2'-FL-Standard	<i>in-vivo</i> : Mausmodel, <i>ex-vivo</i> : Experimente mit humaner intestinalen Mucosa, <i>in-vitro</i> : Jungtier	In vivo: 2 mg/100 μ l Ex vivo: 0,2 mg/ml (2 mg/ml 2'-FL-Standard)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition der Bindung von <i>Campylobacter jejuni</i> an intestinale Mucosa durch HMOS, besonders durch neutrale, fucosylierte, α-(1→2)-verknüpfte Fraktion der HMOS • Inhibition der <i>C. jejuni</i> durch fucosylierte HMOS <i>in-vivo</i>, <i>ex-vivo</i> und <i>in-vitro</i> 	Ruiz-Palacios et al. [2003]
HMOS	Zellkultursystem	100 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Verhinderung der Adhäsion von <i>E.coli</i> an Epithelzellen 	Sarney et al. [2000]
HMOS	Pilotstudie (49 Mutter-Säuglings-Paare)	Wie beim Stillen	<ul style="list-style-type: none"> • geringere Schwere und Häufigkeit von Atem- und Darmprobleme in Säuglingen (im Vergleich zu nicht-gestillten-Säuglingen) 	Stepans et al. [2006]

Substanz	Art der Studie	Dosis	Eigenschaft	Quelle
3'-SL-Standard	Zellkultursystem (Caco-2 Zellen)	50 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition der Expression von proinflammatorischen Cytokinen (IL-8, IL-12, TNFα) • signifikante Reduktion der IL-12-Sekretion • signifikante Reduktion der Genexpression von IL-8, TNFα und NF-κB • Dosisabhängig, Zeitabhängig 	Zenhom et al. [2011]
Allgemeine Eigenschaften				
Standards (3'-SL, 6'-SL, Neu5Ac)	Zellkultursystem	Bis zu 5 mM	<ul style="list-style-type: none"> • 3'-SL und 6'-SL: nicht toxisch in der höchsten Konzentration • Neu5Ac: toxisch in der höchsten Konzentration 	Iskarpatyoti et al. [2012]
HMOS	Humanstudie	Wie beim Stillen	<ul style="list-style-type: none"> • 1 % der täglichen Einnahme von HMOS gelangen in den Urin • Auftreten von HMOS-typischen Substanzen im Säuglingsurin 	Rudloff et al. [1996]
HMOS	Humanstudie (¹³ C-labelled OS)	Wie beim Stillen	<ul style="list-style-type: none"> • Detektion von intakte HMOS sowie deren Spaltungsprodukte im Säuglingsurin • etwa 0,5 % bis 1 % der HMOS gehen in Säuglingsurin über 	Rudloff et al. [2012]
3'-SL, 6'-SL			<ul style="list-style-type: none"> • stabil bei pH 5,0 und 7,0 sowie 9,0 (egal ob tiefgefroren, gekühlt oder Lagerung bei 37°C) • getrocknete SL-Standards: stabil bei Lagerung zwischen -10 °C bis -15°C 	Schneir and Rafelson [1966]

6.1.4 Formeln zur Berechnung der Messpräzision, Methodenpräzision und Wiederholbarkeit zur Validierung von Messmethoden

Messpräzision: $s_t = \sqrt{s_w^2 + s_b^2}$

s_t = Gesamt-Standardabweichung (Messpräzision)

s_w = Standardabweichung in der Serie

s_b = Standardabweichung zwischen den Serien

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum s_j^2}{n}}$$

s_j = Standardabweichung der Tagesserie

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (x_j - x_{ges})^2}{n-1}}$$

x_j = Mittelwert einer Tagesserie

x_{ges} = Gesamt-Mittelwert aller Tagesserien

Methodenpräzision: $s_{Meth} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n-1}}$

s_{Meth} = Methodenpräzision

x_i = Messwert i in der Serie

x = Mittelwert der Serie

Wiederholbarkeit: $s_r = \sqrt{s_{Meth}^2 + s_b^2}$

s_r = Wiederholbarkeit

6.1.5 Literaturübersicht über die enzymatische GOS-Synthese

Tab. 6-4: Literaturübersicht zur enzymatischen Bildung von Galacto-Oligosacchariden

Enzym- quelle	Puffersystem / Matrix	Optimierte Prozessparameter					Maximale GOS- Ausbeute	Quelle
		pH	T	t	c _{ini} (Lac)	E/S-ratio		
<i>K. lactis</i>	Entrahmte Milch		25 °C		12 %	7 U/ml	23 %	Mozaffar et al. [1985]
	Molke	7,0	45 °C	4,5 h	23 %	0,1 %	22,2 %	Rustom et al. [1998]
	Molke	7,0	45 °C	4,5 h	23 %	0,1 %	5,1 %	Foda and Lopez-Leiva [2000]
	Lactoselösung	7,0	40 °C	4 h	40,0 g/100ml	5,8 U/ml	99 g/l	Chockchaisawasdee et al. [2005]
	Lactoselösung	7,5	40 °C	2 h	25,0 g/100ml	3 U/ml	30 %	Martinez-Villaluenga et al. [2008]
	Molke			1 h	46,5 g/100ml	1,5 U/ml	5,9 mmol/l	Hellerova and Curda [2009]
	UF-Magermilchpermeat			1 h	39,3 g/100ml	1,5 U/ml	7,3 mmol/l	Hellerova and Curda [2009]
	Lactoselösung	6,75	37 °C	0,5 h	47,2 g/100ml	1,5 U/ml	6,4 mmol/l	Hellerova and Curda [2009]
	Lactoselösung	6,5	40 °C	8 h	25,0 g/100ml	9 U/ml	19 %	Montilla et al. [2012]
	Lactoselösung	6,8	35 °C	22 h	40,0 g/100ml	1,5 U/g	42,6 % (160 g/l)	Rodriguez-Colinas et al. [2011]
	Molke	7,0	40 °C	4 h	40,0 g/100ml	10 U/g	29,9 % (119,8 mg/ml)	Lisboa et al. [2012]
	UF-Magermilchpermeat	7,5	40 °C	7 h	45 %	12 U/g	21,3 %	Gedai [2010]
	Lactoselösung	6,5	40 °C		40,0 g/100ml	10 U/ml	31,8 %	Valero [2009]
	UF-Magermilchpermeat	7,5	40 °C	5 h	40,0 g/100ml	12 U/g	10,7 %	Frenzel [2011]

Enzym- quelle	Puffersystem / Matrix	Optimierte Prozessparameter					Maximale GOS- Ausbeute	Quelle
		pH	T	t	c _{ini} (Lac)	E/S-ratio		
<i>A. oryzae</i>	Molke	5,0	35 °C	2 h	14 %	0,05 %	17,9 %	Rustom et al. [1998]
	UF-Magermilchpermeat		50 °C	3,5 h	25,3 %	6,7 %	31,1 %	Chen et al. [2002]
	Milch		47 °C	1,4 h	16,7 %	5,1 %	22,8 %	Chen et al. [2002]
	Lactoselösung	4,5	40 °C	0,5 h	27 %	4,5 g/l	20,3 % (54,84 g/l)	Matella et al. [2006]
	Lactoselösung	4,5	40 °C		50 %	0,15 g/l	26,1 %	Neri et al. [2009]
	Lactoselösung	3,5- 5,5	35 °C		80 g/100g Puffer	33 IUh/g Lac	28 %	Vera et al. [2011]
	Lactoselösung	4,5	47,5 °C	Ca. 1 h	50 %	100 IU/g	185 g/l	Vera et al. [2012]
	Lactoselösung	4,5	40 °C	7 h	40,0 g/100ml	15 U/ml	26,8 % (107 g/l)	Urrutia et al. [2013]
	Lactoselösung	4,5	40 °C		40,0 g/100ml	1 g/l	27,4 %	Valero [2009]
	UF-Magermilchpermeat	4,5	40 °C	7 h	40,0 g/100ml	12 U/g	20,6 %	Frenzel [2011]
<i>B. circulans</i>	Entrahmte Milch		30 °C		12 %	5 U/g	24 %	Mozaffar et al. [1985]
	Pasteurisiertes UF-Magermilchpermeat		60 °C	3 h	15,4 %	0,1 U/g Lac	45 %	Gosling et al. [2009]
	Molke	6,6	4 °C	2 h	20 %	0,5 %	30,6 %	Das et al. [2011]
	Lactoselösung	6,6	40 °C		20 %		42 %	Gosling et al. [2011]
	Lactoselösung	5,5	40 °C	6,5 h	40,0 g/100ml	15 U/ml	49,4 % (198 g/l)	Rodriguez-Colinas et al. [2012]
	Entrahmte Milch	5,5	40 °C	2 h	40,0 g/100ml	15 U/ml	15,4 % (7,1 g/l)	Rodriguez-Colinas et al. [2012]
	Lactoselösung	6,0	40 °C		52,5 g/100ml	1,575 g/l	39 %	Palai et al. [2012]
	Lactoselösung	6,0	45 °C		40,0 g/100ml	1 g/l	40,2 %	Valero [2009]
	UF-Magermilchpermeat	7,0	40 °C	5 h	40,0 g/100ml	12 U/g	41 %	Frenzel [2011]

6.2 Anhang zum Teil „Material und Methoden“

6.2.1 Pipettierschema und Berechnungsformeln für die enzymatische Lactosebestimmung

6.2.1.1 Pipettierschema für die enzymatische Lactosebestimmung

Tab. 6-5: Pipettierschema für die enzymatische Lactosebestimmung

	Leerwert	Standard Lactose	Ansatz Probe
Citratpuffer, NAD-Lösung	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
β -Galactosidase-Suspension	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Probelösung	---	---	0,100 ml
Standardlösung	---	0,100 ml	---
Mischen mit Rührstäbchen. 20 Minuten bei 20 °C bis 25 °C inkubieren. Zugeben:			
Kaliumdiphosphatpuffer	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
bidestilliertes Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml
Mischen mit Rührstäbchen. Nach 3 Minuten Extinktion (E_1) bei 340 nm messen. Zugeben:			
β -Galactose-Dehydrogenase	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Mischen mit Rührstäbchen. Nach 30 Minuten Extinktion (E_2) bei 340 nm messen.			
Extinktionsmessung nach 5 Minuten wiederholen bis konstanter Wert erhalten wird.			

6.2.1.2 Berechnungsformeln für die enzymatischen Lactosebestimmung

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe bzw Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probe bzw Standard}}$$

E_1 bzw. E_2 = siehe Pipettierschema

$$c = 1,793 * \Delta E$$

c = Konzentration der Lactose in g/l

6.2.2 Formeln zur Berechnung der quantifizierten Zucker mittels photometrische Testsysteme

6.2.2.1 Formeln zur Berechnung der neutrale Zucker nach Resorcinol-Schwefelsäure-Test

Formel zur Berechnung des Gehaltes an neutralen Zuckern:

$$c \text{ [g/100 ml]} = (E_{\text{MWB}} - n) / m * V / 10$$

c = Konzentration [g/100 ml] der Probe

E_{MWB} = Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Probe nach Abzug des Blindwertes

n = Achsenabschnitt der Lactose-Kalibrierung

m = Anstieg der Lactose-Kalibrierung

V = Verdünnung der Probe durch vorherige Probenbehandlung

6.2.2.2 Formeln zur Berechnung der sialinsäurehaltigen Zucker mittels Perjodat-Resorcinol-Test

Formel zur Berechnung des Gehaltes an sialinsäurehaltigen Zuckern nach Jourdian et al. [1971]:

$$c \text{ [mg/l]} = (E_{\text{MWB}} - n) / m / \text{AF1} / \text{AF2} * V * 1000$$

c = Konzentration [mg/l] der Probe

E_{MWB} = Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Probe nach Abzug des Blindwertes

n = Achsenabschnitt der Sialinsäure-Kalibrierung

m = Anstieg der Sialinsäure-Kalibrierung

AF1 = Aufkonzentrierungsfaktor durch den Vakuumkonzentrator (AF1 = 2)

AF2 = Aufkonzentrierungsfaktor der Probe durch vorherige Probenbehandlung

V = Verdünnung der Probe durch vorherige Probenbehandlung

6.2.2.3 Formeln zur Berechnung der sialinsäurehaltigen Zucker mittels Resorcinol-Salzsäure-Test

Formel zur Berechnung des Gehaltes an sialinsäurehaltigen Zuckern nach Svennerholm [1957]:

$$c \text{ [mg/l]} = (E_{\text{MWB}} - n) / m / \text{AF1} / \text{AF2} * V * 1000$$

c = Konzentration [mg/l] der Probe

E_{MWB} = Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Probe nach Abzug des Blindwertes

n = Achsenabschnitt der Sialinsäure-Kalibrierung

m = Anstieg der Sialinsäure-Kalibrierung

AF1 = Aufkonzentrierungsfaktor durch den Vakuumkonzentrator ($\text{AF1} = 2$)

AF2 = Aufkonzentrierungsfaktor der Probe durch vorherige Probenbehandlung

V = Verdünnung der Probe durch vorherige Probenbehandlung

6.2.3 Berechnungsgrundlagen zur GOS-Analyse für die enzymatische Synthese von Galacto-Oligosacchariden mit Hilfe von β -Galactosidasen

Berechnungsgrundlagen:

$$\text{GOS [mg/l]} = c^{\text{ini}}(\text{Lac}) - c(\text{Lac}) - c(\text{Gal}) - c(\text{Glc})$$

GOS [mg/l] = berechneter Gehalt an GOS in mg/l

$c^{\text{ini}}(\text{Lac})$ = Ausgangskonzentration der Lactose in mg/l, berechnet mit Hilfe einer externen Lactosekalibrierung

$c(\text{Lac})$ = Gehalt an Lactose in mg/l zu einem definierten Zeitpunkt, berechnet mit Hilfe einer externen Lactosekalibrierung

$c(\text{Gal})$ = Gehalt an Galactose in mg/l zu einem definierten Zeitpunkt, berechnet mit Hilfe einer externen Galactosekalibrierung

$c(\text{Glc})$ = Gehalt an Glucose in mg/l zu einem definierten Zeitpunkt, berechnet mit Hilfe einer externen Glucosekalibrierung

$$\text{GOS [\%]} = \text{GOS [mg/l]} * 100 / c^{\text{ini}}(\text{Lac})$$

GOS [%] = berechneter Ausbeute an GOS in %

$$\text{LH [\%]} = 100 - [c(\text{Lac}) * 100 / c^{\text{ini}}(\text{Lac})]$$

LH [%] = Lactosehydrolyse in %

6.2.4 Formel zur Ausbeuteberechnung der Nanofiltrationsversuche sowie Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare

6.2.4.1 Formel zur Ausbeuteberechnung der Nanofiltrationsversuche

$$Y_C = \frac{C_r \times V_r}{C_f \times V_f} \times 100$$

Y_C = prozentuale Ausbeute der Komponente C

C_r = Zuckerkonzentration im End-Retentat (nach Nanofiltration)

C_f = Zuckerkonzentration im Ausgangsfeed (vor Nanofiltration)

V_r = Volumen des End-Retentat (nach Nanofiltration)

V_f = Volumen des Ausgangs-Feed (vor Nanofiltration)

6.2.4.2 Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare

Tab. 6-6: Technische Angaben der Anlage ÄKTAcrossflow™ von GE Healthcare

ÄKTAcrossflow — Technical Specifications	
Anwendung	Prozessentwicklung Membran-Screening Prozessoptimierung
Rezirkulationsvolumen (min.)	25 ml (mit 1,7 mm ID tubing kit)
Anwendungsdruck (max.)	5.2 bar (75,4 psi)
Breite	620 mm
Länge	400 mm
Höhe	650 mm
Gewicht	70 kg
Anschluss	UNF 5/16"
Hold-Up Volume Recirculation Line	< 20 ml (mit 1,7 mm ID tubing kit, leeres Reservoir)
Mischungsprinzip	Magnetrührer
Material Compliance	USP Class V
pH-Spanne	2-12
Wellenlänge [Zn Lampe]	214 nm
Flow Cell Path Length	2 mm
Hauptspannung	100 V bis 240 V ~ ±10 %, Hz (Auto range)
Protection Class	IP 20
Compliance	The product fulfills valid directives and standards when used within the conditions specified in the user manual. The product must also be used in the same state as it was delivered from GE Healthcare and connected only to other CE labeled GE Healthcare modules or other products as recommended. For regulatory details please see declaration of conformity.

6.3 Anhang zum Teil „Auswertung und Diskussion“

6.3.1 Anhang zum Abschnitt „Fett- und Proteinabtrennung von Milchproben“ (Kapitel 4.1.1.1)

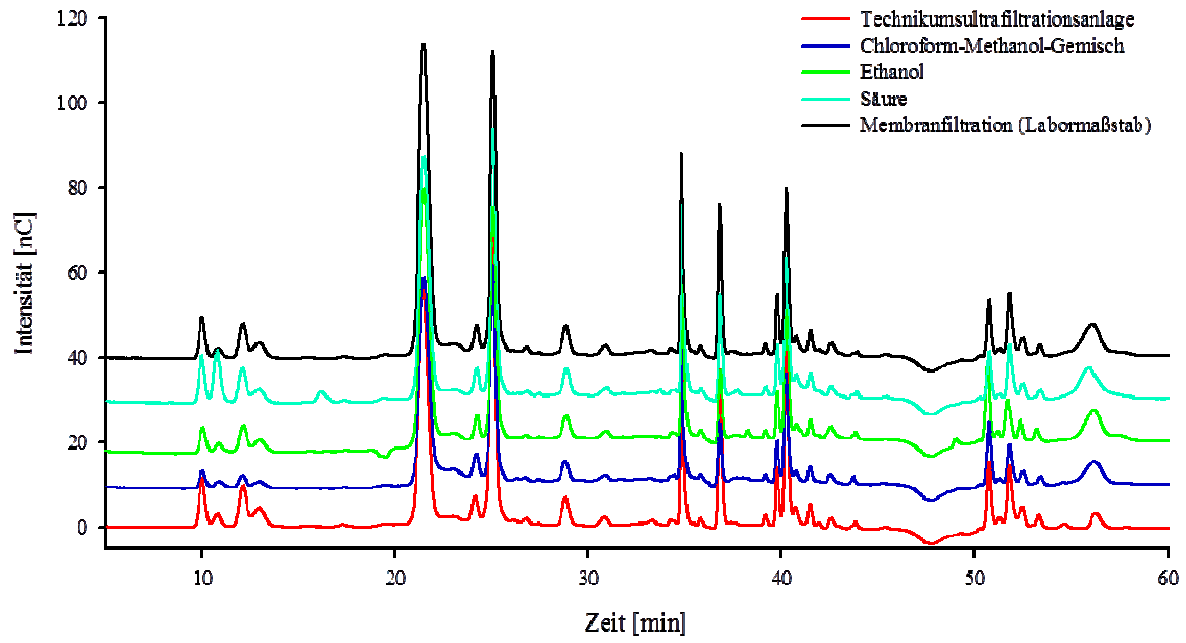


Abb. 6-1: HPAEC-Chromatogramme der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden zur Proteinabtrennung bei einer Kuhmilchprobe (Probenaufarbeitung mittels GCC-SPE)

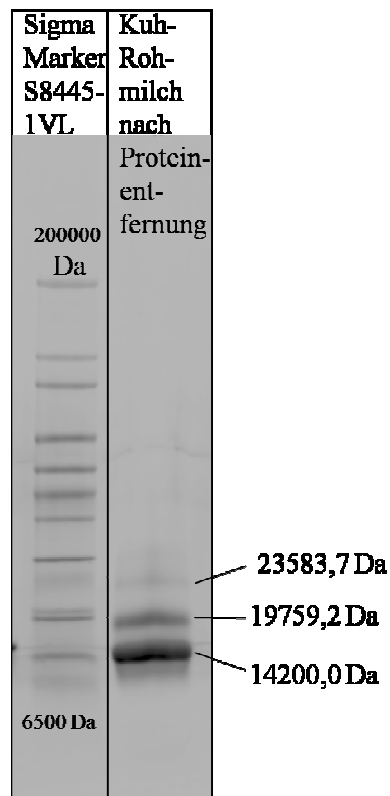


Abb. 6-2: SDS-PAGE-Gel von dem Sigma-Marker S8445-1VL (links) und einer Kuh-Rohmilchprobe nach Entfettung und Proteinentfernung mittels einer Technikums-Ultrafiltrationsanlage (rechts)

6.3.2 Anhang zum Abschnitt „Größenausschlusschromatographie mit dem Material Sephadex®G25 zur Lactoseabtrennung“ (Kapitel 4.1.1.2.1)

Tab. 6-7: Daten zur Herstellung der Vereinigungen nach dem 30min- bzw. 180min-Lauf der Sephadex®-Größenausschlusschromatographie

Fraktion	180min-Lauf	30min-Lauf
V2-5	64 min - 116 min	10,5 min - 19,6 min
VL1	116 min - 132 min	19,6 min - 21,7 min
VL2-3	132 min - 168 min	21,7 min - 28 min

6.3.3 Anhang zum Abschnitt „HPAEC-PAD“ (Kapitel 4.1.1.3.1)

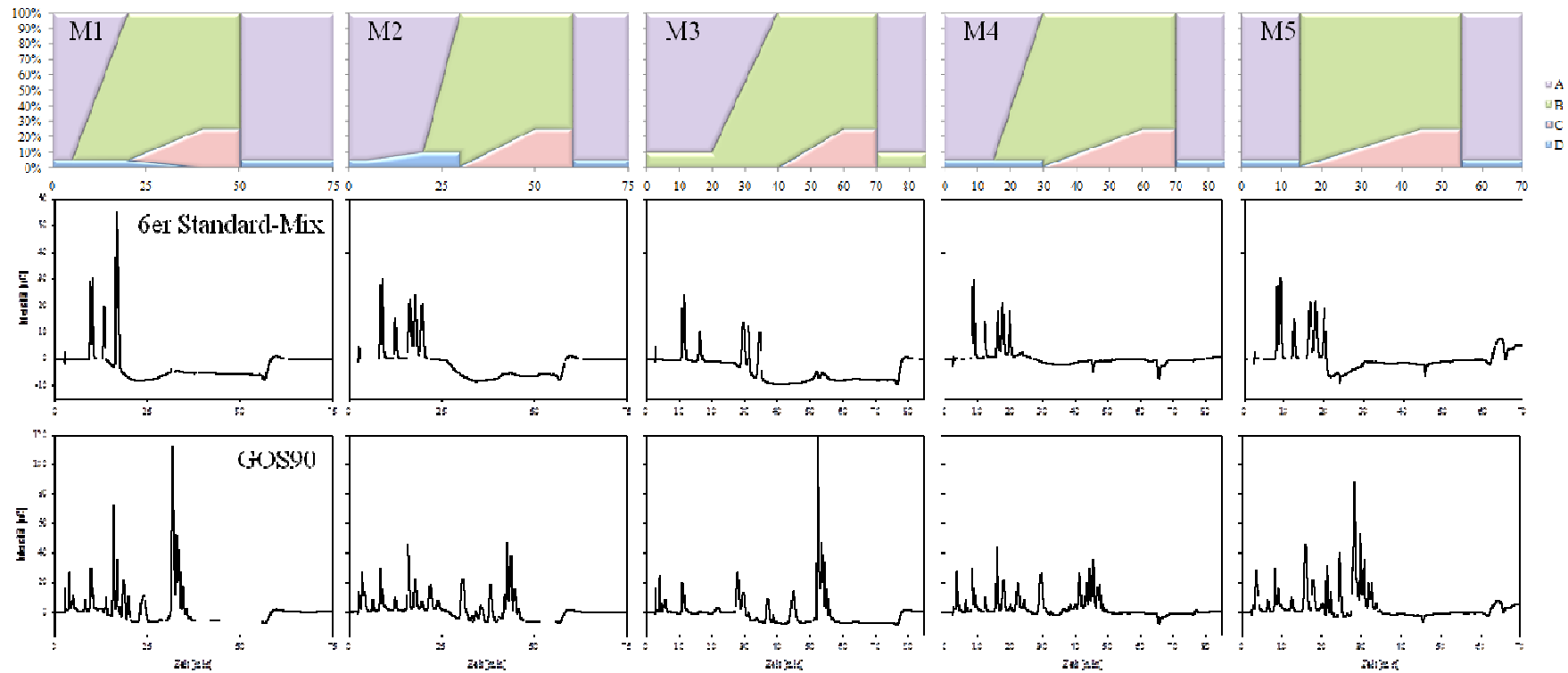
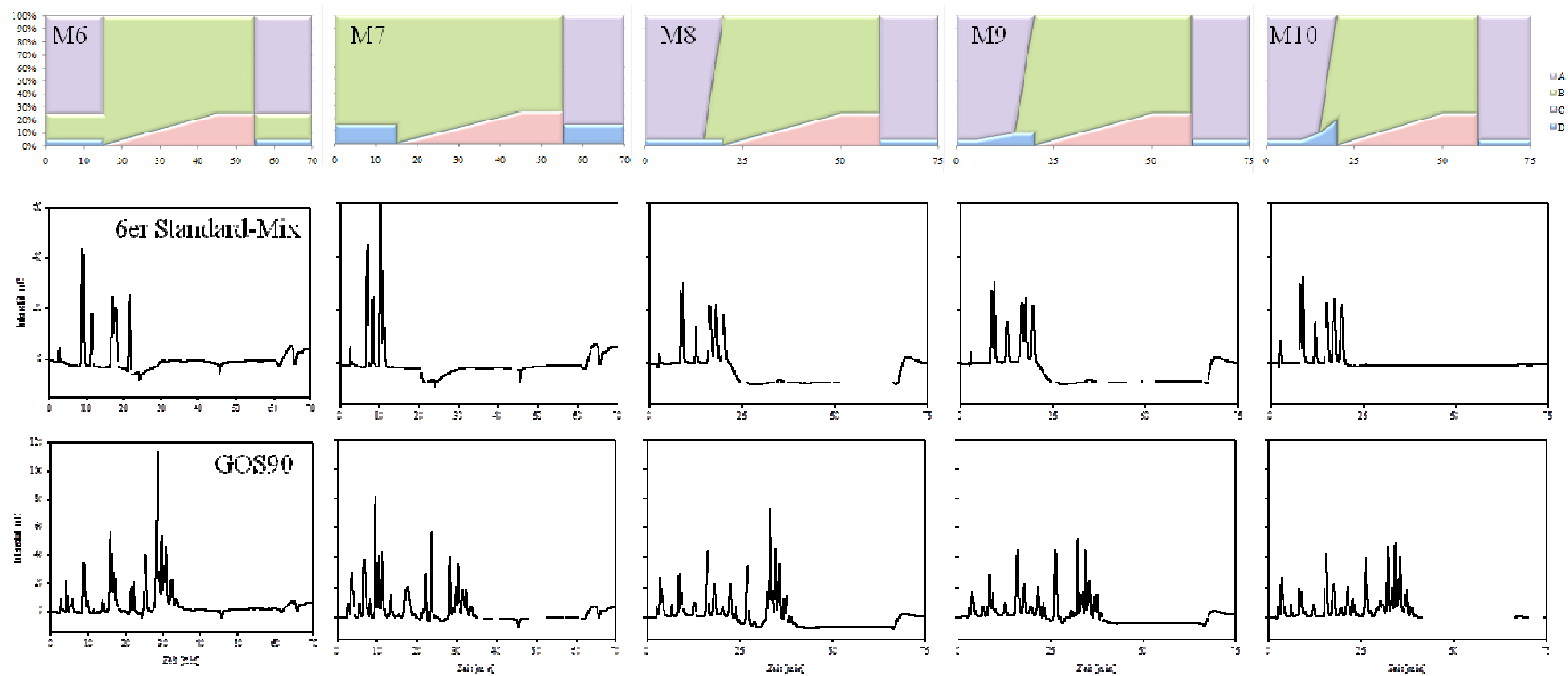


Abb. 6-3: Vergleich verschiedener HPAEC-PAD-Gradienten durch die Darstellung des jeweiligen Gradientenprogramms (A: 10 mM Natriumhydroxid, B: 100 mM Natriumhydroxid, C: 100 mM Natriumhydroxid + 1000 mM Natriumacetat, D: 100 mM Natriumhydroxid + 50 mM Natriumacetat), der chromatographischen Trennung des 6er Standard-Mixes (bestehend aus Galactose, Glucose, Fructose, Melezitose, Lactose und Lactulose) sowie der chromatographischen Trennung des GOS90-Sirups (Inhaltsstoffe des Sirups siehe Abb. 4-3)



Fortführung von Abb. 6-3

6.3.4 Anhang zum Abschnitt „Untersuchungen der enzymatisch synthetisierten, GOS-haltigen Proben mittels NMR“ (Kapitel 4.3.3)

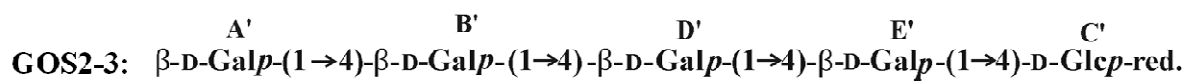
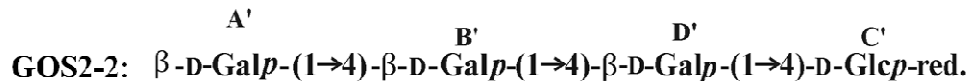
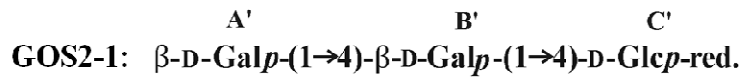
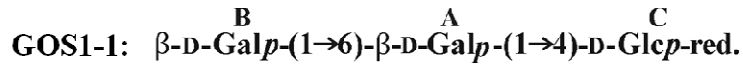


Abb. 6-4: Struktur der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 nach Analyse mittels ^1H NMR, ^{13}C NMR und GLC-MS (GOS1: hergestellt durch β -Galactosidase aus *K. lactis*, GOS2: hergestellt durch β -Galactosidase aus *B. circulans*, GOS1-1: Peak Nr. 6 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 23,6 min; GOS2-1: Peak Nr. 8 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 33,3 min; GOS2-2: Peak Nr. 10 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 35,9 min; GOS2-3: Peak Nr. 11 der Abb. 4-41, Trisaccharid bei 37,7 min)

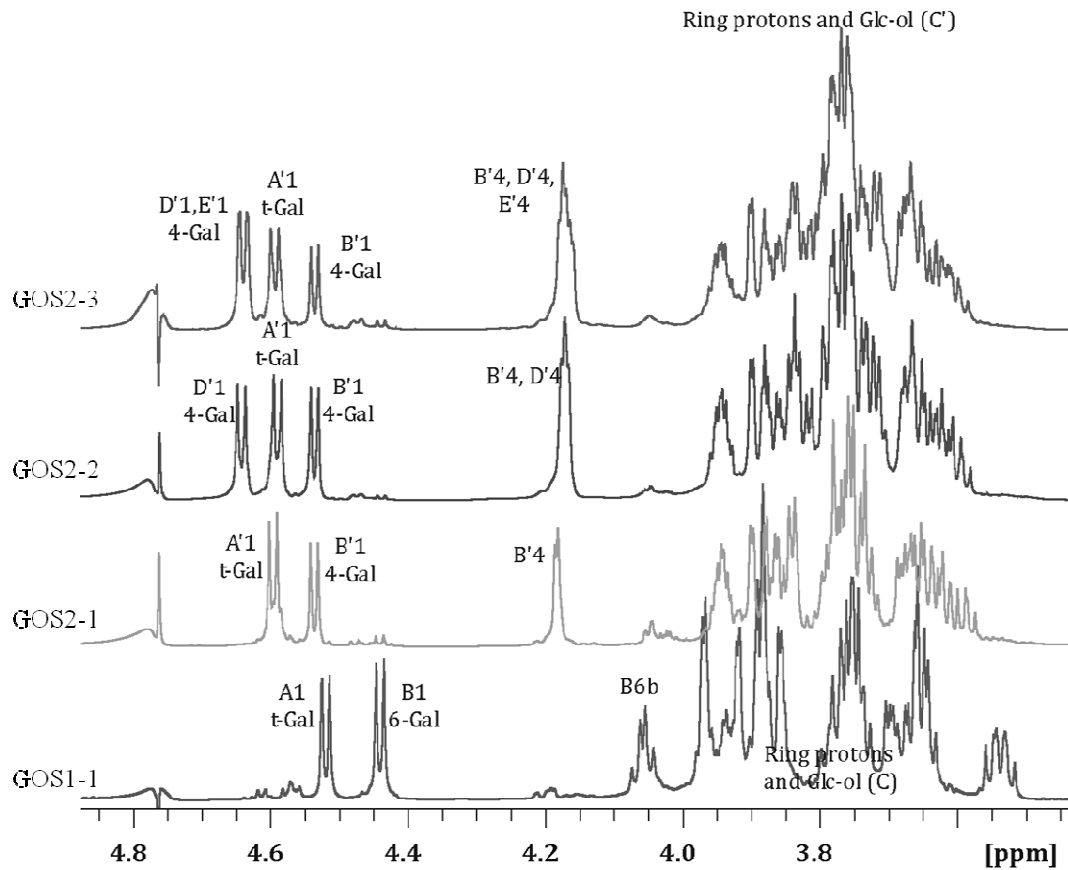


Abb. 6-5: ^1H NMR-Spektrum (700 MHz) der Oligosaccharide GOS1-1, GOS2-1, GOS2-2 und GOS2-3 (Analyse mit D_2O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)

Tab. 6-8: ^1H NMR und ^{13}C NMR des Trisaccharids GOS1-1 (Analyse mit D_2O bei $27\text{ }^\circ\text{C}$, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton ($\delta_{\text{H}} 2.225$; $\delta_{\text{C}} 31.45$), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)

		1a	1b	2	3	4	5	6a	6b
A	^1H	4.52	3.54	3.65	3.97	3.69	3.76	3.76	
	$J_{1,2} 8.0\text{ Hz}$	^{13}C	104.2	72.2	73.9	69.8	76.3	62.2	
B	^1H	4.44	3.53	3.64	3.92	3.88	3.88	4.05	
	$J_{1,2} 8.0\text{ Hz}$	^{13}C	104.6	72.0	73.6	69.7	74.3	70.2	
C	^1H	3.65	3.75	3.85	3.97	3.89	3.94	3.87	3.74
	^{13}C	63.8	70.7	73.4	81.0	72.4	63.2		

Tab. 6-9: ^1H NMR und ^{13}C NMR des Trisaccharids GOS2-1 (Analyse mit D_2O bei $27\text{ }^\circ\text{C}$, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton ($\delta_{\text{H}} 2.225$; $\delta_{\text{C}} 31.45$), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)

		1a	1b	2	3	4	5	6a	6b
A'	1H	4.59	3.58	3.66	3.89	3.68	3.75	3.78	
	$J_{1,2} 8.0\text{ Hz}$	^{13}C	105.5	72.6	74.0	69.8	76.4	62.2	
B'	1H	4.53	3.62	3.76	4.18	3.72	3.76	3.84	
	$J_{1,2} 8.0\text{ Hz}$	^{13}C	104.3	72.6	74.2	78.4	75.5	61.7	
C'	1H	3.62	3.73	3.84	3.95	3.87	3.93	3.87	3.75
	^{13}C	63.7	70.8	73.2	80.7	72.4	63.2		

Tab. 6-10: ^1H NMR und ^{13}C NMR des Tetrasaccharids GOS2-2 (Analyse mit D_2O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)

		1a	1b	2	3	4	5	6a	6b
A'	1H	4.59	3.59	3.65	3.89	3.68	3.75	3.78	
	J1,2 7.83 Hz	13C	105.5	72.4	74.0	69.8	76.4	62.2	
B'	1H	4.53	3.61	3.76	4.17	3.72	3.76	3.84	
	J1,2 8.0 Hz	13C	104.3	72.6	74.2	78.9	75.7	61.8	
C'	1H	3.62	3.73	3.84	3.94	3.87	3.93	3.87	3.75
		13C	63.7	70.7	73.0	80.8	72.4	63.2	
D'	1H	4.64	3.66	3.77	4.16	3.71	3.76	3.81	
	J1,2 8.0 Hz	13C	105.6	73.0	74.5	78.3	75.6	62.0	

Tab. 6-11: ^1H NMR und ^{13}C NMR des Pentasaccharids GOS2-3 (Analyse mit D_2O bei 27 °C, chemische Verschiebung relativ zu externen Aceton (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45), (Abkürzung A, A', B, B', C, C' D' und E' siehe Abb. 6-4)

		1a	1b	2	3	4	5	6a	6b
A'	1H	4.59	3.59	3.65	3.89	3.68	3.75	3.78	
	J1,2 7.65 Hz	13C	105.5	72.4	74.0	69.8	76.4	62.2	
B'	1H	4.53	3.61	3.76	4.17	3.72	3.76	3.84	
	J1,2 7.83 Hz	13C	104.3	72.6	74.2	78.4	75.5	61.8	
C'	1H	3.62	3.73	3.84	3.94	3.87	3.93	3.87	3.75
		13C	63.7	70.7	73.0	80.8	72.4	63.2	
D'	1H	4.64	3.66	3.77	4.16	3.71	3.76	3.81	
	J1,2 8.0 Hz	13C	105.55	73.0	74.5	78.3	75.6	62.0	
E'	1H	4.64	3.66	3.77	4.16	3.71	3.76	3.81	
	J1,2 7.83 Hz	13C	105.75	73.0	74.5	78.3	75.6	62.0	

6.3.5 Anhang zum Abschnitt „Cross-Flow-Filtration von GOS-haltigen Proben im Labormaßstab mit der Anlage ÄKTAcrossflow™“ (Kapitel 4.4.1.2.1)

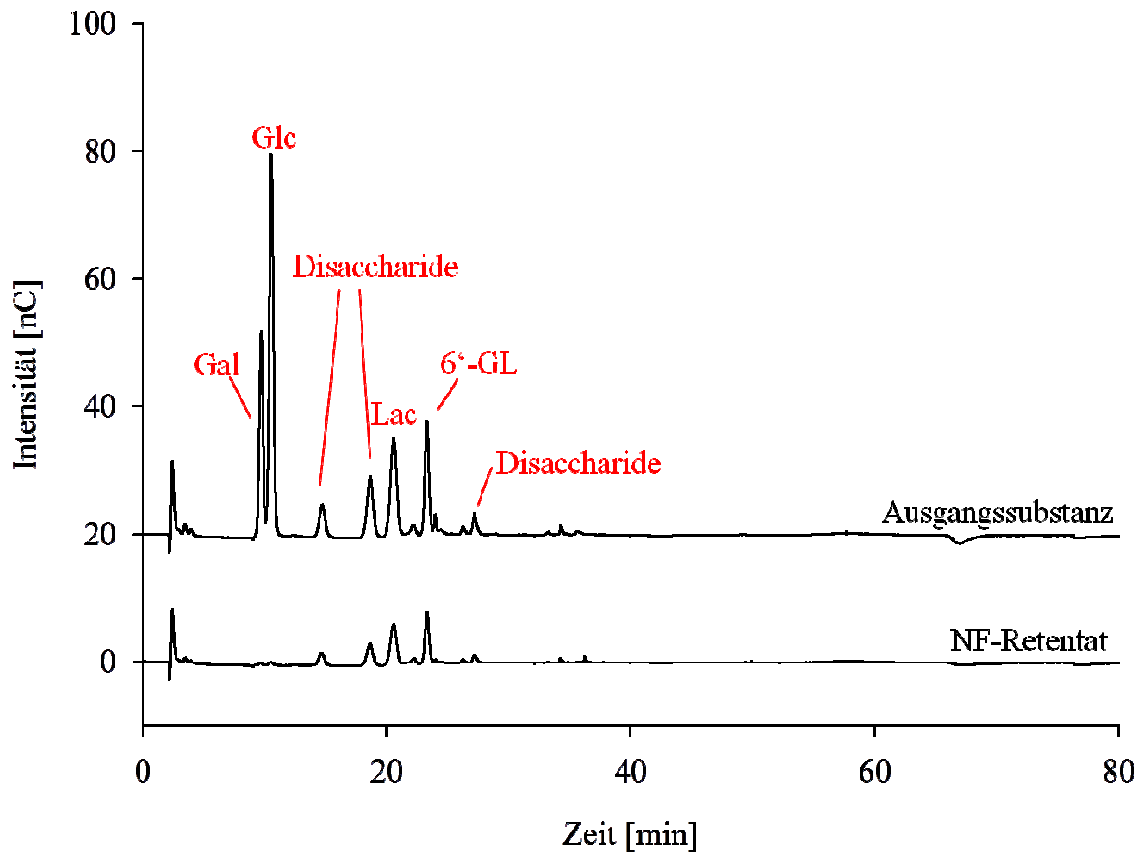


Abb. 6-6: HPAEC-Chromatogramme der Ausgangssubstanz der Nanofiltration (enzymatisch hergestellte, GOS-haltige Lösung mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis* bei 40 °C, 12 U/g, pH 7, 5 h) und das durch die Membran SR100 aufgereinigte Nanofiltrationsretentat (Durchführung: Diafiltration mit einem Washfaktor von ca. 30, Maßstab: Labormaßstab, Anlage: ÄKTAcrossflow™, TMP: 4,0 bar, Temperatur: 40 °C, Feed: 200 ml/min)

6.3.6 Anhang zum Abschnitt „Aufreinigung der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Proben mittels präparativer Chromatographie an Aktivkohle“ (Kapitel 4.4.2.2)

Tab. 6-12: Gehalte, Anteil am Gesamtzucker und Wiederfindung (im Vergleich zur Ausgangssubstanz) von Galactose, Glucose, Lactose und GOS (berechnet mit der externen Lactosekalibrierung, bestehend aus Di- bis Pentasacchariden) nach Aktivkohle-Aufreinigung (siehe 4.4.2.1) der enzymatisch hergestellten, GOS-haltigen Lösungen (GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *K. lactis*: 12 U/g, 40 °C, pH 7, 5 h; GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *A. oryzae*: 12 U/g, 40 °C, pH 4,5, 4 h; GOS mit Hilfe der β -Galactosidase aus *B. circulans*: 12 U/g, 40 °C, pH 4, 5 h)

Enzymatisch hergestellte GOS-Lösung	Bezeichnung nach Aktivkohle-Aufreinigung	Gehalte	Anteil am Gesamtzucker [%]	Wiederfindung [%]
GOS aus <i>B. circulans</i>	O12	0,00 g/100 ml Gal 0,00 g/100 ml Glc 0,03 g/100ml Lac 5,39 g/100ml GOS	0 0 0,55 99,45	0 0 0,23 14,11
GOS aus <i>A. oryzae</i>	O13	0,00 g/100 ml Gal 0,00 g/100 ml Glc 0,03 g/100ml Lac 5,08 g/100ml GOS	0 0 0,59 99,41	0 0 0,08 66,33
GOS aus <i>K. lactis</i> (Novozymes)	O14	0,00 g/100 ml Gal 0,00 g/100 ml Glc 0,01 g/100ml Lac 5,79 g/100ml GOS	0 0 0,17 99,83	0 0 0,09 23,97
GOS aus <i>K. lactis</i> (DSM)	O15	0,00 g/100 ml Gal 0,00 g/100 ml Glc 0,02 g/100ml Lac 5,40 g/100ml GOS	0 0 0,37 99,63	0 0 0,36 22,05
GOS aus <i>K. lactis</i> (Hansen)	O16	0,00 g/100 ml Gal 0,06 g/100 ml Glc 0,10 g/100ml Lac 6,31 g/100ml GOS	0 0,93 1,55 97,53	0 0,23 1,59 27,29

7 Literatur

- Alander, M., J. Mättö, et al. (2001). "Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract." International Dairy Journal **11**: 817-825.
- Albrecht, S. (2011). Gastrointestinal-active oligosaccharides from human milk and functional foods. Wageningen, Wageningen University. **doctor**.
- Albrecht, S., H. A. Schols, et al. (2011). "Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk." Carbohydrate Research **346**(16): 2540-2550.
- Alhaj, O. A., E. Taufik, et al. (2013). "Chemical characterisation of oligosaccharides in commercially pasteurised dromedary camel (*Camelus dromedarius*) milk." International Dairy Journal **28**(2): 70-75.
- Asakuma, S., M. Akahori, et al. (2007). "Sialyl Oligosaccharides of Human Colostrum: Changes in Concentration during the First Three Days of Lactation." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **71**(6): 1447-1451.
- Asakuma, S., E. Hatakeyama, et al. (2011). "Physiology of Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-associated Bifidobacteria." Journal of Biological Chemistry **286**(40): 34583-34592.
- Asakuma, S., Y. Ueda, et al. (2010). "Effect of grazing on the concentration of total sialic acid and hexose in bovine milk." Journal of Dairy Science **93**: 4850-4854.
- Atra, R., G. Vatai, et al. (2005). "Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose." Journal of Food Engineering **67**(3): 325-332.
- Bao, Y., C. Chen, et al. (2013). "Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry." Analytical Biochemistry **433**(1): 28-35.
- Barboza, M., D. A. Sela, et al. (2009). "Glycoprofiling Bifidobacterial Consumption of Galacto-Oligosaccharides by Mass Spectrometry Reveals Strain-Specific, Preferential Consumption of Glycans." Applied and Environment Microbiology **75**(23): 7319-7325.
- Barile, D., M. marotta, et al. (2010). "Neutral and acidic oligosaccharides in Holstein-Friesian colostrum during the first 3 days of lactation measured by high performance liquid chromatography on a microfluidic chip and time-of-flight mass spectrometry." Journal of Dairy Science **93**: 3940-3949.
- Barile, D., M. Meyrand, et al. (2011). "Examining bioactive components of milk: Sources of complex oligosaccharides (Part 2)." Dairy Ingredients **22**(4): 37-39.
- Barile, D., N. Tao, et al. (2009). "Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides." International Dairy Journal **19**: 524-530.
- Belitz, H.-D., W. Grosch, et al. (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin Heidelberg, Springer Verlag.
- Belitz, H.-D., W. Grosch, et al. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

- Bhavanandan, V. P. and M. Sheykhnazari (1993). "Adaptation of the Periodate-Resorcinol Method for Determination of Sialic Acids to a Microassay Using Microtiter Plate Reader." Analytical Biochemistry **213**: 438-440.
- Bischoff, S. C. and K. Kochling (2012). "Probiotics and prebiotics." Aktuelle Ernährungsmedizin **37**(5): 287-306.
- Blank, D. (2012). Strukturanalyse human Milcholigosaccharide in Abhängigkeit der Lewis-Blutgruppe. Giessen, Justus-Liebig-Universität Giessen. **Doktor**.
- Bode, L. (2003). Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem. Institut für Ernährungswissenschaften. Giessen, Justus-Liebig-Universität Giessen. **Doktor**.
- Bode, L. (2009). "Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond." Nutrition Reviews **67**(2): 183-191.
- Bode, L., L. Kuhn, et al. (2012). "Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding." American Journal of Clinical Nutrition **96**(4): 831-839.
- Bode, L., C. Kunz, et al. (2004). "Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides." Journal of Thrombosis and Haemostasis **92**: 1402-1410.
- Boon, M. A., A. E. M. Janssen, et al. (2000). "Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides." Enzyme and Microbial Technology **26**(2-4): 271-281.
- Boon, M. A., K. van't Riet, et al. (2000). "Enzymatic synthesis of oligosaccharides: Product removal during a kinetically controlled reaction." Biotechnology and Bioengineering **70**(4): 411-420.
- Botelho-Cunha, V. A., M. Mateus, et al. (2010). "Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides." Biochemical Engineering Journal **50**(1-2): 29-36.
- Broberg, A. (2007). "High-Performance liquid chromatography/electrospray Ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation." Carbohydrate Research **342**: 1462-1469.
- Bruggink, C., R. Maurer, et al. (2005). "Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1085**(1): 104-109.
- Cardelle-Cobas, A., M. Villamiel, et al. (2008). "Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L." Journal of the Science of Food and Agriculture **88**(6): 954-961.
- Chen, C. S., C. K. Hsu, et al. (2002). "Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides." Process Biochemistry **38**(5): 801-808.
- Chockchaisawasdee, S., V. I. Athanasopoulos, et al. (2005). "Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors." Biotechnology and Bioengineering **89**(4): 434-443.

- Coppa, G. V., O. Gabrielli, et al. (2011). "Oligosaccharides in 4 Different Milk Groups, *Bifidobacteria*, and *Ruminococcus obeum*." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **53**(1): 80-87.
- Czermak, P., M. Ebrahimi, et al. (2003). "Enzymatisch katalysierte Synthese von Galactosyl-Oligosacchariden in einem kontinuierlichen Membranreaktorsystemen." Chemie Ingenieur Technik **75**: 52-57.
- Czermak, P., M. Ebrahimi, et al. (2004). "Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process." Journal of Membrane Science **232**: 85-91.
- Daddaoua, A., V. Puerta, et al. (2006). "Goat Milk Oligosaccharides Are Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis." Journal of Nutrition **136**: 672-676.
- Das, R., D. Sen, et al. (2011). "A Comparative Study on the Production of Galacto-oligosaccharide from Whey Permeate in Recycle Membrane Reactor and in Enzymatic Batch Reactor." Industrial & Engineering Chemistry Research **50**(2): 806-816.
- del-Val, M. I., C. G. Hill, et al. (2001). "Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water." Biotechnology Letters **23**(23): 1921-1924.
- Depeint, F., G. Tzortzis, et al. (2008). "Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium Bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study." American Journal of Clinical Nutrition **87**: 785-791.
- DGE-aktuell. (2008). "Ballaststoffe - kein überflüssiger Ballast." from <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=873>.
- DIN 32645 (2008). "Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung" Berlin: Beuth
- Dionex (1998). Technical Note 21 - Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector.
- Dionex (2004). "Technical Note 20 - Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD)."
- Dionex (2007). "Technical Note 71 - Eluent Preparation for High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection."
- Dionex (2011). "Technical Note 110 - Carbohydrate Determination by HPAE-PAD with Disposable Au on PTFE Working Electrodes."
- Donovan, S. M. (2009). "Human milk oligosaccharides - the plot thickens." British Journal of Nutrition **101**: 1267-1269.
- Ebrahimi, M., L. Placido, et al. (2010). "A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides." Desalination **250**(3): 1105-1108.
- EFSA, E. F. S. A. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to galacto-oligosaccharides (GOS) and reduction of gastro-intestinal discomfort (ID 763) and decreasing potentially pathogenic microorganisms (ID 765) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2001;9(4):2060. N. a. A. N. EFSA Panel on Dietetic Products.

- El-Hawiet, A., E. N. Kitova, et al. (2011). "Binding of *Clostridium difficile* toxins to human milk oligosaccharides." Glycobiology **21**(9): 1217-1227.
- Feng, Y. M., X. L. Chang, et al. (2009). "Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration." Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers **40**: 326-332.
- Finke, B. (2000). Isolierung und Charakterisierung von Oligosacchariden aus humen und tierischen Milchen. Gießen, Justus-Liebig-Universität.
- Foda, M. I. and M. Lopez-Leiva (2000). "Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor." Process Biochemistry **35**(6): 581-587.
- Fong, B., K. Ma, et al. (2011). "Quantification of Bovine Milk Oligosaccharides Using Liquid Chromatography - Selected Reaction Monitoring-Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**: 9788-9795.
- France, R. R., I. Cumpstey, et al. (2000). "Fluorescence labelling of carbohydrates with 2-aminobenzamide (2AB)." Tetrahedron **11**: 4985-4994.
- Frenzel, M. (2011). Galacto-oligosaccharide synthesis: Comparison of the transgalactosylation activity of β -galactosidases derived from *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus circulans*. Kiel, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. **Master of Science**.
- Fujimoto, H., M. Miyasato, et al. (1998). "Purification and properties of recombinant beta-galactosidase from *Bacillus circulans*." Glycoconjugate Journal **15**(2): 155-160.
- Fukuda, K., A. Yamamoto, et al. (2010). "Chemical characterization of the oligosaccharides in Bacterian camel (*Camelus bactrianus*) milk and colostrum." Journal of Dairy Science **93**: 5572-5587.
- Galensa, R., U. Engelhardt, et al. (1995). Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC - Tips, Tricks und Beispiele für die Praxis. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Ganzle, M., G. Haase, et al. (2008). "Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives." International Dairy Journal **18**(7): 685-694.
- Gänzle, M. G. (2012). "Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose." International Dairy Journal **22**: 116-122.
- Garrido, D., S. Ruiz-Moyano, et al. (2013). "Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* isolates." Food Microbiology **33**(2): 262-270.
- Gedai, A. (2010). Einfluss ausgewählter Parameter auf die Galacto-Oligosaccharid-Synthese mit β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis*. Kiel, MRI.
- Gey, M. H. (2008). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Berlin Heidelberg, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Gibson, G. R., H. M. Probert, et al. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics." Nutrition Research Reviews **17**(02): 259.
- Gonzalez-Rodriguez, I., L. Ruiz, et al. (2013). "Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract." FEMS Microbiology Letters **340**(1): 1-10.

- Gopalakrishnan, A., J. F. Clinthorne, et al. (2012). "Supplementation with Galacto-Oligosaccharides Increases the Percentage of NK Cells and Reduces Colitis Severity in *Smad3*-Deficient Mice." Journal of Nutrition **142**: 1336-1342.
- Gosling, A., J. Alfrén, et al. (2009). "Facile Pretreatment of *Bacillus circulans* β -Galactosidase Increases the Yield of Galactosyl Oligosaccharides in Milk and Lactose Reaction Systems." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(24): 11570-11574.
- Gosling, A., G. W. Stevens, et al. (2010). "Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose." Food Chemistry **121**(2): 307-318.
- Gosling, A., G. W. Stevens, et al. (2011). "Effect of the Substrate Concentration and Water Activity on the Yield and Rate of the Transfer Reaction of beta-Galactosidase from *Bacillus circulans*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(7): 3366-3372.
- Goto, K., T. Urashima, et al. (2010). "Hexose, sialic acid and sialyllactose concentration in the milk of dairy and non-dairy breed cows." Milchwissenschaft-Milk Science International **65**(4): 352-356.
- Goulas, A., P. G. Kapsakalidis, et al. (2002). "Purification of oligosaccharides by nanofiltration." Journal of Membrane Science **209**: 321-335.
- Goulas, A., G. Tzortzis, et al. (2007). "Development of a process for the production and purification of alpha- and beta-galactooligosaccharides from *Bifobacterium bifidum* NCIMB 41171." International Dairy Journal **17**(6): 648-656.
- Goulas, A. K., A. S. Grandison, et al. (2003). "Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration." Journal of the Science of Food and Agriculture **83**: 675-680.
- Grandison, A. S., A. K. Goulas, et al. (2003). "The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures." J. Sci. Technol. **24**: 915-928.
- Grey, C. (2009). "Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides." Journal of Chromatography B **877**(20-21): 1827-1832.
- Günther, P. F. (2011). Etablierung eines Verfahrens zur Anreicherung von Galactooligosacchariden unter Einsatz von Aktivkohle. Kiel, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. **Bachelor of Science**.
- Hellerova, K. and L. Curda (2009). "Influence of Type of Substrate and Enzyme Concentration on Formation of Galacto-oligosaccharides." Czech Journal of Food Sciences **27**: S372-S374.
- Hernández-Hernández, O., M. c. Marín-Manzano, et al. (2012). "Monomer and Linkage Type of Galacto-Oligosaccharides Affect Their Resistance to Ileal Digestion and Prebiotic Properties in Rats." Journal of Nutrition **142**: 1232-1239.
- Hernández, O., A. I. Ruiz-Matute, et al. (2009). "Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides." International Dairy Journal **19**(9): 531-536.
- Huerta, L. M., C. Vera, et al. (2011). "Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*." Process Biochemistry **46**(1): 245-252.

- Hunt, K. M., J. Preuss, et al. (2012). "Human Milk Oligosaccharides Promote the Growth of Staphylococci." Applied and Environment Microbiology **78**(14): 4763-4770.
- Ishikawa, H., S. Matsumoto, et al. (2011). "Beneficial Effects of Probiotic Bifidobacterium and Galacto-Oligosaccharide in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized Controlled Study." Digestion **84**: 128-133.
- Iskarpatyoti, J. A., E. A. Morse, et al. (2012). "Serotype-specific differences in inhibition of reovirus infectivity by human-milk glycans are determined by viral attachment protein sigma 1." Virology **433**(2): 489-497.
- Jantscher-Krenn, E., T. Lauwaet, et al. (2012). "Human milk oligosaccharides reduce Entamoeba histolytica attachment and cytotoxicity in vitro." British Journal of Nutrition **108**(10): 1839-1846.
- Jantscher-Krenn, E., M. Zherebtsov, et al. (2012). "The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats." Gut **61**(10): 1417-1425.
- Jiang, X., P. Huang, et al. (2004). "Human Milk Contains Elements That Block Binding of Noroviruses to Human Histo-Blood Group Antigens in Saliva." Journal of Infectious Diseases **190**: 1850-1859.
- Jourdian, G. W., L. Dean, et al. (1971). "SIALIC ACIDS .11. PERIODATE-RESORCINOL METHOD FOR QUANTITATIVE ESTIMATION OF FREE SIALIC ACIDS AND THEIR GLYCOSIDES." Journal of Biological Chemistry **246**(2): 430-&.
- Kim, Y. K., S. Arima, et al. (1966). "Sialic Acid in Milk - II. Sialic Acid Content and Its Variation in Bovine Colostrum." japanese journal of zootechnical science **37**: 32-40.
- Koch Membrane System, I. (2011). An Overview of Membrane Technology and Theory. Massachusetts, A Koch Chemical Technology Group.
- Kolfschoten, R. C., A. E. M. Janssen, et al. (2011). "Mass diffusion-based separation of sugars in a microfluidic contactor with nanofiltration membranes." Journal of Separation Science **34**: 1338-1346.
- Kondepudi, K. K., P. Ambalam, et al. (2012). "Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against Clostridium difficile." Anaerobe **18**(5): 489-497.
- Kunz, C. and S. Rudloff (2006). "Health promoting aspects of milk oligosaccharides." International Dairy Journal **16**: 1341-1346.
- Kunz, C. and S. Rudloff (2008). "Potential Anti-Inflammatory and Anti-Infectious Effects of Human Milk Oligosaccharides." Bioactive Components of Milk: 455-465.
- Kunz, C., S. Rudloff, et al. (2000). "Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects." Annual Review of Nutrition **20**: 699-722.
- Kunz, C., S. Rudloff, et al. (1996). "High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides." Journal of Chromatography B-Biomedical Applications **685**(2): 211-221.
- Lane, J. A., K. Marino, et al. (2012). "Methodologies for screening of bacteria-carbohydrate interactions: Anti-adhesive milk oligosaccharides as a case study." Journal of Microbiological Methods **90**: 53-59.

- Lane, J. A., R. K. Mehra, et al. (2011). "Development of biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides." Analytical Biochemistry **410**: 200-205.
- Leo, F., S. Asakuma, et al. (2009). "Improved determination of milk oligosaccharides using a single derivatization with anthranilic acid and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1216**: 1520-1523.
- Li, M., L. L. Bauer, et al. (2012). "Microbial Composition and In Vitro Fermentation Patterns of Human Milk Oligosaccharides and Prebiotics Differ between Formula-Fed and Sow-Reared Piglets." Journal of Nutrition **142**: 681-689.
- Lisboa, C. R., L. d. S. Martinez, et al. (2012). "Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey." Food Science and Biotechnology **21**(6): 1519-1524.
- Lomax, A. R. and P. C. Calder (2008). "Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence." British Journal of Nutrition **101**(05): 633.
- Maathuis, A. J., E. G. v. d. Heuvel, et al. (2012). "Galacto-Oligosaccharides Have Prebiotic Activity in a Dynamic In Vitro Colon Model Using a ¹³C-Labeling Technique." Journal of Nutrition **142**: 1205-1212.
- Macfarlane, G. T., H. Seed, et al. (2008). "Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics." Journal of Applied Microbiology **104**: 305-344.
- Mahoney, R. R. (1998). "Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review." Food Chemistry **63**(2): 147-154.
- Maier, H. G. (1990). Lebensmittel- und Umweltanalytik - Methoden und Anwendungen. Darmstadt, Steinkopff Verlag Darmstadt.
- Marino, K., J. L. Lane, et al. (2011). "Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography." Glycobiology **21**(10): 1317-1330.
- Martín-Sosa, S., M.-J. Martín, et al. (2003). "Sialyloligosaccharides in Human and Bovine Milk and Infant Formulas: Variations with the Progression of Lactation." Journal of Dairy Science **86**: 52-59.
- Martinez-Ferez, A., S. Rudloff, et al. (2006). "Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology." International Dairy Journal **16**(2): 173-181.
- Martinez-Villaluenga, C., A. Cardelle-Cobas, et al. (2008). "Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks." Journal of Food Composition and Analysis **21**(7): 540-544.
- Martinez-Villaluenga, C., A. Cardelle-Cobas, et al. (2008). "Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G)." Food Chemistry **107**(1): 258-264.
- Matella, N. J., K. D. Dolan, et al. (2006). "Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems." Journal of Food Science **71**(7): C363-C368.

- Matissek, R. and G. Steiner (2006). Lebensmittelanalytik. Grundzüge Methoden Anwendungen. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- McJarrow, P. and J. v. Amelsfort-Schoonbeek (2004). "Bovine sialyl oligosaccharides: seasonal variations in their concentrations in milk, and a comparison of the colostrums of Jersey and Friesian cows." International Dairy Journal **14**: 571-579.
- McSweeney, P. L. H. and P. F. Fox (2009). Advanced Dairy Chemistry. Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. New York, Springer Science + Business Media.
- Mehra, R. and P. Kelly (2006). "Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects." International Dairy Journal **16**(11): 1334-1340.
- Mijan, M. A., Y.-K. Lee, et al. (2011). "Classification, Structure, and Bioactive Functions of Oligosaccharides in Milk." Korean Journal for Food Science of Animal Resources **31**(5): 631-640.
- Mills, D. A., C. B. Lebrilla, et al. (2012). Human milk oligosaccharides to promote growth of beneficial gut bacteria. USA, The Regents of the University of California (Oakland, CA). **US8197872 B2**.
- Monsigny, M., C. Petit, et al. (1988). "COLORIMETRIC DETERMINATION OF NEUTRAL SUGARS BY A RESORCINOL SULFURIC-ACID MICROMETHOD." Analytical Biochemistry **175**(2): 525-530.
- Montilla, A., N. Corzo, et al. (2012). "Effects of monovalent cations (Na⁺ and K⁺) on galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase." Milchwissenschaft-Milk Science International **67**(1): 14-18.
- Morrow, A. L., G. M. Ruiz-Palacios, et al. (2004). "Human Milk Oligosaccharide Blood Group Epitopes and innate Immune Protection against *Campylobacter* and *Calicivirus Diarrhoe* in breastfed Infants." Advances in Experimental Medicine and Biology **554**: 443-446.
- Motherway, M. O. C., M. Kinsella, et al. (2013). "Transcriptional and functional characterization of genetic elements involved in galacto-oligosaccharide utilization by *Bifidobacterium breve* UCC2003." Microbial Biotechnology **6**(1): 67-79.
- Mozaffar, Z., K. Nakanishi, et al. (1985). "FORMATION OF OLIGOSACCHARIDES DURING HYDROLYSIS OF LACTOSE IN MILK USING BETA-GALACTOSIDASE FROM *BACILLUS-CIRCULANS*." Journal of Food Science **50**(6): 1602-1606.
- Nakamura, T., H. Kawase, et al. (2003). "Concentration of Sialyloligosaccharides in Bovine Colostrum and Milk during the Prepartum and Early Lactation." Journal of Dairy Science **86**: 1315-1320.
- Neri, D. F. M., V. M. Balcao, et al. (2009). "Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol." Food Chemistry **115**(1): 92-99.
- Newburg, D. S., J. J. Polak, et al. (2004). "Comparative Analysis of Oligosaccharides in Human Milk and Feces Using High Performance Thin Layer Chromatography." Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research Conference Abstracts(353): 1152.

- Newburg, D. S., G. M. Ruiz-Palacios, et al. (2004). "Human Milk α 1,2-linked Fucosylated Oligosaccharides decrease Risk of Diarrhea due to stable toxin of *E. coli* in Breastfed Infants." Advances in Experimental Medicine and Biology **554**: 457-461.
- Newburg, D. S., G. M. Ruiz-Palacios, et al. (2004). "Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants." Glycobiology **14**(3): 253-263.
- Ninonuevo, M. R., Y. Park, et al. (2006). "A strategy for annotating the human milk glycome." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(20): 7471-7480.
- Ninonuevo, M. R., P. D. Perkins, et al. (2008). "Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk Determined by Microfluidic Chips and Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 618-626.
- Ninonuevo, M. R., R. E. Ward, et al. (2007). "Methods for the quantification of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry." Analytical Biochemistry **361**: 15-23.
- Novotny, M. V., W. R. Alley, Jr., et al. (2013). "Analytical glycobiology at high sensitivity: current approaches and directions." Glycoconjugate Journal **30**(2): 89-117.
- Olano, A. and N. Corzo (2009). "Lactulose as a food ingredient." Journal of the Science of Food and Agriculture **89**: 1987-1990.
- Oliveira, D. L., A. Costabile, et al. (2012). "In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of caprine cheese whey oligosaccharides in batch culture systems." Biofactors **38**(6): 440-449.
- Oliveira, D. L., R. A. Wilbey, et al. (2012). "Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation." International Dairy Journal **24**: 102-106.
- Packer, N. H., M. A. Lawson, et al. (1998). "A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins." Glycoconjugate Journal **15**(8): 737-747.
- Padalino, M., D. Perez-Conesa, et al. (2012). "Effect of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk." International Dairy Journal **27**(1-2): 27-33.
- Palai, T., S. Mitra, et al. (2012). "Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade beta-galactosidase." Journal of Bioscience and Bioengineering **114**(4): 418-423.
- Pan, G. and L. Melton (2005). "Analysis of sialyl oligosaccharides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry with differentiation of α 2-3 and α 2-6 sialyl linkages." Journal of Chromatography A **1077**(2): 136-142.
- Parkkinen, J. and J. Finne (1987). "Isolation of Sialyl Oligosaccharides and Sialyl Oligosaccharides Phosphates from Bovine Colostrum and Human Urine." Methods in Enzymology **138**: 289-300.
- Parkkinen, J., J. Finne, et al. (1983). "Escherichia Coli strains binding neuraminyl α 2-3 galactosides." Biochemical and Biophysical Research Communications **111**(2): 456-461.
- Prasad, L. N., F. Sherkat, et al. (2013). "Influence of Galactooligosaccharides and Modified Waxy Maize Starch on Some Attributes of Yogurt." Journal of Food Science **78**(1): M77-M83.

- Prenosil, J. E., E. Stuker, et al. (1987). "FORMATION OF OLIGOSACCHARIDES DURING ENZYMATIC LACTOSE .1. STATE OF ART." Biotechnology and Bioengineering **30**(9): 1019-1025.
- Pruksasri, S. (2007). Peoduction and Separation of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by β -galactosidase immobilized on nanofiltration membrans. Ohio, The Ohio State University. **Degree Doctor of Philosophy**.
- Rabiu, B. A., A. J. Jay, et al. (2001). "Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from Bifidobacterium Species." Applied and Environment Microbiology **67**(6): 2526-2530.
- Redmond, J. W. and N. H. Packer (1999). "Teh use of solid-phase extraction with graphitised carbon for the fractionation and purification of sugars." Carbohydrate Research **319**: 74-79.
- Rehman, H., M. S. Yousaf, et al. (2012). "106. Effect of dietary β -galacto-oligosaccharides supplementation on growth performance, cecal microbial population and immune response in broilers." Proceedings of the Society of Nutrition Physiology **21**.
- Richardson, S., A. Cohen, et al. (2001). "High-performance anion-exchange chromatography-electrospray mass spectrometry for investigation of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch." Journal of Chromatography A **917**: 111-121.
- Rivero-Urgell, M. and A. Santamaria-Orleans (2001). "Oligosaccharides: application in infant food." Early Human Development **65**: S43-S52.
- Roberts, H. R. and J. D. Pettinati (1957). "OLIGOSACCHARIDE PRODUCTION - CONCENTRATION EFFECTS IN THE ENZYMATIC CONVERSION OF LACTOSE TO OLIGOSACCHARIDES." Journal of Agricultural and Food Chemistry **5**(2): 130-134.
- Rockova, S., V. Rada, et al. (2012). "Inter-species differences in the growth of bifidobacteria cultured on human milk oligosaccharides." Folia Microbiologica **57**: 321-324.
- Rodriguez-Colinas, B., M. A. d. Abreu, et al. (2011). "Production of Galacto-oligosaccharides by the β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative Analysis of Permeabilized Cells versus Soluble Enzyme." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**: 10477-10484.
- Rodriguez-Colinas, B., A. Poveda, et al. (2012). "Galacto-oligosaccharide Synthesis from Lactose Solution or Skim Milk Using the β -Galactosidase from *Bacillus circulans*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**: 6391-6398.
- Rodriguez-Fernandez, M., A. Cardelle-Cobas, et al. (2011). "Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different beta-galactosidases." Journal of Biotechnology **153**(3-4): 116-124.
- Rudloff, S., G. Pohlentz, et al. (2012). "Urinary excretion of *in vivo* ^{13}C -labelled milk oligosaccharides in breastfed infants." British Journal of Nutrition **107**: 957-963.
- Rudloff, S., G. Pohlentz, et al. (1996). "Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula." Acta Paediatrica **85**(5): 598-603.
- Ruhaak, L. R. and C. B. Lebrilla (2012). "Advances in Analysis of Human Milk Oligosaccharides." Advances in Nutrition **3**: 406-414.

- Ruiz-Matute, A. I., M. Corzo-Martinez, et al. (2012). "Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products." Journal of Food Composition and Analysis **28**(2): 164-169.
- Ruiz-Palacios, G. M., L. E. Cervantes, et al. (2003). "*Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibits Its Binding and Infection." Journal of Biological Chemistry **278**(16): 14112-14120.
- Rustom, I. Y. S., M. I. Foda, et al. (1998). "Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis - analysis of factors." Food Chemistry **62**(2): 141-147.
- Saad, N., C. Delattre, et al. (2013). "An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field." Lwt-Food Science and Technology **50**(1): 1-16.
- Saito, T., T. Itoh, et al. (1984). "Presence of two neutral disaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms." Biochimica et Biophysica Acta **801**: 147-150.
- Saito, T., T. Itoh, et al. (1987). "Chemical structure of three neutral trisaccharides isolated in free form from bovine colostrum." Carbohydrate Research **165**: 43-51.
- Salcedo, J., R. Lacomba, et al. (2011). "Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas." Food Chemistry **127**(4): 1905-1910.
- Sanz, M. L., G. R. Gibson, et al. (2005). "Influence of Disaccharide Structure on Prebiotic Selectivity in Vitro." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 5192-5199.
- Sarney, D. B., C. Hale, et al. (2000). "A Novel Approach to the Recovery of Biologically Active Oligosaccharides from Milk Using a Combination of Enzymatic Treatment and Nanofiltration." biotechnology and Bioengineering **69**(4): 461-467.
- Satoh, T., T. Odamaki, et al. (2013). "In vitro comparative evaluation of the impact of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, on the fecal microbiota of infants." Anaerobe **19**: 50-57.
- SCF, S. c. o. F. (2001). Additional statement on the use of resistant short chain carbohydrates (oligofructosyl-saccharose and oligogalactosyl-lactose) in infant formulae and in follow-on formulae. EU Commission Report SCF/CS/NUT/IF/47 Final 14 December 2001.
- SCF, S. c. o. F. (2003). Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae. EU Commission Report SCF/CS/NUT/IF/65 Final 18 May 2003.
- Scherz, H. and G. Bonn (1998). Analytical Chemistry of Carbohydrates. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Schneir, M. L. and M. E. Rafelson (1966). "Isolation and characterization of two structural isomers of N-acetylneuraminyllactose from bovine colostrum." Biochimica et Biophysica Acta **130**: 1-11.
- Shen, Q., K. M. Tuohy, et al. (2011). "*In vitro* measurement of the impact of human milk oligosaccharides on the faecal microbiota of weaned formula-fed infants compared to a mixture of prebiotic fructooligosaccharides and galactooligosaccharides." Applied Microbiology **52**: 337-343.

- Souci, Fachmann, et al. (2008). Der große Souci-Fachmann-Kraut. Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwerttabellen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Splechtna, B., T.-H. Nguyen, et al. (2007). "Comparison between Discontinuous and Continuous Lactose Conversion Processes for the Production of Prebiotic Galactooligosaccharides Using β -Galactosidase from *Lactobacillus reuteri*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 6772-6777.
- Spreer, E. (2011). Technologie der Milchverarbeitung. Hamburg, B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG.
- Spyridaki, M.-H. E. and P. A. Siskos (1996). "An improved spectrophotometric method for the determination of free, bound and total N-acetylneuraminic acid in biological fluids." Analytica Chimica Acta **327**: 277-285.
- Stepans, M. B. F., S. L. Wilhelm, et al. (2006). "Early Consumption of Human Milk Oligosaccharides Is Inversely Related to Subsequent Risk of Respiratory and Enteric Disease in Infants." Breastfeeding Medicine **1**(4): 207-215.
- Strum, J. S., D. Aldredge, et al. (2012). "Coupling flash liquid chromatography with mass spectrometry for enrichment and isolation of milk oligosaccharides for functional studies." Analytical Biochemistry **424**: 87-96.
- Sundekilde, U. K., D. Barile, et al. (2012). "Natural Variability in Bovine Milk Oligosaccharides from Danish Jersey and Holstein-Friesian Breeds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**: 6188-6196.
- Suwasono, S. (2003). "Specificity and Selectivity in Galacto-Oligosaccharide Synthesis Reaction Catalyzed by β -Galactosidases." Indonesian Food and Nutrition Progress **10**(2): 75-84.
- Svennerholm, L. (1957). "Quantitative Estimation of Sialic Acids II: A Colorimetric Resorcinol-Hydrochloric Acid Method." Biochimica et Biophysica Acta **24**: 604-611.
- Svennerholm, L. (1958). "Quantitative Estimation of Sialic Acids III. An Anion Exchange Resin Method." Acta Chemica Scandinavica **12**: 547-554.
- Tao, N., E. J. DePeters, et al. (2008). "Bovine Milk Glycome." Journal of Dairy Science **91**(10): 3768-3778.
- Tao, N., S. Wu, et al. (2011). "Evolutionary Glycomics: Characterization of Milk Oligosaccharides in Primates." Journal of Proteome Research **10**: 1548-1557.
- Thurl, S., J. Henker, et al. (1997). "Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides." Glycoconjugate Journal **14**: 795-799.
- Thurl, S., B. Müller-Werner, et al. (1996). "Quantification of Individual Oligosaccharide Compounds from Human Milk Using High-pH Anion-Exchange Chromatography." Analytical Biochemistry **235**: 202-206.
- Thurl, S., M. Munzert, et al. (2010). "Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods." British Journal of Nutrition **104**: 1261-1271.
- Töpel, A. (1991). Chemie der Milch - Eine Einführung in die milchwirtschaftliche Chemie und die milchwirtschaftliche-chemische Laborpraxis. Leipzig, Fachbuchverlag GmbH Leipzig.

- Totten, S. M., A. M. Zivkovic, et al. (2012). "Comprehensive Profiles of Human Milk Oligosaccharides Yield Highly Sensitive and Specific Markers for Determining Secretor Status in Lactating Mothers." Journal of Proteome Research **11**(12): 6124-6133.
- Tzortzis, G., J. Vulevic, et al. (2010). Novel Use. USA. **US 2012/0058972 A1**.
- Urashima, T., T. Saito, et al. (2002). "Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals." Glycoconjugate Journal **18**: 357-371.
- Urashima, T., T. Saito, et al. (1991). "Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide; GalNAc α 1-3Gal β 1-4Glc." Biochimica et Biophysica Acta **1073**: 225-229.
- Urrutia, P., B. Rodriguez-Colinas, et al. (2013). "Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(5): 1081-1087.
- Usui, T., S. Kubota, et al. (1993). "A CONVENIENT SYNTHESIS OF BETA-D-GALACTOSYL DISACCHARIDE DERIVATIVES USING THE BETA-D-GALACTOSIDASE FROM *BACILLUS-CIRCULANS*." Carbohydrate Research **244**(2): 315-323.
- Valero, J. I. S. (2009). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation. Ohio, Ohio State University. **Doctor of Philosophy**
- Veh, R. W., J.-C. Michalski, et al. (1981). "New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides." Journal of Chromatography **212**: 313-322.
- Vera, C., C. Guerrero, et al. (2012). "Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose." Enzyme and Microbial Technology **50**: 188-194.
- Vera, C., C. Guerrero, et al. (2011). "Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations." Carbohydrate Research **346**(6): 745-752.
- Vetere, A. and S. Paoletti (1998). "Separation and characterization of three beta-galactosidases from *Bacillus circulans*." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1380**(2): 223-231.
- Walton, G. E., E. G. H. M. v. d. Heuvel, et al. (2012). "A randomised crossover study investigating the effects of galacto-oligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age." British Journal of Nutrition **107**: 1466-1475.
- Wang, B., J. Brand-Miller, et al. (2001). "Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas." American Journal of Clinical Nutrition **74**(4): 510-515.
- Ward, R. E. (2009). "Isolation of Milk Oligosaccharides using Solid-Phase Extraction." Open Glycoscience **2**: 9-15.
- Ward, R. E., M. Ninonuevo, et al. (2007). "*In vitro* fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria." Molecular Nutrition and Food Research **51**: 1398-1405.

- Weiß, J. (2001). Ionenchromatographie. Weinheim, Wiley-Verlag GmbH.
- Wellnitz, J. and M. Gluschke, Eds. (2005). Leitlinien zur Methodvalidierung. Berlin, Umweltbundesamt Berlin.
- Wu, S., R. Grimm, et al. (2011). "Annotation and Structural Analysis of Sialylated Human Milk Oligosaccharides." Journal of Proteome Research **10**: 856-868.
- Wu, S., N. Tao, et al. (2010). "Development of an Annotated Library of Neutral Human Milk Oligosaccharides." Journal of Proteome Research **9**: 4138-4151.
- Yu, Z.-T., C. Chen, et al. (2013). "The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota." Glycobiology **23**(2): 169-177.
- Yu, Z., C. Chen, et al. (2012). "Human Milk Oligosaccharides Affect Growth of Infant Fecal Microbiota *in vitro*." Annual Conference of the Society Glycobiology Conference Abstract: 1461.
- Zenhom, M., A. Hyder, et al. (2011). "Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPAR γ and Peptidoglycan Recognition Protein 3." Journal of Nutrition **141**(5): 971-977.

Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Henle sowie am Max Rubner-Institut in Kiel unter Herrn Prof. Dr. Hans Meisel im Zeitraum von April 2010 bis Januar 2014 angefertigt.

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

Katja Zerge

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Meisel, Institutsleiter der Abteilung „Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch“ des Max Rubner-Instituts in Kiel, und Herrn Prof. Dr. Thomas Henle, Professor für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Dresden, möchte ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses interessanten Themas danken. Ihnen sowie Frau Dr. Clawin-Rädecker, Leiterin der Fachgruppe „Strukturchemische Analytik von Kohlenhydraten und Proteinen“ am Max Rubner-Institut in Kiel, und Herrn Prof. Dr. Peter Chr. Lorenzen, Leiter der Fachgruppe „Nano- und Enzymtechnologie“ am Max Rubner-Institut in Kiel, danke ich herzlichst für die stetige Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und die motivierenden Worte.

Der Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG danke ich für die kooperative Zusammenarbeit. Besonderen Dank gilt Herrn Sebastian Kämpfer, Projektmanager R&D.

Allen Angestellten des Max Rubner-Instituts in Kiel - im Besonderen Frau Enken Jacobsen, Herrn Björn Neumann, Frau Andrea Schwall, Herrn Dr. Adam Wutkowski (Mitarbeiter der Fachgruppe „Strukturchemische Analytik von Kohlenhydraten und Proteinen“), Frau Bozena Grümmer, Frau Angelika Raabe (Mitarbeiterinnen des Sekretariats), Frau Karina Altmann, Frau Maren Böttger, Herrn Ernst Johannsen (Mitarbeiter der Fachgruppe „Nano- und Enzymtechnologie“), Herrn Norbert Johannsen, Frau Angelika Thoß, Frau Cornelia Voß (Mitarbeiter der Fachgruppe „Bewertung und Weiterentwicklung der Technologie verschiedener Milch- und Milchlischprodukte“) und Herrn Nils Rösch (Mitarbeiter am „Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie“) sowie deren Auszubildenden möchte ich für die stetige Unterstützung - sei es bei der Durchführung von Experimenten, Betreuung der Anlagen oder durch hilfreiche Diskussionen bzw. Anmerkungen - danken. Mit Euch hat das Arbeiten im Labor stets viel Spaß gemacht! Vielen Dank für die freundliche, angenehme und hilfsbereite Atmosphäre im Labor!

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Wolfgang Hoffmann, Leiter der Fachgruppe „Bewertung und Weiterentwicklung der Technologie verschiedener Milch- und Milchlischprodukte“ am Max Rubner-Institut in Kiel, und Herrn Prof. Dr. Knut Heller, Institutsleiter der Abteilung „Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie“ des Max Rubner-Instituts in Kiel, für die Betreuung der Nanofiltrationsversuche bzw. der orientierenden Studien zur potentiell bifidogenen Wirkung. Außerdem möchte ich Frau Anna Czabanska, Angestellte am Forschungszentrum Borstel, für die Durchführung und Auswertung der NMR-Analyse danken.

Des Weiteren möchte ich denen danken, die diverse Milchproben für meine Arbeit bereitgestellt haben.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Jessica Malinowski, die diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen ist und mir stets mit kritischen Anmerkungen zur Seite stand. Danke für die vielen schönen Stunden im Büro, im Labor und außerhalb der Arbeitszeit!

Vielen Dank an all meine Freunde und meine Familie, die mich auf diesen Weg immer unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jörg. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!