

Jahresbericht 2003

Inhaltsverzeichnis

Struktur und Funktion niedermolekularer Lebensmittelinhaltsstoffe

- Aroma und Geschmack (Genusswert) als Qualitätsparameter
 - Klärung von Reaktionswegen zu Maillard-typischen Aromastoffen durch "Carbon Modul Labeling"
 - Zur Rolle von Mehlen und der Sauerteigfermentation als Aromastoffquelle in Weizenbrot
 - Einfluss des Kochprozesses sowie der Hopfengabe auf wichtige Aromastoffe in Bierwürze
 - Zur Rolle von 3-Methyl-2-buten-1-thiol im Bieraroma
 - Der Einfluss von menschlichem Speichel auf Aromastoffe
 - Untersuchungen zur retronasalen Wahrnehmung von Espresso-Aroma
 - Charakterisierung der am bitteren Fehlgeschmack von Karotten und Karottenprodukten beteiligten Inhaltsstoffe
 - Aktivitätsorientierte Identifizierung eines Süßgeschmack-Verstärkers aus der Maillard-Reaktion mittels vergleichender Geschmacksverdünnungsanalyse
- Techno-funktionelle Eigenschaften
 - Struktur-Funktionsbeziehungen von Emulgatoren bei der Schokoladeherstellung
 - Funktionelle Eigenschaften von Pentosanen aus Roggen und Weizen

Entwicklung spezieller Analysenverfahren

- Schnellmethode zur simultanen Bestimmung von (R)- und (S)-Linalool in Bier über Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kombination mit einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) und ihre Anwendung zum Nachweis von Veränderungen bei der Lagerung von Bier
- Entwicklung einer selektiven Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Acrylamid
- Spezifische und empfindliche Quantifizierung von Folatvitameren in Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalysen
- Quantifizierung von Pantothenäure durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse und Detektion mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
- Analytik von Phospholipidklassen in Lecithinen

Struktur/Wirkungsbeziehungen bei Biopolymeren

- Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Weizenkleber

- [Untersuchung hochmolekularer Glutelinaggregate von transgenem Roggen mit HMW-Untereinheiten des Weizens](#)
- [Untersuchung von Partialsequenzen in \$\gamma\$ -40k-Secalinen von Roggen](#)
- [Untersuchungen zur hitzebedingten Aggregation von Milchproteinen über Disulfidbindungen](#)

Physiologie

- [In vitro Studien zum Einfluss von wässrigen Malzextrakten mit unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen auf die Aktivität von Biotransformationsenzymen in intestinalen Caco-2 Zellen](#)
- [Pronyl-Lysin eine antioxidativ und chemopräventiv wirksame Verbindung in Brotkruste](#)
- [RAGE-vermittelte MAPK-Aktivierung durch nicht-enzymatisch gebildete Glycolisierungsprodukte \(Maillard-Reaktionsprodukte\) und durch N-Methyl-pyridin, ein bei der Röstung von Kaffee entstehendes Produkt, das nicht im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildet wird](#)
- [Expression des Biotransformationsenzym GST nach Aufnahme von N \$\epsilon\$ -Carboxymethyllysin in der Ratte](#)
- [Zöliakiespezifische immunologische Untersuchung von Peptiden aus \$\alpha\$ -Gliadinen](#)

Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln

Zusammenfassungen

1. STRUKTUR UND FUNKTION NIEDERMOLEKULARER LEBENSMITTELINHALTSSTOFFE

1.1. Aroma und Geschmack (Genusswert) als Qualitätsparameter

1.1.1. Klärung von Reaktionswegen zu Maillard-typischen Aromastoffen durch "Carbon Modul Labeling"

Ausgangslage: Die Reaktion zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und Amino-Verbindungen, bekannt als Maillard-Reaktion, spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung typischer Aromen von Brot, Fleisch, Kaffee und anderen thermisch behandelten Lebensmitteln. Während in den vergangenen zwei Jahrzehnten die wichtigsten Geruchsstoffe in den o.g. Lebensmitteln auf der Basis sog. Geruchsaktivitäts-Screening-Verfahren geklärt werden konnten, sind Kenntnisse über die Bildung wichtiger Aromastoffe, z.B. 2-Furfurylthiol oder 2-Methyl-3-furanthiol, bei Koch-, Brat- oder Backprozessen noch lückenhaft. Solche Erkenntnisse könnten allerdings zur gezielten Optimierung bestimmter Aromen aus den natürlich im Lebensmittel vorliegenden, geruchlosen Aromavorstufen genutzt werden.

Forschungsziel: Klärung und Quantifizierung der Bildungswege wichtiger Aromastoffe aus der Maillard-Reaktion durch "Carbon-Modul-Labeling".

Ergebnis: Die Bildung transienter Intermediate aus biochemischen Vorstufen und deren nachfolgender Einbau in stabile Endprodukte kann durch Markierungsversuche mit

Gemischen aus ^{13}C -markierten und unmarkierten Edukten in Verbindung mit ^{13}C -NMR-Experimenten geklärt werden. Wichtig ist, dass es dabei zum Einbau markierter und unmarkierter Intermediate kommt, der statistischen Regeln unterliegt. Im Rahmen unserer Studien konnten wir zeigen, dass diese Vorgehensweise sehr geeignet ist, um die Bildungswege von Spurenaromastoffen aus der Maillard-Reaktion aufzuzeigen. Neben einer Bestätigung bekannter Bildungsmechanismen, z.B. zu Pyrazinen, konnte erstmals gezeigt werden, dass das intensiv butterartig riechende 2,3-Butandion im Wesentlichen aus der Reaktion der Intermediate Formaldehyd und Hydroxypropanon hervorgeht. Die in der Literatur vermutete Bildung des Aromastoffes durch direkte Retro-Aldolspaltung aus Kohlenhydraten erfolgt hingegen nicht.

Index

1.1.2. Zur Rolle von Mehlen und der Sauerteigfermentation als Aromastoffquelle in Weizenbrot

Ausgangslage: Produkte auf Weizenbasis zeichnen sich durch eine hohe Qualität aus, die insbesondere auf das attraktive Aroma zurückzuführen ist. Untersuchungen zur Objektivierung des Aromas von Weizenbrotkrumen und -krusten haben gezeigt, dass nur eine geringe Anzahl an wertgebenden Aromastoffen für die Aromen verantwortlich sind und dass der Backprozess sowie die Stoffwechsellistung von Hefen bedeutende Faktoren für die Bildung der Schlüsselaromastoffe sind. Bisher ist es jedoch unklar, ob bereits in Weizenmehlen wertgebende Aromastoffe der Brotkrumen und -krusten vorliegen und ob und in welchem Umfang Milchsäurebakterien Einfluss auf die Zusammensetzung der geruchsaktiven Verbindungen während der Teigbereitung haben.

Forschungsziel: Identifizierung wertgebender Aromastoffe in Weizenmehlen sowie daraus hergestellten Sauerteigen und exakte Bilanzierung der Konzentrationsänderungen der Schlüsselaromastoffe, die durch eine Fermentation bedingt sind.

Ergebnis: Durch Anwendung der Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA) und der Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIDA) wurden in Vollkornmehl und Mehl der Type 550, die beide aus der gleichen Charge hergestellt wurden, 21 geruchsaktive Verbindungen, darunter (E)-2-Nonenal, (E,Z)- and (E,E)-2,4-Decadienal, (E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone und Vanillin als intensivste Verbindungen, identifiziert und die meisten Aromastoffe quantifiziert. Eine Reihe dieser Verbindungen wurde bereits als wesentliche Aromastoffe von Weizenbrotkrumen und -krusten erkannt, weshalb gefolgert werden kann, dass Weizenmehle eine Aromastoffbasis für das resultierende Brotaroma bilden. Signifikante Unterschiede im Gesamtaroma beider Mehle konnten allein auf Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung der Aromastoffe zurückgeführt werden. In einem Sauerteig, der aus dem untersuchten Vollkornmehl durch Fermentation mit einem Starter aus Milchsäurebakterien hergestellt wurde, wurde mit Ausnahme von Essigsäure durch Anwendung der AEVA das gleiche Aromastoffspektrum wie im Mehl gefunden. Eine Bilanzierung der Aromastoffgehalte in Vollkornmehl und dem Starter (vor der Fermentation) und im Sauerteig (nach der Fermentation) durch SIDA belegte, dass die Mikroorganismen aufgrund ihrer spezifischen Stoffwechsellistungen gezielt Aromastoffe bilden bzw. abbauen und so Einfluss auf die Aromastoffbasis von Weizenbrot nehmen. Die Ergebnisse belegen deutlich, dass der Mehltyp und der Einsatz ausgewählter Milchsäurebakterienstämme wichtige Faktoren sind, mit denen die Aromaqualität von Weizenbrot verändert und verbessert werden kann.

Index

1.1.3. Einfluss des Kochprozesses sowie der Hopfengabe auf wichtige Aromastoffe in Bierwürze

Ausgangslage: Als biotechnologischer Mehrstufenprozess, der weltweit auf verschiedenen Rezepturen beruht, sind bei der Herstellung von Bier zahlreiche Einflüsse auf das Aroma des Endproduktes Bier denkbar. In früheren Untersuchungen konnten wir durch Anwendung von "molekularer Sensorik" (Aromaextraktverdünnungsanalyse, Odor Activity Konzept) die Schlüsselaromastoffe in hellem Vollbier sowie auch in einer Hopfensorte identifizieren. Systematische Untersuchungen über Veränderungen in wichtigen Aromastoffen bei einzelnen Stufen der Bierherstellung, insbesondere der Würzekochung, fehlen allerdings bisher.

Forschungsziel: Im Rahmen unseres Forschungskonzeptes "Klärung qualitätsbeeinflussender, molekularer Veränderungen - Vom Rohstoff zum Produkt" sollte zunächst der Einfluss des Kochprozesses auf die Aromastoffe in nicht-gehopfter Vorderwürze (filtrierte Maische) untersucht werden. In weiteren Studien sollte dann der Einfluss einer frühen (vor der Kochung) und einer späten Hopfengabe (Whirlpool-Hopfung) auf Aromaveränderungen in der Würze untersucht werden.

Ergebnis: Durch Anwendung der Aromaextraktverdünnungsanalyse auf ungehopfte, ungekochte Würze (W OH/UC) konnten darin 15 geruchsaktive Verbindungen identifiziert werden, unter denen die Strecker-Aldehyde Methional (gekochte Kartoffel), 3-Methylbutanal (malzartig) und 2-Phenylacetaldehyd (honigartig) neben dem grün, grasig riechenden Hexanal, dem vanilleartig riechenden Vanillin sowie den beiden karamellartig, maggi-artig riechenden Aromastoffen Furaneol und Sotolon die höchsten Geruchsaktivitäten aufwiesen. Der anschließende Kochprozess der ungehopften Würze (W OH/C; 75 min) führte nicht zu einem Anstieg von bestimmten Aromastoffen, vielmehr sanken insbesondere die Flavor Dilution (FD) Faktoren von 3-Methylbutanal und Hexanal. Eine frühe Hopfengabe vor dem Würzekochprozess (W EH/C) ließ die FD-Faktoren von Linalool (blumig), 3-Methyl-2-buten-1-thiol (schweflig) und Myrcen (nach Geranie) nach dem Kochen der Würze im Vergleich zu W OH/C ansteigen, ansonsten veränderten sich aber die weiteren Aromastoffe nicht signifikant. Bei einer späteren Hopfengabe nach dem Kochprozess (W LH/C) zeigte sich der gleiche Effekt, allerdings stieg insbesondere Linalool in der Geruchsintensität im Vergleich zur früh gehopften, gekochten Würze (W EH/C) an. Neben drastischen Verlusten an Hopfenaromastoffen durch den Kochprozess bei früher Hopfung führte die Erhitzung solcher Würzen auch zu einer partiellen Racemisierung des im Hopfen vorliegenden (R)-Linalools in das weniger geruchsaktive (S)-Linalool.

Index

1.1.4. Zur Rolle von 3-Methyl-2-buten-1-thiol im Bieraroma

Ausgangslage: Das typische Aroma von hellem Bier unterliegt relativ rasch einer Veränderung bei der Lagerung, bis hin zur Ausbildung von Fehleraromen. Für den typischen "Lichtgeschmack", der bereits nach geringer Tageslicht-Exposition des Bieres auftritt, wird insbesondere das intensiv schweflig riechende 3-Methyl-2-buten-1-thiol (MBT) verantwortlich gemacht. Eine Korrelation quantitativer Daten mit sensorischer Bewertung fehlt allerdings bisher in der Literatur.

Forschungsziel: Klärung der Rolle von MBT im Aroma von Bier.

Ergebnis: Ein kommerzielles Pilsner Bier, das in Grünflaschen gehandelt wird, wurde unter Stickstoff in Weißglasflaschen umgefüllt und 60 h dem diffusen Tageslicht ausgesetzt. Durch Anwendung einer Aromaextraktverdünnungsanalyse auf den Extrakt flüchtiger Verbindungen aus dem belichteten Bier konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Aromaintensität von MBT (ausgedrückt als Flavor Dilution Faktor) sowie die Intensitäten von Methional und Phenylacetaldehyd durch die Belichtung im Vergleich zum unbelichteten Bier gesteigert wurden. Quantitative Messungen zeigten weiterhin, dass bereits unbelichtete Biere, die in Grünflaschen gehandelt werden, deutliche Mengen von MBT enthalten, die deutlich über dessen "Durchbruchsschwelle" vorliegen (0,03 µg/L Bier). Durch sensorische Versuche konnte geklärt werden, dass Konzentrationen von MBT bis hin zu 0,3 µg/L als typisch empfunden werden. Fehleraromen wurden erst bei höheren Mengen detektiert. In ersten Studien zu Vorstufen des MBT konnte die bereits in der älteren Literatur beschriebene Bedeutung von Cystein und Isohumulon als Präkursoren bestätigt werden, wohingegen der in der Literatur beschriebene Einfluss von Riboflavin auf die Bildung des MBT weniger signifikant war.

[Index](#)

1.1.5. Der Einfluss von menschlichem Speichel auf Aromastoffe

Ausgangslage: Die Intensität und Persistenz der retronasalen Wahrnehmung von Geruchsstoffen weist mitunter signifikante Unterschiede auf, deren Ursachen bislang nicht geklärt sind.

Forschungsziel: Klärung des Einflusses von Speichelinhaltsstoffen auf die Stabilität von Aromastoffen.

Ergebnis: An ausgewählten potenten Aromastoffen wurde gezeigt, dass zum Teil signifikante metabolische Umsetzungen in Kontakt mit Speichel auftreten. So wurden in Aromamodellsystemen Thiole zu den korrespondierenden Disulfiden oxidiert, Ester hydrolysiert und Aldehyde zu den jeweiligen Alkoholen reduziert, wohingegen andere Substanzen wie Alkylmethoxy-pyrazine keinerlei Abbaureaktionen zeigten.

[Index](#)

1.1.6. Untersuchungen zur retronasalen Wahrnehmung von Espresso-Aroma

Ausgangslage: Trotz umfangreicher Untersuchungen zum Thema Kaffee ist bislang wenig über die geruchsaktiven Verbindungen in Espresso bekannt. Darüberhinaus stellt die retronasale Wahrnehmung eine Schlüsselempfindung beim Genuss von Espresso dar. Parameter, die diese Form der Wahrnehmung während des Espresso-Konsums beeinflussen, insbesondere den sehr langanhaltenden Nachgeschmack, sind bisher jedoch noch größtenteils unklar.

Forschungsziel: Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses physiologischer Faktoren auf die Entwicklung und Persistenz des nach dem Verzehr von Espresso verbleibenden "afterodor". Zweiten Schwerpunkt bildet die Aufklärung der Auswirkungen nichtflüchtiger Espresso-Inhaltsstoffe oder Zusätze wie z.B. Milch auf die Persistenz aromarelevanter Espresso-Komponenten im Atem.

Ergebnis: Mittels gaschromatographisch-olfaktometrischer Methoden wurden die Schlüsselaromastoffe aus Espresso analysiert und größtenteils identifiziert. Ergänzend wurden

mit Hilfe der EXOM-Technik die potenten Geruchsstoffe aufgeklärt, die aus der Nase während des Konsums ausgeatmet werden und somit auf ihrem Weg durch die Nasenhöhle auch in Wechselwirkung mit dem Riechepithel treten können. Quantifizierung dieser Substanzen in der Luft nach Konsum von Espresso mit und ohne Milchzusatz zeigte signifikante Konzentrationsunterschiede auf, die nicht nur mit einer geringeren momentanen Aromaintensität in Korrelation gebracht werden konnten, sondern auch mit einer stark verkürzten Aromapersistenz.

[Index](#)

1.1.7. Charakterisierung der am bitteren Fehlgeschmack von Karotten und Karottenprodukten beteiligten Inhaltsstoffe

Ausgangslage: Bei den Herstellern von Babynahrung stellen Karottenprodukte ein Schlüsselprodukt mit erheblichem Produktions- und Umsatzvolumen dar. Häufig hat jedoch ein sporadisch auftretender Bittergeschmack dieser Produkte Verbraucher-reklamationen zur Folge. Trotz der Vielzahl an Literaturarbeiten konnte bisher für keine Verbindung eine Korrelation zwischen sensorischer Bewertung bitter schmeckender Karotten und den Ergebnissen der instrumentellen Analytik aufgezeigt werden. Es muss daher angenommen werden, dass bislang unbekannte Komponenten eine Schlüsselrolle als Verursacher des Bittergeschmacks in Karotten spielen. Die Kenntnis dieser Bitterstoffe ist jedoch notwendig, um die Ursachen des Fehlgeschmacks gezielt beheben zu können.

Forschungsziel: Ziel des Vorhabens war die den Bittergeschmack von Karotten(produkten) maßgeblich prägenden Verbindungen zu identifizieren und in quantitativen Studien deren Beitrag zur Bitterkeit von Karottenprodukten zu ermitteln.

Ergebnis: Durch die Kombination instrumentell-analytischer Techniken mit sensorischen Methoden ist es erstmals gelungen die drei Bisacetylene [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol, [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol und [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol als bitter schmeckende Verbindungen in Karottenprodukten zu identifizieren. Auf der Basis einer Dosis/Wirkungs-Korrelation konnte gezeigt werden, dass - nicht wie bisher in der Literatur vermutet - das 6-Methoxymellein, sondern das [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol eine der für die Bitterkeit von Karottenprodukten ursächlich verantwortlichen Schlüsselverbindungen darstellt. Mit der Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur raschen simultanen Quantifizierung der bitteren Bisacetylene steht nun ein Verfahren zur Verfügung, das durch die Bestimmung des Gehalts an [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol die objektive Messung des Bittergeschmacks von Karotten(produkten) ermöglicht.

[Index](#)

1.1.8. Aktivitätsorientierte Identifizierung eines Süßgeschmack-Verstärkers aus der Maillard-Reaktion mittels vergleichender Geschmacksverdünnungsanalyse

Ausgangslage: Bislang existieren kaum Literaturkenntnisse über die Bildung von nicht-flüchtigen Geschmacksmodulatoren bei der Lebensmittelverarbeitung. Informationen zur Struktur und sensorischen Aktivität solcher Verbindungen würden es ermöglichen die Geschmacksqualität von Lebensmitteln gezielt zu verbessern.

Forschungsziel: Ziel des Vorhabens war es unter Anwendung von Geschmacksverdünnungstechniken auf erhitzte Kohlenhydrat/Aminosäure-Lösungen Maillard-Reaktionsprodukte zu identifizieren, die den Süßgeschmack von Zuckern verstärken können.

Ergebnis: Die Anwendung eines neuen Screeningverfahrens, die sog. vergleichende Geschmacksverdünnungsanalyse (vGVA) auf eine erhitzte Glucose/Alanin-Lösung führte zur Entdeckung eines süßgeschmackverstärkenden Maillardreaktions-Produktes. Nach Isolierung und LC/MS- bzw. 1D- und 2D-NMR-Untersuchungen sowie Synthese konnte die Struktur dieses Geschmacksverstärkers als das innere Salz des N-(1-Carboxyethyl)-6-hydroxymethylpyridinium-3-ols geklärt werden. Diese bislang nicht beschriebene Verbindung, das sog. Alapyridain, weist selbst keinen Eigengeschmack auf, ist jedoch in der Lage den Schwellenwert verschiedener Zucker und Süßstoffe signifikant zu erniedrigen. Studien zum Einfluss der Stereochemie auf die physiologische Aktivität des Geschmacksverstärkers ergaben weiterhin, dass ausschließlich das (+)-(S)-Alapyridain die aktive Wirkform darstellt, während für das (-)-(R)-Enantiomere kein Einfluss auf die Süßwahrnehmung von Zuckern festgestellt werden konnte.

[Index](#)

1.2. Techno-funktionelle Eigenschaften

1.2.1. Struktur-Funktionsbeziehungen von Emulgatoren bei der Schokoladeherstellung

Ausgangslage: Effekte kommerzieller Emulgatorpräparationen wie Polyglycerin-Polyricinoleat (PGPR) zur Veränderung der Produkteigenschaften von Schokolade sind umfassend geklärt worden. Die Präparationen sind aber häufig relativ komplex zusammengesetzt, wobei über die Wirkung von Einzelkomponenten bisher noch nichts bekannt ist. Es ist daher auch nicht möglich, die beobachteten physikalischen Effekte auf definierte chemische Strukturen zurückzuführen und somit einerseits Einsatzparameter für Emulgatoren sowie andererseits die Emulgatorstruktur zu optimieren.

Forschungsziel: Es sollten Beziehungen zwischen der chemischen Struktur und den technologischen Eigenschaften von PGPR bei der Schokoladeherstellung durch Verwendung definierter Substanzen oder Substanzklassen erarbeitet werden.

Ergebnis: Die fließgrenzensenkende Wirkung von PGPR auf die Schokoladenmasse wurde an einem Stressrheometer mit Platte-Platte-Messanordnung bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt. Dabei wurde auch nachgewiesen, dass Gemische aus PGPR und Lecithin eine bessere Wirkung zeigen als die beiden Emulgatoren alleine. Um für rheologische Untersuchungen ausreichend Material an PGPR-Fractionen und -Komponenten zu isolieren, wurde PGPR mit n-Hexan/Methanol extraktiv und säulen-chromatographisch fraktioniert. Die rheologischen Experimente führten zu dem bemerkenswerten Ergebnis, dass PGPR sowohl apolare als auch polare Komponenten enthält, die gleichermaßen die Fließgrenze von Schokoladenmasse deutlich erniedrigen können. Die einfachen PGPR-Verbindungen 1-Monoricinolein, 1-Diricinolein und 1-Triricinolein wurden synthetisiert, um den Einfluss der Ricinolsäurekettenlänge auf das Fließverhalten von Schokolade zu untersuchen. Um den Einfluss des polaren Anteils der Polyglycerine zu untersuchen, wurden Glycerin, Diglycerin bzw. Triglycerin mit Ricinolsäure oder mit polykondensierter Ricinolsäure verestert, z.T. wurde mit Stearinsäure nachverestert. Einen positiven Einfluss auf das Fließverhalten von Schokoladenmasse besaß sowohl die Länge der Ricinolsäurekette als auch der Polykondensationsgrad von Glycerin. Eine Verlängerung von einer auf drei

Ricinolsäureeinheiten der synthetisierten Monoacylglyceride ließ die Fließgrenze sinken. Dies war auch bei Verwendung der höheren Glycerinohomologe Diglycerin und Triglycerin zu beobachten. Einen großen Einfluss besaßen die Nebenfettsäuren von Ricinusöl, die die Ricinolsäurekette terminieren und eine Art Hydrophobisierung des gesamten Moleküls erreichen können. Bei diesen Verbindungen wurde eine positive Wirkung auf das Fließverhalten von Schokolade festgestellt.

[Index](#)

1.2.2. Funktionelle Eigenschaften von Pentosanen aus Roggen und Weizen

Ausgangslage: Pentosane sind wichtige Strukturmerkmale der Zellwände von Getreide. Sie sind wichtig für die technologischen Eigenschaften von Getreidemehlen bei der Herstellung von Brot. Die Grundstruktur der Pentosane ist bekannt, es gibt jedoch nur wenige Hinweise über Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Brotherstellung.

Forschungsziel: Es sollten Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Pentosanen etabliert werden, außerdem sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen von Pentosanen bei der Brotherstellung aufgeklärt werden.

Ergebnis: Es gelang die Isolierung von Pentosanen aus vier Weizen- und vier Roggensorten sowie deren Charakterisierung bezüglich ihrer Kohlenhydratzusammensetzung. Die ermittelten Kohlenhydratzusammensetzungen der wasserlöslichen Pentosane nach saurer Hydrolyse entsprachen den erwarteten Werten aus der Literatur. Die vier Weizen- und vier Roggensorten zeigten untereinander jeweils keine signifikanten Unterschiede in der Kohlenhydratzusammensetzung. Die Weizenpentosane unterschieden sich von den Roggenpentosanen in ihrem wesentlich höheren Gehalt an Galactose. Weizenpentosane enthielten zwischen 13 " 16 % (m/m) Galactose, Roggen-pentosane nur zwischen 1 " 2 % (m/m). Die Fraktionierung der wasserlöslichen Pentosane in Arabinoxylane und Arabinogalaktane durch partielle Fällung in ethanolischer Lösung gelang problemlos, ebenso wie die Charakterisierung ihrer Kohlenhydrat-zusammensetzung. Die Untersuchung des Gehalts an estergebundener Ferulasäure in den untersuchten Polysacchariden erfolgte nach alkalischer Hydrolyse mittels HPLC und UV-Detektion bei 310 nm. Um auch den Gehalt an Diferulasäuren bestimmen zu können, wurden vier Diferulasäuren synthetisiert und als Standard eingesetzt. Alle synthetisierten Diferulasäuren konnten in den Getreideproben nachgewiesen und bestimmt werden. Der Dimerisierungsgrad der Ferulasäure wurde ausgehend vom Mehl im Verlauf der Brotherstellung bestimmt. Weder bei der Weizen- noch bei der Roggenbrotherstellung war eine messbare Zunahme des Dimerisierungsgrades zu verzeichnen. Bei der Herstellung von Weizen- und Roggenbrot wurde außerdem die Molekulargewichtsverteilung untersucht. Dabei zeigten sich große Unterschiede zwischen Proben aus Mehl, Teig und Brot. Alle Proben zeigten jedoch vier charakteristische Fraktionen im Gelchromatogramm, deren Peakmaxima immer die gleiche Retentionszeit aufwiesen, wobei die hoch-molekulare Fraktion im Brot den höchsten Gehalt aufwies. Nur zwei dieser Fraktionen zeigten eine UV-Absorption bei 310 nm, woraus gefolgert werden kann, dass nur in diesen Fraktionen Ferulasäure und Ferulasäure-Dimere vorliegen können. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass sich der Dimerisierungsgrad der Ferulasäure bzgl. der Bildung von Diferulasäure während der Brotzubereitung nicht signifikant ändert, muss die Bildung von höhermolekularen Pentosanen während der Brotzubereitung auf andere Effekte zurückgeführt werden.

[Index](#)

2. ENTWICKLUNG SPEZIELLER ANALYSENVERFAHREN

2.1. Schnellmethode zur simultanen Bestimmung von (R)- und (S)-Linalool in Bier über Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kombination mit einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) und ihre Anwendung zum Nachweis von Veränderungen bei der Lagerung von Bier

Ausgangslage: Hopfen ist eine der wesentlichen Zutaten bei der Bierherstellung. Mit seinen Bitterstoffen beeinflusst er wesentlich den Geschmack und die Haltbarkeit des Bieres. Daneben bewirkt das aus dem Hopfen stammende (R)-Linalool im Bier eine charakteristische, angenehme Hopfenaromanote. Die Konzentration von (R)-Linalool stellt damit einen wesentlichen Qualitätsparameter hopfenaromatischer Biere dar. Bisher fehlte eine schnelle und trotzdem genau Analysenmethode, die die selektive Bestimmung des (R)-Linaloolgehalts, insbesondere bei Anwesenheit des wesentlich weniger geruchsaktiven (S)-Isomers, in Bier erlaubt.

Forschungsziel: 1) Entwicklung einer Schnellmethode zur simultanen Bestimmung von (R)- und (S)-Linalool in Bier. 2) Untersuchung der Stabilität des für das Hopfenaroma von Bier verantwortlichen (R)-Linalools bei der Lagerung von Bier.

Ergebnis: Zur simultanen Quantifizierung von (R)- und (S)-Linalool wurde eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse entwickelt. Dazu wurde zweifach deuteriummarkiertes, racemisches Linalool synthetisiert und als interner Standard verwendet. Zur Isolierung und Anreicherung der Zielverbindung aus Bier wurde die Festphasenmikroextraktion (SPME) eingesetzt. Verglichen mit der zeitaufwändigeren Isolierung über Lösungsmittelextraktion und anschließender Destillation im Hochvakuum führte die SPME-Anreicherung zum gleichen Ergebnis in deutlich kürzerer Zeit. Durch die Kombination mit der Stabilisotopenverdünnungsanalyse lieferte die SPME-Methode exakte Daten unabhängig von sonst kritischen Probenahmeparametern wie Expositionszeit und Ionenstärke der Probe. Die Analyse von fünf unterschiedlichen Bieren ergab deutliche Unterschiede sowohl beim Gehalt als auch bei der Enantiomerenverteilung von Linalool. Die Lagerung der Biere über 12 Monate beeinflusste die Gesamtkonzentration an Linalool jeweils nicht, führte jedoch zu einem Verlust an (R)-Linalool zugunsten des (S)-Enantiomeren. Modellversuche zeigten, dass die Racemisierung bei der Lagerung wesentlich durch den pH-Wert des Bieres beeinflusst wird.

[Index](#)

2.2. Entwicklung einer selektiven Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Acrylamid

Ausgangslage: Acrylamid (AA) wurde kürzlich als sog. "food-born toxicant" erkannt. Zur Quantifizierung von AA ist eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse, insbesondere in Kombination mit Triple Quad-Massenspektrometern derzeit die Methode der Wahl. Der hohe Preis solcher Geräte sowie die Tatsache, dass aufgrund der Molmasse (m/z 71) sowie des Fragmentierungsmusters von AA insbesondere bei GC/MS-Bestimmungen keine hohe Selektivität zu erwarten ist, macht die Entwicklung selektiver und kostengünstiger Bestimmungsmethoden erforderlich.

Forschungsziel: Entwicklung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse in Kombination mit einer AA-Derivatisierung zur Erhöhung der Selektivität und Messempfindlichkeit bei "single stage"-LC/MS-Messungen.

Ergebnis: Durch Umsetzung verschiedener aromatischer Thiole mit AA, die zusätzlich eine Carboxylfunktion enthielten, konnte 2-Mercaptobenzoessäure als geeignetes Derivatisierungsreagenz ermittelt werden. Unter Verwendung von $^{13}\text{C}_3$ -AA als internem Standard wurde unter Nutzung der o.g. Derivatisierungsreaktion eine neue Stabilisotopenverdünnungsanalyse entwickelt, die eine selektive Bestimmung unter Verwendung eines preiswerteren single stage LC/MS-Gerätes erlaubt. Im Vergleich der neuen Methode mit zwei anderen Verfahren, die auf der GC/MS-Bestimmung beruhen, konnten am Beispiel von Kartoffelchips, Butterkeksen und Knäckebrot annähernd identische Konzentrationen ermittelt werden. Auch die Detektions- und Bestimmungsgrenzen lagen mit $6,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $16,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ für das Derivatisierungs-verfahren in der gleichen Größenordnung. Durch Anwendung der Methode auf Knäckebrot, das vor der Messung mit α -Amylase und Protease behandelt wurde, konnte kein Anstieg von AA gefunden werden, so dass ein Einschluss des potentiellen Cancerogens in Stärke/Proteingele beim Backen unwahrscheinlich ist.

[Index](#)

2.3. Spezifische und empfindliche Quantifizierung von Folatvitameren in Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalysen

Ausgangslage: Die Literaturdaten zu Folatgehalten in Lebensmitteln müssen in Frage gestellt werden, da die bisher verfügbaren Methoden (mikrobiologischer Assay bzw. HPLC mit Fluoreszenzdetektion) hinsichtlich Spezifität und Wiederfindung deutliche Mängel aufweisen. Sichere Gehaltsangaben sind aber von grosser Bedeutung, da ein Folatmangel Neuralrohrdefekte, Arteriosklerose und Krebs verursachen kann.

Forschungsziel: Es soll eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung der Vitamine der Folsäuregruppe entwickelt werden.

Ergebnis: Die Eignung der kürzlich synthetisierten, deuterierten Vitamere $[2\text{H}_4]$ -Folsäure $[2\text{H}_4]$ -Tetrahydrofolat, $[2\text{H}_4]$ -5-Formyltetrahydrofolat, $[2\text{H}_4]$ -5-Methyltetrahydrofolat und $[2\text{H}_4]$ -10-Formylfolat als interne Standards wurde gezeigt. Die Folate und ihre markierten Analoga konnten durch HPLC-Tandemmassenspektrometrie nachgewiesen werden, wobei gebundene Folate und Polyglutamatvitamere nach Inkubation mit Amylase, Protease und Rattenserumkonjugase erfasst wurden. Die Nachweisgrenzen für 5-Methyltetrahydrofolat, 5-Formyltetrahydrofolat, Tetrahydrofolat, 10-Formylfolat und Folsäure betragen $0,5$, $1,2$, $1,5$, $0,6$ and $2,6 \mu\text{g}/100\text{g}$. Die in Fleisch, Getreide und Gemüse gefundenen Folatgehalte stimmten gut mit Literaturdaten überein, mit Ausnahme von Brokkoli, in dem deutlich niedrigere Gehalte festgestellt wurden.

[Index](#)

2.4. Quantifizierung von Pantothensäure durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse und Detektion mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Ausgangslage: Die bereits beschriebene Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung der Pantothensäure unter Einsatz von $[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ -Pantothensäure als internem Standard

erfordert aufgrund der abschliessenden Detektion durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie eine Extraktion in Ethylacetat mit nachfolgender Trimethylsilylierung.

Forschungsziel: Es soll eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse entwickelt werden, die eine Detektion der Pantothenensäure durch Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie ermöglicht und die Derivatisierung entbehrlich macht.

Ergebnis: Infolge der effektiven Extraktion in einem wässrigen Puffer und der dreidimensionalen Spezifität der Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie konnte auf weitere Reinigungs- und Derivatisierungsschritte verzichtet und die Analysenzeit für freie Pantothenensäure auf zwei Stunden verkürzt werden. Zur Bestimmung der gesamten Pantothenensäure wurde das Vitamin aus seinen Konjugaten mit Taubenleberpantotheinase und alkalischer Phosphatase freigesetzt. Hinsichtlich der Nachweisgrenzen, Wiederholbarkeit und Wiederfindung erwies sich das neue Verfahren der gaschromatographischen Bestimmung als ebenbürtig. Die neue Methode ergab für Volleipulver, Haselnüsse und Mais ähnliche Werte wie die Literaturdaten, wogegen der bestimmte Gehalt in Champignons und Schweineleber niedriger, der in Kakao höher als der in der Literatur angegebene war.

Index

2.5. Analytik von Phospholipidklassen in Lecithinen

Ausgangslage: Phospholipide wirken aufgrund gemeinsamer typischer Strukturmerkmale als Emulgatoren und beeinflussen das Backverhalten von Weizenteigen. Die backtechnischen Wirkungen des Gesamtproduktes wie auch von angereicherten Lecithinfraktionen sind bekannt. Um zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Phospholipiden bei Backwaren zu kommen, ist eine leistungsfähige Analytik zur Charakterisierung von Rohlecithinen erforderlich.

Forschungsziel: Ziel des Projektes war die Vervollständigung der analytischen Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Lecithinpräparate. Die bereits früher entwickelte Methode der quantitativen Bestimmung von Phospholipiden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) sollte nun mit anderen etablierten quantitativen Bestimmungsmethoden für Phospholipide, wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und ³¹P-Kernresonanzspektrometrie (³¹P-NMR) verglichen werden.

Ergebnis: In 8 kommerziellen Lecithinpräparaten wurden die enthaltenen Phospholipidklassen mit drei unabhängigen Methoden qualitativ und quantitativ bestimmt. Verglichen wurden die DC, die HPLC und die ³¹P-NMR. Zusätzlich wurden die Gesamtphospholipidgehalte über eine photometrische Phosphorbestimmung und die Gesamtgehalte an Aminophospholipiden über eine Stickstoffbestimmung nach Dumas berechnet. Die Gehalte der Phospholipidklassen in den Lecithinpräparaten unterschieden sich in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode, wobei DC und ³¹P-NMR die am besten übereinstimmenden Ergebnisse lieferten. Bei allen Methoden waren jedoch die Verhältnisse der Phospholipidklassen untereinander vergleichbar. Die Methode mit der höchsten Selektivität war die ³¹P-NMR, da neben den Phospholipiden auch die entsprechenden Lysoverbindungen problemlos quantifiziert werden konnten. Allerdings war die Methode auch deutlich unempfindlicher als die DC und insbesondere die HPLC. Die Variationskoeffizienten der Methoden schwankten in Abhängigkeit von der Phospholipidklasse (1 " 29 %), wobei die Bestimmung über DC deutlich bessere Variationskoeffizienten erbrachte als die beiden anderen Methoden. Insgesamt kann für die

quantitative Bestimmung von Phospholipidklassen in Rohlecithinen die ^{31}P -NMR empfohlen werden, da sie schnell und einfach durchzuführen ist. Die DC ist dazu eine gute Alternative, weil sie mit geringem instrumentellem Aufwand durchgeführt werden kann und nur geringfügig unselektiver ist als die ^{31}P -NMR.

Index

3. STRUKTUR/WIRKUNGSBEZIEHUNGEN BEI BIOPOLYMEREN

3.1. Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Weizenkleber

Ausgangslage: Struktur und Eigenschaften von Proteinen werden durch Hochdruckbehandlung nachhaltig verändert. So werden Ei-, Milch-, Fleisch- und Fischproteine unter einem Druck von 300 - 400 MPa schon bei Raumtemperatur denaturiert und können Gele bilden. Über druckinduzierte Effekte auf die Proteine von Weizenkleber liegen jedoch nur wenige Informationen vor.

Forschungsziel: Anhand von rheologischen und proteinanalytischen Untersuchungen soll der Einfluss der Hochdruckbehandlung in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Weizenkleber studiert werden.

Ergebnis: Kleber wurde aus Teigen der Weizenmehle Astron (A-Sorte) und Contra (C-Sorte) ausgewaschen (Feuchtkleber FK) und teilweise gefriergetrocknet (Trockenkleber TK). FK oder rehydratisierter TK wurden in einer Hochdruckanlage druckbehandelt, wobei Druck (0,1 - 800 MPa), Temperatur (30 - 80 °C) und Zeit (5 - 30 min) variiert wurden. Die rheologischen Veränderungen an Kleber wurden durch Zugversuche (Dehnwiderstand, Dehnbarkeit) und die proteinchemischen Veränderungen durch ein kombiniertes Extraktion/HPLC-Verfahren (Gliadin-, Gluteninfraktion) charakterisiert. Der Vergleich von FK mit TK zeigte, dass TK fester und weniger dehnbar war als FK. Da die Druckbehandlung jedoch gleichartige rheologische Effekte hervorrief, wurden sowohl FK als auch TK für weitere Untersuchungen eingesetzt. Eine Druckbehandlung von 200 MPa bei 30 - 38 °C über 30 min machte den FK weicher und dehnbarer, bei Druck- und Temperaturerhöhung wurde er dann fester und weniger dehnbar. Der schwache Kleber von Contra reagierte auf die Druckbehandlung intensiver als der starke Kleber von Astron. Bei hohem Druck und hoher Temperatur (z.B. 600 MPa, 60 °C) waren rheologische Messungen nicht mehr möglich, da der FK seine Kohäsivität einbüßte. Innerhalb der gewählten Versuchsparameter war der Einfluss von Druck insgesamt weitaus höher als der Einfluss der Temperatur. Der Zusatz verschiedener Salze zu rehydratisiertem TK ließ ein unterschiedliches Ausmaß der Druckwirkung erkennen. So war der verfestigende Effekt des Drucks nach Zusatz von CaCl_2 stärker ausgeprägt als der von NaCl . Die Quantifizierung der Gliadin- und Gluteninfraktion von gefriergetrocknetem FK ergab, dass bei niedrigem Druck (200 MPa) das Gliadin/Glutenin-Verhältnis anstieg und bei höherem Druck stark abfiel. Dies stand im Einklang mit den rheologischen Veränderungen. Unter extremen Bedingungen (z.B. 800 MPa, 60 °C) nahm der extrahierbare Gliadinanteil von 65,1 % (unbehandelter Kleber) auf 18,9 % ab. Die cysteinhaltigen α - und γ -Gliadine waren von der reduzierten Extrahierbarkeit gleichermaßen betroffen, während die cysteinfreien ω -Gliadine keine Veränderung erfuhren. Dieser Befund und die Tatsache, dass nach Reduktion der Disulfidbindungen die Kleberproteine aller hochdruckbehandelten Proben vollständig in 60%igem Ethanol löslich waren, ließen den Schluss zu, dass höherer Druck hauptsächlich die Umstrukturierung von Disulfidbindungen bewirkte.

Index

3.2. Untersuchung hochmolekularer Glutelinaggregate von transgenem Roggen mit HMW-Untereinheiten des Weizens

Ausgangslage: Aus zahlreichen Arbeiten der Literatur ist bekannt, dass die Menge an hochmolekularem Glutenin, dem sog. Gluteninmakropolymer (GMP), einen wichtigen Faktor für die Backqualität von Weizenmehl darstellt. Entsprechende Untersuchungen an Roggen wurden bisher nicht durchgeführt.

Forschungsziel: Qualitative und quantitative Charakterisierung des GMP von Roggen, wobei eine nicht-transgene Linie mit zwei transgenen Linien, die HMW-Untereinheiten (HMW-UE) 10 bzw. 5+10 von Weizen enthalten, verglichen werden sollen.

Ergebnis: Als Ausgangsmaterial standen Roggenmehle der nicht-transgenen Kontrolle (L22) und der transgenen Linien L26 (HMW-UE 10) und L8 (HMW-UE 5+10) in zwei Formen zur Verfügung: herkömmliches Mehl sowie Mehl, das nach Prüfung der Keimfähigkeit aus vorgekeimten und getrockneten Körnern hergestellt worden war. Die erzielten Ergebnisse für beide Mehlararten waren in der Proteinverteilung nahezu identisch, wobei das Proteinniveau bei den vorgekeimten Mehlen um etwa 10 % niedriger lag. Die Mehle wurden 2 x mit einer gepufferten SDS-Lösung extrahiert; die gefriergetrockneten Extrakte und Rückstände (GMP) wurden mit einer Gluteninextraktionslösung unter reduzierenden Bedingungen in Lösung gebracht und durch RP-HPLC qualitativ und quantitativ analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil des GMP am Gesamtprotein des nicht-transgenen Roggenmehls L26 nur ca. 6 % betrug, was einer Menge von etwa 5 mg/g Mehl entsprach. Damit lag L22 weit unter dem Bereich, der für verschiedene Weizensorten (20 " 37 mg/g) angegeben wird. Durch gentechnische Einführung der HMW-UE 10 von Weizen (L26) wurde der Anteil des GMP auf ca. 22 % entsprechend einer Menge von etwa 20 mg/g gesteigert. Die HMW-UE 5+10 (L8) führte zu einer drastischen Umkehr der Proteinverteilung; der Anteil von GMP stieg auf fast 63 % und dessen Menge auf etwa 60 mg/g. Die Quantifizierung einzelner Proteintypen (ω -, HMW-, γ -75k- und γ -40k-Secaline sowie HMW-UE 5 und 10 von Weizen) ergab, dass am Aufbau der geringen Mengen an GMP von L22 hauptsächlich γ -75k-Secaline beteiligt waren. Im Gegensatz dazu enthielt das GMP von L26 annähernd so viele HMW-Secaline + HMW-UE 10 (HMW-Fraktion) wie γ -75k-Secaline, was darauf schließen lässt, dass HMW-UE 10 die Polymerisation der Speicherproteine vorantrieb. Noch deutlicher fiel der Anstieg der HMW-Fraktion im GMP von L8 aus, wobei die HMW-UE 5 stark dominierte. Die in einer früheren Untersuchung festgestellte schlechte Backfähigkeit von L8 dürfte auf den extrem hohen Anteil an GMP, verbunden mit einem hohen Defizit an nieder-molekularen Aggregaten und Monomeren, zurückzuführen sein.

Index

3.3. Untersuchung von Partialsequenzen in γ -40k-Secalinen von Roggen

Ausgangslage: Obwohl die γ -40k-Secaline die zweitstärkste Proteingruppe innerhalb der Speicherproteine des Roggens ausmachen, sind im Gegensatz zu den Kleberproteinen des Weizens keine Gesamtaminosäuresequenzen bekannt. Bisher bekannte N-terminale Sequenzen, Aminosäurezusammensetzungen und Molmassen geben Hinweise, dass γ -40k-Secaline mit den γ -Gliadinen des Weizens nah verwandt sind, in welchem Ausmaß Homologien in den Aminosäuresequenzen und Disulfidbindungen bestehen, ist jedoch nicht bekannt.

Forschungsziel: Isolierung von Hauptkomponenten des γ -40k-Typs aus Roggenmehl und Aufklärung von Partialsequenzen durch Sequenzierung von Peptiden aus enzymatischen Hydrolysaten.

Ergebnis: Aus der Prolaminfraktion der Roggensorte "Danko" wurden durch zweistufige RP-HPLC zwei mit 4-Vinylpyridin derivatisierte Hauptkomponenten der γ -40k-Secaline (R1, R2) isoliert. Die Proteine wurden in getrennten Ansätzen jeweils mit Trypsin und Thermolysin partiell hydrolysiert und die entstandenen Peptidgemische durch RP-HPLC aufgetrennt. Die gleichzeitige Detektion bei 210 und 254 nm erlaubte einerseits die Erfassung aller Peptide und andererseits die spezifische Erfassung der derivatisierten Cysteinpeptide. Die isolierten Peptide wurden durch Rechromatographie gereinigt, durch Bestimmung von Aminosäuresequenzen und teilweise auch von Molmassen charakterisiert und mit Partialsequenzen von γ -Gliadinen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die N-terminalen Domänen nach tryptischer Hydrolyse weitgehend intakt blieben; sie stimmten mit denjenigen der γ -Gliadine in den Molmassen und der Abwesenheit von Cysteinresten überein. Die meisten aus den tryptischen und thermolytischen Hydrolysaten isolierten Peptide stammten aus den C-terminalen Domänen; sie deckten 83 % (R1) bzw. 77 % (R2) einer aus der Literatur bekannten C-terminalen Domäne von γ -Gliadinen ab. Doppelbesetzungen einzelner Sequenzpositionen wiesen darauf hin, dass die isolierten Proteine nicht einheitlich waren. Unterschiede zwischen R1 und R2 waren auf einige wenige Positionen beschränkt; im Vergleich zu γ -Gliadinen lag in der C-terminalen Domäne eine Homologie von etwa 85 % vor. Alle acht Cysteinreste von γ -Gliadinen wurden auch in R1 und R2 vorgefunden, wobei in der näheren Sequenzumgebung der Cysteinreste keine Unterschiede zwischen R1, R2 und γ -Gliadinen auftraten. Daher kann angenommen werden, dass die Verknüpfungspositionen der vier intramolekularen Disulfidbindungen von γ -Gliadinen und γ -40k-Secalinen ebenfalls homolog sind.

[Index](#)

3.4. Untersuchungen zur hitzebedingten Aggregation von Milchproteinen über Disulfidbindungen

Ausgangslage: Milchproteine bilden bei der Erhitzung Aggregate, die vor allem über Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen aufgebaut werden. Aus hygienischen Gesichtspunkten ist jedoch eine Behandlung der Milch unumgänglich, bevor sie in den Handel gebracht wird. Bei den thermisch induzierten Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen spielt die freie Thiolgruppe im β -Lactoglobulin eine zentrale Rolle. Die Position dieser freien Thiolgruppe ist jedoch umstritten. Außerdem ist nicht bekannt, wie der Thiol/Disulfid-Austauschprozess abläuft und welche Cysteinreste beteiligt sind. Bisher konnten zwar thermisch induzierte Disulfidbindungen zwischen den Molkenproteinen β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin und Rinderserumalbumin nachgewiesen, deren Position jedoch nicht identifiziert werden. Ein eindeutiger Nachweis von thermisch induzierten Disulfidbindungen zwischen den Molkenproteinen und den Caseinen wurde bisher noch nicht erbracht.

Forschungsziel: Ziel der Arbeit war der Nachweis thermisch induzierter Thiolgruppen und Disulfidbindungen in Milchproteinen und die Untersuchung des Ablaufes des Thiol/Disulfid-Austausches.

Ergebnis: Es wurde ein Online-Detektionssystem zum Nachweis von Disulfidbindungen entwickelt, mit dessen Hilfe die nativen Disulfidbindungen der Milchproteine bestimmt wurden und der Ablauf der hitzebedingten Aggregation der Milchproteine über Thiol/

Disulfid-Austauschvorgänge in großen Teilen aufgeklärt werden konnte. Für β -Lactoglobulin wurden im nativen Zustand erstmals zwei Strukturen im Verhältnis 80:20 nachgewiesen, die sich in der Position der freien Thiolgruppe unterschieden. Für die restlichen Milchproteine wurden die bekannten Positionen der Disulfidbindungen bestätigt. Für die hitzebedingte Aggregation der Milchproteine wurde die Entwicklung der Größe der Aggregate mit der Temperatur ermittelt, außerdem wurden Modelle entwickelt, die aufzeigen, dass der Thiol/Disulfidaustausch durch β -Lactoglobulin initiiert wird. Zunächst werden durch Thiol/Disulfid-Austausch mit der nativen Thiolgruppe die Cysteinreste im hydrophilen Teil des Moleküls (in Position 66 und 160) freigesetzt, die durch weiteren Thiol/Disulfid-Austausch mit Disulfidbindungen anderer Moleküle reagieren. Insbesondere wurden Verknüpfungen dieser Thiolgruppen mit α -Lactalbumin nachgewiesen, das nach einer solchen Aktivierung Disulfidbindungen zum κ -Casein ausbilden kann. Eine direkte Reaktion von β -Lactoglobulin mit κ -Casein ist ebenfalls möglich. Damit wurden erstmals hitzeinduzierte Disulfidbindungen zwischen Molkenproteinen und einem Casein experimentell nachgewiesen. Es wurde ferner gezeigt, dass α S2-Casein aus sterischen Gründen nicht am Thiol/Disulfid-Austausch der Milchproteine teilnimmt.

[Index](#)

4. PHYSIOLOGIE

4.1. In vitro Studien zum Einfluss von wässrigen Malzextrakten mit unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen auf die Aktivität von Biotransformationsenzymen in intestinalen Caco-2 Zellen

Ausgangslage: Die physiologische Wirksamkeit von Bräunungsprodukten aus Röstmalz ist bislang unbekannt. Die Aktivierung von fremdstoffmetabolischen Enzymen als Bestandteil der Chemopräventionsmechanismen des Organismus wurde bisher nur für isolierte Maillard-Reaktionsprodukte, wie z. B. N ϵ -Carboxymethyllysin, beschrieben.

Forschungsziel: Aus Röstmalz gewonnene wasserlösliche Extrakte sollten gelchromatographisch aufgetrennt, quantifiziert und auf ihre Wirksamkeit getestet werden, die Aktivität von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in intestinalen Caco-2 Zellen zu beeinflussen.

Ergebnis: Nach Sammlung der gelchromatographisch aufgetrennten, wässrigen Malz-extrakte entsprechend ihres UV-Spektrums bei $\lambda = 300$ nm erfolgte die Quantifizierung. Es zeigte sich, dass 2,3 % der wasserlöslichen Verbindungen ein mittleres Molekulargewicht (MW) zwischen 10 und 30 kDa aufwiesen. Der überwiegende Anteil der wasserlöslichen Verbindungen lag somit in einem Molekulargewichtsbereich von < 30 kDa, wobei 58 % der Verbindungen ein mittleres MW zwischen 60 und 100 kDa, und 32 % ein mittleres MW von > 200 kDa aufwiesen. Nach der Quantifizierung wurden die isolierten Fraktionen für 48 h mit intestinalen Caco-2 Zellen in äquimolaren Konzentrationen inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Ernte der Zellen und anschließend die Bestimmung der katalytischen Aktivitäten der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme NADPH-Cytochrom c-Reduktase (CCR) und Glutathion-S-Transferase (GST). Es zeigte sich, dass die niedermolekularen Verbindungen mit einem mittleren MW von < 10 kDa die Enzymaktivitäten mit einer Erhöhung von +122 % für die CCR und von +33 % für die GST im Vergleich zu nicht-inkubierten Kontrollzellen am effektivsten steigerten. Die Mehrheit der Verbindungen mit mittlerem MW von bis zu 70 kDa zeigte nach Exposition der Caco-2 Zellen einen aktivierenden Effekt auf die CCR-Aktivität, während die GST-Aktivität inhibiert

wurde. Insgesamt wurden somit die niedermolekularen wasserlöslichen Röstmalzverbindungen als die aktivsten identifiziert, die die Enzymaktivitäten der CCR und der GST beeinflussen.

Index

4.2. Pronyl-Lysin eine antioxidativ und chemopräventiv wirksame Verbindung in Brotkruste

Ausgangslage: Die Aktivierung von chemopräventiv-wirksamen Enzymen durch Maillard-Reaktionsprodukte aus Röstmalz wurde bereits beschrieben. Hingegen liegen Untersuchungsergebnisse zur chemopräventiven sowie zur antioxidativen Wirksamkeit einzelner Brotinhaltsstoffe noch nicht vor.

Forschungsziel: Durch die Anwendung von in vitro-Methoden zur Bestimmung der antioxidativen und der chemopräventiven Wirksamkeit sollte untersucht werden, ob Mehl, Brotkrume und Brotkruste sowie daraus isolierte Lösungsmittelfractionen unterschiedliche Effekte zeigen. Um zu überprüfen, ob diese Effekte ebenfalls in einem biologischen System gegeben sind, sollte der Einfluss auf ausgewählte Biotransformationsenzyme in intestinalen Caco-2 Zellen untersucht werden.

Ergebnis: Zur Identifizierung der antioxidativ und chemopräventiv wirksamen Schlüsselverbindungen in Brotkruste wurden zunächst Modellmischungen aus Kohlenhydraten und Aminosäuren erhitzt und auf ihre antioxidative Wirksamkeit getestet. Nach Strukturidentifikation der wirksamsten Verbindungen konnte gezeigt werden, dass zwei aus der Reaktion zwischen Acetylformoin und (a) N α -Acetyl-L-Lysinmethylester oder (b) Glycinmethylester entstehende Pyrrolinonreduktone die wirksamsten Verbindungen darstellen. Die Quantifizierung von an Protein gebundenem Pyrrolinon-Reduktonyl-Lysin, abgekürzt als Pronyl-Lysin, ergab hohe Gehalte in der Brotkruste (62.2 mg/kg), niedrige Gehalte in der Brotkrume (8.0 mg/kg), während im Mehl kein Pronyl-Lysin nachweisbar war. Die Exposition von Caco-2 Zellen mit entweder synthetisch pronyliertem Albumin (Pronyl-BSA) oder isoliertem Pronyl-Glycin führte zu einem Anstieg der Aktivität von Glutathion-S-Transferase (GST) um 12 % nach Exposition mit Pronyl-BSA und zu einem Anstieg um 34 % nach Exposition mit Pronyl-Glycin im Vergleich zu nicht exponierten Zellen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit erstmalig, dass "pronylierte" Proteine als Inhaltsstoffe von Brotkruste als potente Antioxidantien und als monofunktionelle Induktoren der GST in vitro fungieren.

Index

4.3. RAGE-vermittelte MAPK-Aktivierung durch nicht-enzymatisch gebildete Glycolisierungsprodukte (Maillard-Reaktionsprodukte) und durch N-Methyl-pyridin, ein bei der Röstung von Kaffee entstehendes Produkt, das nicht im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildet wird

Ausgangslage: Im Rahmen der Untersuchungen von zellulären Effekten, die durch isolierte Inhaltsstoffe von erhitzten Lebensmitteln ausgelöst werden, konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass das Rezeptorprotein des Oberflächenrezeptors RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) nach Exposition von intestinalen Caco-2 Zellen mit dem Maillard-Reaktionsprodukt Casein-N ϵ -Carboxymethyllysin (Casein-CML) exprimiert und in weiterer Folge die p44/42 MAP-Kinasen aktiviert werden.

Forschungsziel: Es sollte gezeigt werden, dass diese Effekte auch nach Exposition der Caco-2 Zellen mit wässrigen Extrakten aus Kaffee-Extrakt und Brotkruste erzielt werden.

Ergebnis: Nach Identifikation, Quantifikation und Synthese zweier physiologisch aktiven Verbindungen in Brotkruste (Pronyl-Glycin) und Kaffee (N-Methylpyridinium) zeigten diese nach Inkubation mit Caco-2 Zellen einen aktivierenden Effekt auf die Expression der p44/42 MAP-Kinasen. Nach Blockierung des RAGE-Rezeptors mit einem spezifischen Antikörper zeigte sich eine deutlich erniedrigte Aktivierung der p44/42 MAP-Kinasen. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, nachdem Nierenzellen (HEK-293), bei denen die cytoplasmatische Domäne des RAGE-Rezeptors nicht exprimiert wird, mit den verschiedenen Testsubstanzen exponiert worden waren. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Lebensmittelinhaltsstoffe, die sowohl im Rahmen von nicht-enzymatischen Glykolisierungsreaktionen entstehen können, als auch andere Inhaltstoffe, die nicht bei Ablauf der Maillard-Reaktion gebildet werden, zelluläre Signaltransduktions-mechanismen aktivieren.

[Index](#)

4.4. Expression des Biotransformationsenzym GST nach Aufnahme von N ϵ -Carboxymethyllysin in der Ratte

Ausgangslage: N ϵ -Carboxymethyllysin (CML) ist ein sog. "Advanced Glycation End product" (AGE), das bei Ablauf von nicht-enzymatischen Glykolisierungsreaktionen entsteht und sowohl in Lebensmitteln als auch im lebenden Organismus nachgewiesen werden kann.

Forschungsziel: Es sollte der Einfluss von CML auf die Expression des Biotransformationsenzym Glutathion-S-Transferase (GST) sowohl in vitro, in intestinalen Caco-2 Zellen, als auch in vivo, in der Ratte, untersucht werden. Eine aktivierende Wirkung auf chemopräventiv-wirksame Enzymsysteme durch diätetisches CML wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Ergebnis: Im ersten Tierexperiment wurde an Casein gebundenes CML (Casein-CML) in pharmakologischen Dosierungen von 110 und 300 mg CML x kg Körpergewicht⁻¹ x Tag⁻¹ über einen Zeitraum von 10 Tagen an männliche Wistar Ratten verabreicht. In einer zweiten Studie erfolgte die Verabreichung von an Protein gebundenem CML in Form von Brotkruste. Diese wurde der Diät in einer Menge von 25-Gewichts-% anstelle von Stärke (Kontrolldiät) beigemischt. Die tägliche Aufnahme von CML betrug hier 11 mg CML x kg Körpergewicht⁻¹ x Tag⁻¹. Die Enzyminduktion der GST in der Niere wurde enzymatisch mittels Photometrie bestimmt. Zusätzlich zu den Tierexperimenten wurden Zellkultur-studien durchgeführt, um den Effekt von Casein-CML, Brotkruste sowie CML auf die Induktion der GST zu untersuchen. In den beiden tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl nach der Verabreichung von Casein-CML als auch nach der von Brotkruste die GST-Aktivität in der Niere im Vergleich zu Kontrolltieren, denen eine CML-freie Diät verabreicht worden war, gesteigert war. Anhand der Ergebnisse, die im Rahmen der Zellkulturuntersuchungen erzielt wurden, konnte dieser Effekt der GST-Induktion nach Exposition von intestinalen Caco-2 Zellen mit Casein-CML, Brotkruste oder mit CML sowohl durch Bestimmung der Enzymaktivität als auch durch Bestimmung der Proteinmenge der wichtigsten Isoenzyme via Western Blotting bestätigt werden.

[Index](#)

4.5. Zöliakiespezifische immunologische Untersuchung von Peptiden aus α -Gliadinen

Ausgangslage: Vorangegangene in-vivo-Untersuchungen an vier Zöliakiepatienten haben ergeben, dass das Peptid G8 aus α -Gliadinen (Sequenzpositionen 56 " 75) eine zöliakiespezifische Schädigung der Darmschleimhaut hervorruft. Darüber hinaus haben in der Literatur beschriebene Arbeiten gezeigt, dass dieser Sequenzabschnitt eine starke stimulierende Wirkung auf T-Lymphozyten von Zöliakiepatienten hat. Es wurde jedoch bisher nicht untersucht, welche Aminosäuresequenzen innerhalb des Peptids G8 für die Stimulationswirkung verantwortlich sind.

Forschungsziel: Durch immunologische Studien an sequenzmodifizierten Peptiden soll geklärt werden, welche Aminosäurereste von Peptid G8 für die stimulierende Wirkung auf T-Lymphozyten essentiell sind.

Ergebnis: Die zu untersuchenden Peptide wurden an einem Peptidsynthesizer synthetisiert und durch zweistufige RP-HPLC gereinigt. Die immunologischen Untersuchungen erfolgten an T-Lymphozyten, die nach Stimulation mit einem Gliadin- oder Glutenhydrolysat aus dem Dünndarmgewebe von Zöliakiepatienten isoliert worden waren, sowie an entsprechenden T-Zellklonen. Aus Blut isolierte Antigen-präsentierende Zellen wurden mit dem jeweiligen Antigen vorinkubiert und dann mit den T-Zellen und ³H-markiertem Thymidin inkubiert. Als Antigene wurden Phytohämagglutinin (Positivkontrolle), Gliadin- und Glutenhydrolysat sowie die einzelnen Peptide eingesetzt. Parameter für die Stimulationswirkung waren der Anstieg der Radioaktivität in den T-Zellen im Vergleich zum Leerversuch und die Produktion der Zytokine γ -Interferon und Interleukin 4 und 10. Bei allen aus dem Sequenzabschnitt 56 " 75 von α -Gliadinen stammenden Peptiden wurde an Position 65 Glutaminsäure (E65) an Stelle von Glutamin (Q65) eingebaut, da laut Literatur eine Desamidierung, die nativ durch Transglutaminase erfolgt, für die Stimulation wichtig ist. Die erste Versuchsreihe ergab, dass das Ausgangspeptid G9 (α 56 " 75/E65) die stärkste Wirkung hatte, gefolgt vom Fragmentpeptid G4 (α 62 " 75/E65); das zweite Fragmentpeptid G5 (α 56 " 68/E65) wirkte deutlich schwächer. Der Vergleich der Peptide G9 (E65) und G8 (Q65) zeigte, dass auch das nicht-desamidierte Peptid stimulierend wirkte, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Für weiterführende Untersuchungen wurde G4 eingesetzt und jede Position außer E65 mit einem Alaninrest modifiziert. Die damit erhaltenen Stimulationsindices und Zytokinmengen zeigten klar, dass die Sequenzpositionen α 62 " 71 (PQPELPYPQP) für eine signifikante Wirkung essentiell waren. In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Peptid G9 schrittweise um je einen Rest vom N- und C-Terminus her verkürzt. Bis zur Verkürzung G9-8 (PFPQPELPYPQP) war keine wesentliche Veränderung der Stimulationswirkung festzustellen. Peptid G9-10 (FPQPELPYPQ) zeigte hingegen eine stark reduzierte Wirkung, und die noch weiter verkürzten Peptide G9-12 (PQPELPYP) und G9-14 (QPELPY) waren nicht mehr in der Lage, die eingesetzten T-Zellklone zu stimulieren.

[Index](#)

5. TABELLENWERK ZUM NÄHRSTOFFGEHALT VON LEBENSMITTELN

Ausgangslage: Dem jeweiligen Wissensstand entsprechende Tabellen über die Zusammensetzung von Lebensmitteln sind für die Administration, Ernährungsberatung, Wirtschaft und Wissenschaft unentbehrlich.

Forschungsziel: Das von Souci, Fachmann und Kraut begründete Tabellenwerk ist durch Erfassung der gesamten einschlägigen Literatur mit Hilfe der PC-Datenbank SFKDB ständig auf dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand zu halten. Dies gilt auch für die davon

abgeleitete kleine Lebensmitteltabelle. Das Spektrum der Inhaltsstoffe soll sich weiterhin verstärkt nach präventiv-medizinischen Gesichtspunkten ausrichten.

Ergebnis: Die Vorbereitungen zur Veröffentlichung der 3. Auflage der kleinen Lebensmitteltabelle sind abgeschlossen, nach der Korrektur der Druckfahnen wird die Publikation im Herbst dieses Jahres erfolgen. Die Arbeit an der 7. Auflage wurde fortgesetzt, insbesondere die Aminosäuredaten wurden erneuert sowie einhergehend mit der Diskussion um die Gruppe der Functional Foods und speziell der bioaktiven Substanzen wurde der Datenbestand dieser Verbindungsklasse erweitert. Ältere Daten sollen im Zuge der fortschreitenden Methodenentwicklung aktualisiert werden (z.B. Daten für Iod und Folsäure). Um die Datenqualität der SFK-Datenbank zu dokumentieren und um den Benutzer der Online-Datenbank einen Einblick in den wissenschaftlichen Hintergrund der Daten zu ermöglichen, wurden im neuesten Update der Online-Version die Qualitätsparameter: Literaturquelle, Analysenmethode und Probenzahl für jeden einzelnen Datenpunkt veröffentlicht.

[Index](#)