

**Mechanistische und anwendungsbezogene Untersuchungen zur
Proteinmodifizierung durch α -Dicarbonylverbindungen**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
DOCTOR RERUM NATURALIUM
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie und Physik

von Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker
Robert Spanneberg
geboren am 02.08.1981 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Marcus A. Glomb
2. Prof. Dr. Monika Pischetsrieder

Halle (Saale), 17. Juli 2012

Für meine Eltern

Danksagung

Für die Vergabe des interessanten Themas, die Möglichkeit der Bearbeitung und die Betreuung während der Promotion möchte ich Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb danken. Ohne ihre fachliche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen sowie das entgegengebrachte Vertrauen wäre diese Arbeit wohl nie entstanden.

Dem Arbeitskreis von Prof. Glomb danke ich für die freundliche und entspannte Atmosphäre. Meine lieben Kollegen hatten neben den fachlichen Fragen auch immer offene Ohren für die privaten Angelegenheiten oder Nachsicht für die Musik von meinem Schreibtisch. Vor allem der „Mensatruppe“ danke ich für die nötige Ablenkung während des harten Forscheralltages. Weiterhin wären ohne die helfenden Hände von Frau Karin Hengmith und Frau Marlis Wittenberg die Unmengen an Käse nicht analysiert worden.

Für die Möglichkeit der Durchführung der rheologischen Messungen und die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse bedanke ich mich bei Frau Gesche Graf und dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Blume. Die Zugversuche sowie die Permeabilitätsmessungen konnten nur durch die Hilfe der Projektpartner Herr Dr. Anton, Herr Dr. Kolesov und Frau Stechmann erfolgen.

Umfangreiche Unterstützung erhielt ich außerdem von meinen Diplomanden Johannes, Franziska, Yvonne, Grit und Darena. Eure Ergebnisse sowie die Fragen und Antworten waren mir eine große Hilfe und sollen nicht unerwähnt bleiben.

Besonderer Dank gilt Frau Antje Klöpfer und meinem Vater für die intensive inhaltliche und sprachliche Überarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld sowie die ermutigenden und motivierenden Worte wenn es mal nicht so lief. Ohne euch hätte ich den Tiefschlägen der Wissenschaft wohl nichts entgegenzusetzen gehabt.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde vom Mai 2007 bis April 2011 im Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Bereich Lebensmittelchemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. A. Glomb angefertigt.

Finanzielle Unterstützung erhielt ich im Rahmen der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt und durch die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter für das Drittmittelprojekt „Multifunktionale, sprühfähige und biologisch abbaubare Folien auf Basis nachwachsender Rohstoffe im landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau“. Das Projekt wurde gefördert durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. als Projektträger des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).

Die Veröffentlichung der Forschungsergebnisse erfolgte in internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften. Die Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt, wobei die Präsentation der experimentellen Daten, der Einzelergebnisse und deren Diskussion in den beigefügten Publikationen erfolgte. Weiterführende, unveröffentlichte Ergebnisse wurden an den entsprechenden Stellen wiedergegeben. Schwerpunkt vorliegender Arbeit war die Zusammenfassung der wissenschaftlichen Einzelaspekte und ihre Einordnung in den Kontext des Titels „Mechanistische und anwendungsbezogene Untersuchungen zur Proteinmodifizierung durch α -Dicarbonylverbindungen“.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	I
VORWORT	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG	1
1.1 α -Dicarbonylverbindungen – hochreaktive Intermediate mit Bedeutung in Lebensmitteln und <i>in vivo</i>	2
1.1.1 Entstehung von α -Dicarbonylverbindungen	2
1.1.2 Folgereaktionen von α -Dicarbonylverbindungen.....	8
1.1.3 Nachweis von α -Dicarbonylverbindungen.....	11
1.2 Proteinmodifizierung – Veränderung und Funktionalisierung biologischer Makromoleküle	15
1.2.1 Klassifizierung und Charakterisierung von Proteinmodifizierungen	15
1.2.2 Bedeutung von Proteinmodifizierungen in Lebensmitteln und <i>in vivo</i>	22
1.2.3 Funktionalisierung durch Proteinmodifizierung	25
2 ZIELSTELLUNG	29
3 EINORDNUNG UND ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE ..	30
3.1 Mechanistische Untersuchungen zu Proteinmodifikationen	30
3.1.1 Bildung von Methylglyoxal-Arginin-Modifikationen.....	31
3.1.2 Weiterführende Untersuchungen	42
3.2 Anwendungsbezogene Untersuchungen zur Proteinmodifizierung	44
3.2.1 Herstellung und Charakterisierung chemisch modifizierter Gelatinefolien	44
3.2.2 α -Dicarbonylverbindungen und Aminosäuremodifikationen als Marker der Käsureifung	65
4 ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION.....	77
5 ABSTRACT.....	80
6 LITERATURVERZEICHNIS	82
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
8 TABELLENVERZEICHNIS.....	104
9 ANHANG	105
LEBENS LAUF.....	VI
PUBLIKATIONS LISTE	VII
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	IX

Abkürzungsverzeichnis

3-DG	3-Desoxyglucoson
AGE	Advanced Glycation Endproduct
AP	Argpyrimidin
CEA	<i>N</i> ^ω -Carboxyethylarginin
CEL	<i>N</i> ^ε -Carboxyethyllysin
CMA	<i>N</i> ^ω -Carboxymethylarginin
CML	<i>N</i> ^ε -Carboxymethyllysin
DA	Diacetyl
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DODIC	3-Desoxyglucoson-Lysin-Arginin-Crosslink
DOLD	3-Desoxyglucoson-Lysin-Dimer
ECD	Elektroneneinfangdetektor
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GL	Glyoxal
GLC	Glycolaldehyd
GODIC	Glyoxal-Lysin-Arginin-Crosslink
GOLD	Glyoxal-Lysin-Dimer
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie
MG-H1	Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 1
MG-H2	Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 2
MG-H3	Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 3
MGO	Methylglyoxal
MODIC	Methylglyoxal-Lysin-Arginin-Crosslink
MOLD	Methylglyoxal-Lysin-Dimer
MRP	Maillard-Reaktionsprodukt
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
o-PD	o-Phenylendiamin

PFBOA	<i>O</i> -Pentafluorbenzylhydroxylamin
RAGE	Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
THP	Tetrahydropyrimidin

1 Grundlagen und Stand der Forschung

Proteine stellen eine der bedeutendsten Substanzklassen innerhalb der biologisch aktiven Makromoleküle dar. Neben den Fetten und Kohlenhydraten sind sie die dritte große Gruppe der Nahrungs- und Reservestoffe. Im Organismus besitzen Proteine vielfältige Funktionen und Aufgaben. Als Enzyme katalysieren sie metabolische Reaktionen und dienen dem Stofftransport als Ionenkanal oder indem sie reversibel verschiedene Substanzen (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid) binden. Strukturproteine bestimmen den Aufbau und die Form der Zelle und sind damit die Gerüstsubstanz des Gewebes. Molekulare Motoren wie Myosin und Actin wandeln chemische Energie in mechanische um, die dann in komplexen Bewegungsabläufen resultieren. Schutz- und Abwehrreaktionen werden ebenfalls durch Proteine realisiert. So zählen Schlangengifte und Bakterientoxine ebenso zu dieser Substanzklasse, wie auch die Blutgerinnungsfaktoren und die an der Immunantwort beteiligten Immunglobuline. Weiterhin speichern Proteine Energie, die vor allem bei Mangelzuständen durch Abbau freigesetzt werden kann.

Ernährungsphysiologisch besitzen Proteine Bedeutung als Quelle essentieller Aminosäuren wie Lysin und Phenylalanin. Der Gehalt dieser Aminosäuren bestimmt die biologische Wertigkeit des Proteins im Lebensmittel. Eine weitere wichtige Funktion erhalten Proteine durch ihren Einfluss auf die Textur und Sensorik eines Lebensmittels. Schaumbildung und -stabilität sowie emulgierende Wirkung und die Eigenschaft der Gelbildung sind hier bedeutsam. Wichtige Aromaveränderungen bei der Lagerung oder Verarbeitung von Lebensmitteln entstehen entweder durch den Abbau von Proteinen oder durch die Reaktion mit anderen Inhaltsstoffen.

Die zahlreichen Funktionen und vielfältigen Eigenschaften von Proteinen entstehen vor allem durch die hohe Variabilität im strukturellen Aufbau und durch die Möglichkeit der Modifizierung reaktiver Gruppen. Darüber hinaus führen ungewollte Veränderungen zu einer verminderten Funktion oder Qualität. Sie bieten gleichzeitig die Möglichkeit durch systematische Umgestaltung, bestimmte Eigenschaften gezielt zu beeinflussen und damit eine Funktionalisierung hervorzurufen. Die Modifikation der Peptidkette erfolgt dabei entweder durch enzymatische oder chemische Reaktion der Aminosäureseitenketten oder des N- bzw. C-Terminus. Die zugrunde liegenden Reaktionen sind vielfältig, wobei die α -Dicarbonylverbindungen aufgrund ihrer hohen Reaktivität und ihrem Vorkommen im Lebensmittel als auch in physiologischen Systemen eine besondere Stellung einnehmen.

1.1 α -Dicarbonylverbindungen – hochreaktive Intermediate mit Bedeutung in Lebensmitteln und *in vivo*

α -Dicarbonyle sind bifunktionelle Verbindungen, die durch zwei unmittelbar benachbarte Carbonylgruppen gekennzeichnet sind. Im Lebensmittel oder im Organismus werden sie entweder im Zuge der nicht-enzymatischen Bräunung, thermischer Prozesse oder enzymkatalysierter Reaktionen während verschiedener Stoffwechselprozesse gebildet. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind diese Substanzen oftmals nur Zwischenprodukte, deren Nachweis eine besondere Herausforderung darstellt.

1.1.1 Entstehung von α -Dicarbonylverbindungen

Die Maillard-Reaktion

Anfang des 20. Jahrhunderts beschäftigte sich der französische Chemiker Louis Camille Maillard mit der Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren, in deren Verlauf es zur Bildung gefärbter Strukturen kommt. Die Reaktion wird daher auch als nicht-enzymatische Bräunung bezeichnet [1]. Infolge des extrem komplexen Reaktionsmechanismus entsteht eine Vielzahl an Substanzen, die in überwiegend stabile Umsetzungs- oder reaktive Zwischenprodukte unterteilt werden können. Die stabilen Verbindungen dienen aufgrund geringer Veränderungen während der Isolierung oder Reinigung auch als Indikatorsubstanzen zum Nachweis bestimmter Phasen der Maillard-Reaktion. Die hohe Reaktivität der Zwischenprodukte erschwert deren Isolierung und Bestimmung, ist aber für die Aufklärung der Reaktionsmechanismen unerlässlich [2].

Grundsätzlich greifen in der Anfangsphase die Aminogruppen von Aminen, Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen nukleophil die Carbonylfunktion von reduzierenden Zuckern unter Wasserabspaltung und Iminbildung an. Das gebildete 1,2-Enaminol lagert sich anschließend, abhängig vom reagierenden Zucker, in die 1-Amino-1-desoxyketose (Amadori-Verbindung) bzw. 2-Amino-2-desoxyaldose (Heyns-Verbindung) um [3]. Trotz der partiellen Stabilität der Amadori- und Heyns-Produkte werden im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion aus diesen Substanzen durch Enolisierung, Eliminierung des Amins oder Wassers und durch Iminhydrolyse reaktive α -Dicarbonylverbindungen, die sogenannten Desoxyosone, gebildet. Die Umlagerung in das 1,2-Enaminol bzw. 2,3-Endiol bestimmt die Bildung der resultierenden Desoxyosone. In Abbildung 1 sind die wichtigsten Reaktionsschritte und Zwischenprodukte dargestellt. Als Beispiel für die reduzierende Struktureinheit wurde D-Glucose gewählt, wobei andere Hexosen und Pentosen auf ähnliche Weise reagieren. Die Darstellung der Verbindungen erfolgt aus Gründen der Übersicht in der offenkettigen Form,

obwohl in wässriger Lösung die Hemiacetal- bzw. Hemiketalformen die stabileren Konformationen darstellen.

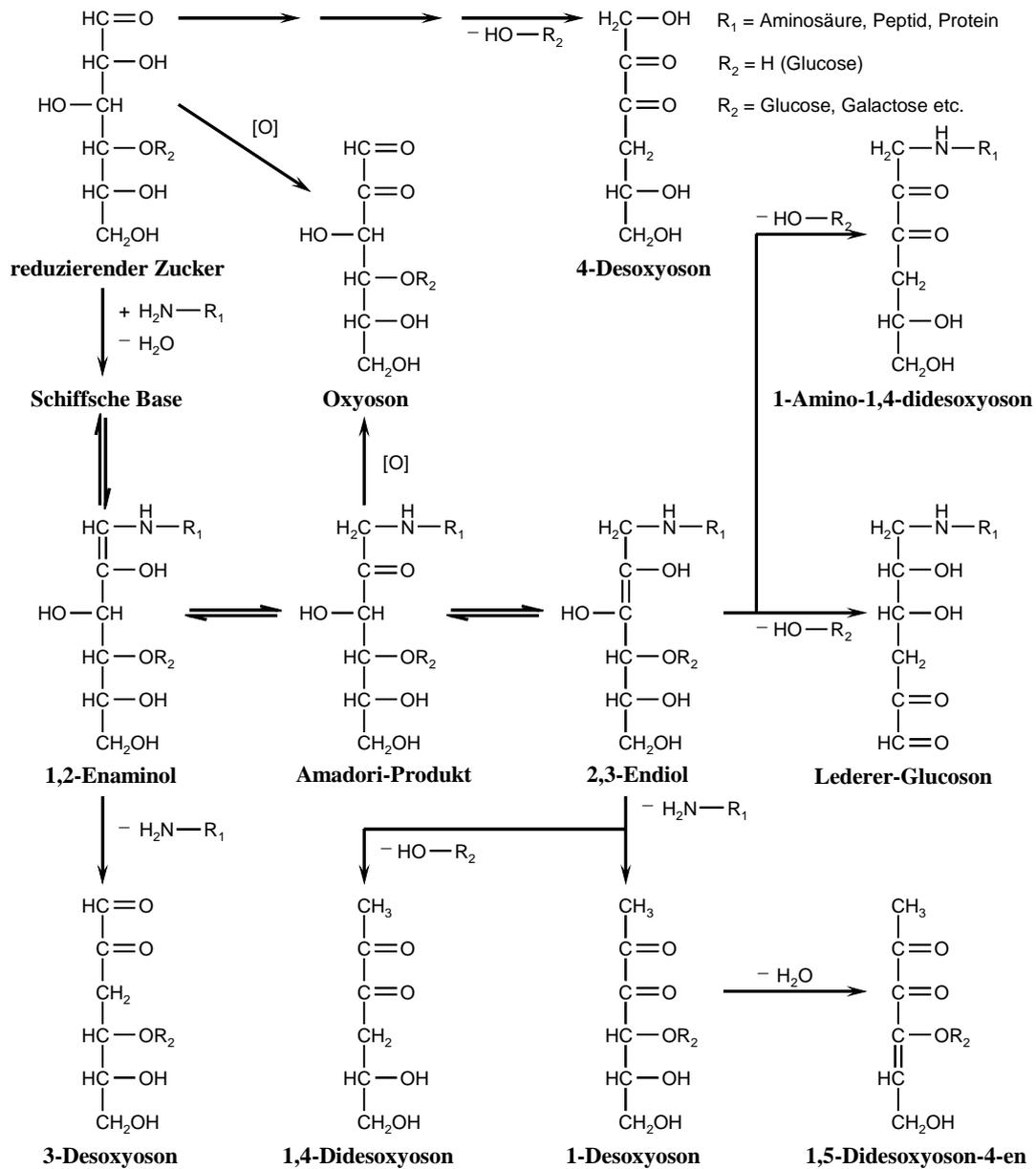


Abbildung 1: Bildung von α -Dicarbonylverbindungen mit Erhalt des Kohlenhydratrückgrats während der frühen und fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion

Reduzierende Di- und Oligosaccharide (Maltose, Lactose, Dextrine) reagieren ebenfalls zu den Desoxyosonen. Während die glycosidisch gebundenen Kohlenhydrate im 1- bzw. 3-Desoxyoson [4; 5] erhalten bleiben, wird das 1-Amino-1,4-dideoxyoson bevorzugt aus Disacchariden durch Spaltung der glycosidischen Bindung gebildet. Vor allem das 2,3-Endiol spielt dabei eine zentrale Rolle. Dieses Intermediat führt nach Wanderung der Doppelbindung und Wassereliminierung zum sogenannten Lederer-Glucoson [6; 7]. Ein weiteres Folgeprodukt ist das 1-Desoxyoson, das bei Oligosacchariden als Vorläufer des 1,5-Dideoxyoson-4-ens beschrieben wird und in seiner pyranoiden Form in Maltose- und Lactoseinkubationen

identifiziert wurde [8]. Weiterhin wird auf die Bildung von 1,4-Didesoxyosonen aus Oligosacchariden durch β -Eliminierung der Aminkomponente und des glycosidisch gebundenen Restes aus dem 2,3-Endiol hingewiesen [9]. Neben den Enolisierungs- und Eliminierungsreaktionen entlang der Kohlenhydratkette sind Oxidationsprozesse ebenfalls für die Bildung von α -Dicarbonylverbindungen von Bedeutung. Autoxidation oder Inkubationen von Glucose mit Lysin unter aeroben Bedingungen führen zur Bildung von Glucoson [10], das ausgehend vom Amadori-Produkt über einen radikalischen Mechanismus [11] erklärt wird.

Alle zuvor beschriebenen Zwischenprodukte enthalten die C6-Grundstruktur des reduzierenden Zuckers. Durch Fragmentierungsreaktionen des Kohlenstoffrückgrats entstehen weitere α -Dicarbonylverbindungen und vergrößern damit das Spektrum dieser reaktiven Substanzklasse während der Maillard-Reaktion. In der Abbildung 2 sind die wichtigsten Verbindungen mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen dargestellt.

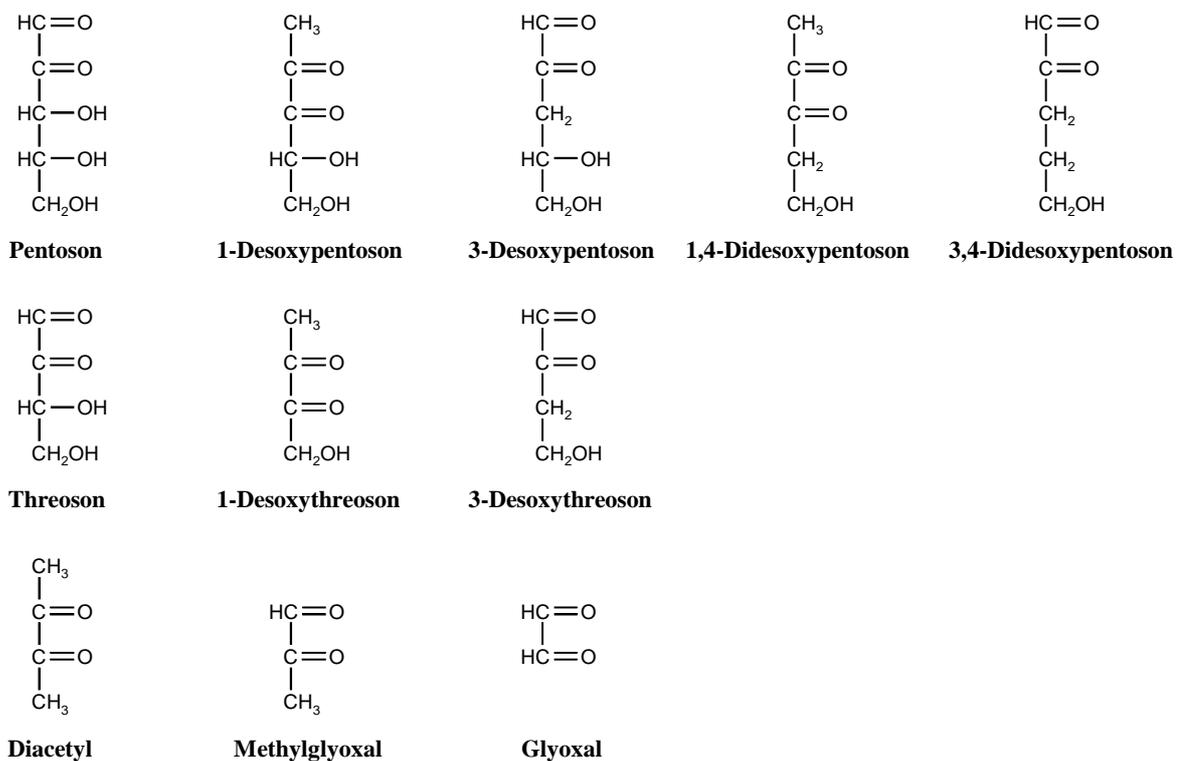


Abbildung 2: α -Dicarbonylverbindungen mit 2-5 Kohlenstoffatomen

Für die verschiedenen Pentosone werden Ribose [12; 13] aber auch Glucose [10] als Vorläufer benannt. Die Fragmentierung der Hexose wird dabei über die nicht-oxidative, hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung von Glucoson realisiert. Hierbei wird Ameisensäure aus dem 1,3-Tautomer abgespalten und durch Oxidation oder Wassereliminierung das Pentosen bzw. 1- und 3-Desoxypentosen gebildet. Letzteres und das 3,4-Didesoxypentosen wurden weiterhin als wichtige α -Dicarbonyle beim Maillard-induzierten Abbau von Di- und

Oligosacchariden identifiziert. Für das 3-Desoxyntoson werden das 1-Amino-1,4-Didesoxyntoson [14] oder das 4-Desoxyntoson [15] als Precursor vorgeschlagen. Neue Untersuchungen belegen allerdings eindeutig die Bildung des 3-Desoxyntoson ausgehend von den Oxyntosen [10; 16].

In der Hexosenchemie wurde das 1-Desoxyglucoson als zentrales Intermediat für die Bildung der C4-Dicarbonyle Threoson, 1-Desoxythreoson und 3-Desoxythreoson identifiziert [17]. Zusätzlich entsteht bei der Inkubation von Maltose mit Lysin das 3-Desoxythreoson als spezifisches C4-Dicarbonyl [16]. Usui et al. beschrieben dessen Bildung durch Fragmentierung von 3-Desoxyntoson, 3-Desoxyglucoson (3-DG) und Glucoson. Letzteres gilt außerdem als Vorläufer des Threosons [18].

2,3-Butandion, oder Diacetyl (DA), wurde ebenfalls in verschiedenen Maillard-Modellinkubationssystemen nachgewiesen [16; 19; 20]. Verschiedene Bildungsmechanismen wie Retro-Aldol-Fragmentierung der Glucose [20] oder von 1,4-Didesoxyntoson [19], aber auch die Kettenverlängerung von Glyoxal (GL) oder Methylglyoxal (MGO) durch Glycin [21] werden diskutiert. Interessanterweise beschreiben Pfeifer und Kroh die Bildung des 1,4-Didesoxyntoson durch Aldolkondensation des DA mit Formaldehyd [19].

Methylglyoxal (MGO) und die einfachste α -Dicarbonylverbindung Glyoxal (GL) wurden ebenfalls in zahlreichen Maillard-Modellinkubationen nachgewiesen. Ein eindeutiger Bildungsmechanismus dieser wichtigen Zuckerabbauprodukte kann zum derzeitigen Stand der Forschung nicht abschließend aufgestellt werden. Inkubationen von ^{13}C -markierter Glucose zeigen Fragmentierungen entlang der gesamten Kohlenstoffkette, womit sowohl die intakte Hexose als auch deren Abbauprodukte mit C5- und C4-Skelett als Vorstufen gelten müssen [10]. Als weitere Vorstufen für MGO werden in der Literatur die Schiffische Base [22], das Amadori-Produkt [23], das 1-Desoxyglucoson [24] oder die 3-Desoxyntose der Glucose bzw. Ribose [18] vorgeschlagen. Hierbei wurden verschiedene Enolisierungen, Retro-Aldol-Fragmentierungen und Eliminierungsreaktionen postuliert. Von Bedeutung sind dabei Glycerinaldehyd und die Aminoketose, welche durch Wasserabspaltung bzw. β -Eliminierung der Aminofunktion MGO bilden. GL kann entweder direkt aus Glucose [22; 23], dem Glucoson [10; 25] oder durch Fragmentierung der Schiffischen Base [26] entstehen. Eine zentrale Rolle erhält hier Glycolaldehyd (GLC), das zum GL oxidiert werden kann. Neuere Untersuchungen identifizierten Threoson als mögliche Vorstufe, da dieses durch hydrolytische β -Dicarbonylspaltung in GLC bzw. Glycerinaldehyd fragmentiert [27]. Eine Übersicht verschiedener Bildungsmechanismen von GL und MGO im Zuge der Maillard-Reaktion ist in Abbildung 3 dargestellt.

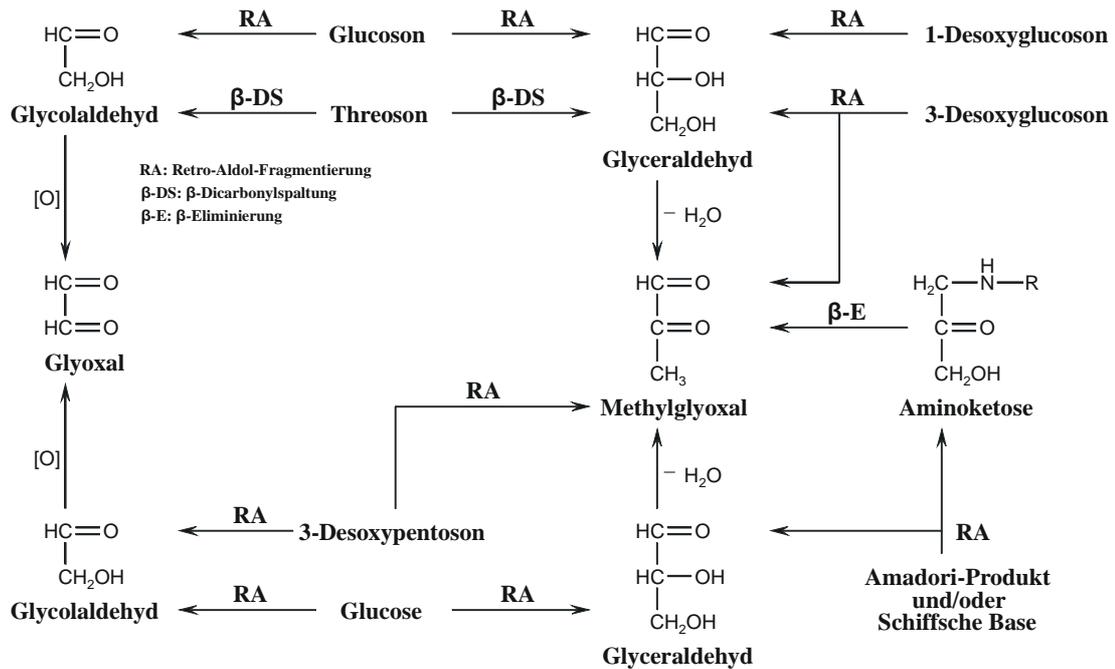


Abbildung 3: Postulierte Bildungsmechanismen für MGO und GL nach [10; 18; 22-24; 27]

Weitere Bildungswege bedeutender α -Dicarbonyle

Neben der Maillard-Reaktion reagieren Kohlenhydrate auch ohne Anwesenheit einer Aminofunktion zu α -Dicarbonylverbindungen. Hierbei sollen das Glucoson [10], als auch der spontane Abbau der Glucose zu GL [28], MGO und 3-Desoxyglucoson (3-DG) unter physiologischen Bedingungen [22] beispielhaft genannt werden. Eine disaccharidspezifische α -Dicarbonylverbindung ist das 4-Desoxyglucoson (Abbildung 1). Dieses entsteht ebenfalls ohne Reaktion der Aminkomponente aus einem reduzierenden Disaccharids nach Enolisierung und anschließender β -Eliminierung der zweiten Kohlenhydrateinheit [29].

In Lebensmitteln ist daneben die Karamellisierung von Kohlenhydraten von Bedeutung. Diese Temperatur- und pH-Wert-induzierte Fragmentierung führt über Enolisierung, Wassereliminierung und Retro-Aldol-Fragmentierung zu kurzkettigen α -Dicarbonylverbindungen wie GL, MGO und DA. Als Zwischenprodukte gelten die zuvor beschriebenen Desoxyosone [24; 30; 31].

Untersuchungen zur Stabilität von L-Ascorbinsäure unter Koch- bzw. Lagerbedingungen identifizierten Vitamin C als weitere Quelle von α -Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln. Neben den bereits oben beschriebenen Substanzen 3-Desoxythreoson [32], DA [32; 33], MGO und GL [32; 33] wurden auch spezifische Strukturen, wie L-Xylosen [34], 3-Desoxy-L-pentosen [32; 35] und L-Threoson nachgewiesen [32; 36]. Die hydrolytische Öffnung des Lactonringes unter oxidativen Bedingungen führt zu 2,3-Diketogulonsäure, die dann fragmentiert.

Neben dem Kohlenhydratabbau durch die Maillard-Reaktion sind unter physiologischen Bedingungen vor allem enzymatische Reaktionen für die Bildung von α -Dicarbonylverbindungen entscheidend. MGO als bedeutendes α -Dicarbonyl *in vivo* wird in Säugetieren entweder durch Darmbakterien oder körpereigene Prozesse synthetisiert. Die verschiedenen Bildungsmöglichkeiten sind [37]:

- Nebenwege der Glycolyse
- Acetonmetabolismus
- Aminosäureabbau
- Triglyceridmetabolismus

Im Verlauf der Glycolyse werden durch enzymatische Phosphorylierung, Isomerisierung und Spaltung aus Glucose die Triosephosphate Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) sowie Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gebildet. Als Konkurrenzreaktion zur Pyruvatbildung können diese enzymatisch [38; 39] über das Phospho-en-diolat-Intermediat [40] MGO bilden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der nicht-enzymatischen Phosphateliminiierung [41; 42]. Fructose wird enzymatisch in die oben genannten Triosephosphate überführt und ist damit ebenfalls als MGO-Quelle einzuordnen [43]. Diese Ketose wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder durch enzymatische Oxidation von Sorbitol im sogenannten Polyol-Weg gebildet. Dieser Weg des Glucosemetabolismus unter hyperglykämischen Bedingungen [44; 45] führt *in vivo* über Phosphorylierung durch Fructose-3-phosphatkinase und anschließender Phosphateliminiierung zum 3-DG als weiterem α -Dicarbonyl [46; 47].

Die Oxidation von Aceton über Hydroxyaceton zum MGO wird durch Cytochrome P450 2E1 katalysiert [48]. Dieser Ketonkörper wird im Fastenzustand [49] oder bei diabetischer Ketoacidose [50] aus Acetoacetat während des Fettsäureabbaus gebildet. Zusätzlich kann das im Triglyceridmetabolismus gebildete Glycerin phosphoryliert und anschließend zum DHAP oxidiert werden [51].

Die enzymatische Oxidation von Aminoaceton durch eine semicarbazidsensitive Aminoxidase stellt im menschlichen Organismus eine weitere MGO-Quelle [52] dar. Dieses α -Aminoketon wurde im Urin von Ratten und Menschen nachgewiesen [53] und wird während des Threonin- und Glycinkatabolismus gebildet [54].

Obwohl GL auch *in vivo* von Bedeutung ist (Abschnitt 1.1.3), sind die Bildungsmechanismen unter physiologischen Bedingungen im Gegensatz zum MGO weniger vielfältig bzw. konnten noch nicht umfassend identifiziert werden. Neben dem oben genannten spontanen oder Maillard-induzierten Kohlenhydratabbau ist als weitere Dicarbonylquelle die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren hervorzuheben. GL als auch MGO entstehen

hierbei als reaktive Abbauprodukte ([55-58], Abschnitt 1.2.2). Als weitere GL-Quelle im Organismus ist das GLC anzusehen. Dieses wird bei Entzündungsprozessen durch enzymatische Katalyse mittels Myeloperoxidase [59] oder NADPH-Oxidase [60] aus Serin gebildet.

Die verschiedenen Wege der GL- und MGO-Bildung sind in der Abbildung 4 zusammengefasst.

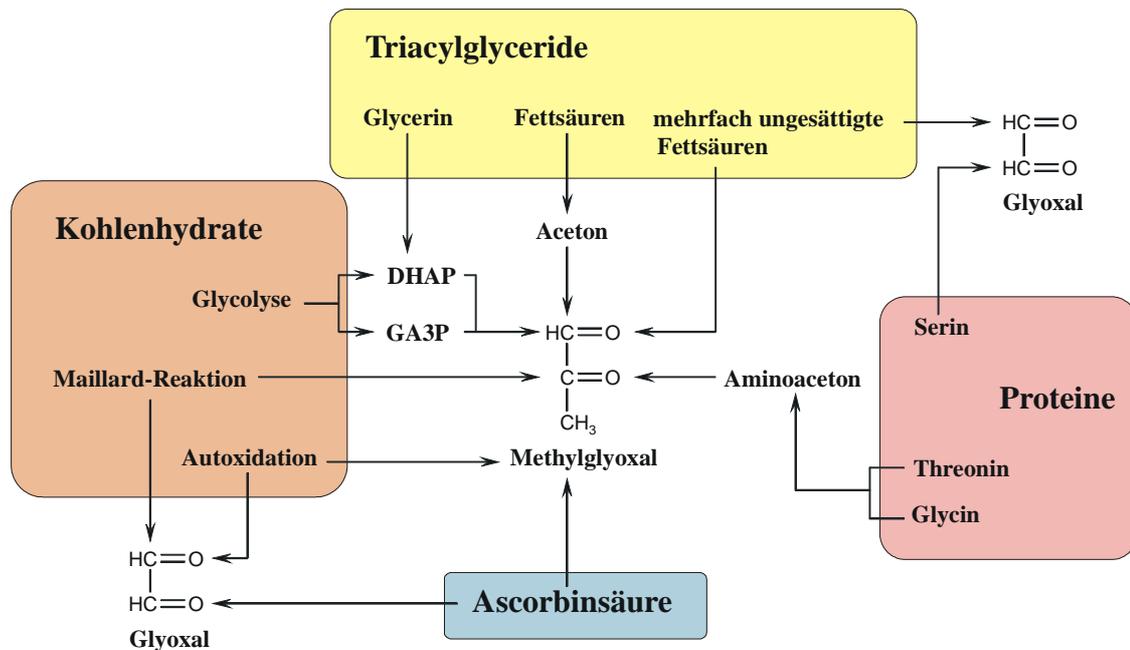


Abbildung 4: Zusammenfassung unterschiedlicher Bildungswege von MGO und GL

1.1.2 Folgereaktionen von α -Dicarbonylverbindungen

Die Folgereaktionen von α -Dicarbonylverbindungen können unter Einbindung und/oder Katalyse des Amins vereinfacht in Eliminierungen bzw. Fragmentierungen des Kohlenstoffgerüsts oder in Kondensationsreaktionen unterteilt werden. Im Lebensmittel bestimmen die dabei entstehenden Produkte maßgeblich die Eigenschaften und damit die Qualität. Neben Farbgebung tragen die Folgeprodukte zum charakteristischen Geruch und Geschmack des Lebensmittels bei. Unter physiologischen Bedingungen ist die Reaktion mit biologisch aktiven Makromolekülen unter z. T. drastischen Veränderungen der Funktionalität von Bedeutung.

Durch Enolisierungen, Wassereliminierungen als auch Spaltung der glycosidischen Bindungen sind furanoide und pyranoide Ringstrukturen wichtige Folgeprodukte der in Abbildung 1 dargestellten Desoxyosone. Diese sind teilweise aromapotent. In Anwesenheit von Aminosäuren können heterozyklische Verbindungen mit Schwefel- und Stickstoffatomen entstehen. Als bedeutendes Beispiel für das 3-DG soll an dieser Stelle das 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) genannt werden [61]. Es kann als Parameter für die

Hitzebehandlung bei der Herstellung von Lebensmitteln, wie Milch [62] oder Brot [63], herangezogen werden. Unter sauren Bedingungen erfolgt die HMF-Bildung auch ohne Amin-Beteiligung durch Dehydratisierung direkt aus dem Zucker. Das 1-Desoxyoson bildet durch Ringschluss und Wassereliminierung ebenfalls Furan- und Pyranerivate, die in Lebensmitteln oder Modellinkubationen nachweisbar sind. Der Abbau der 1-Desoxyosone von Disacchariden unterscheidet sich dabei von dem der Monosaccharide [2]. γ -Pyranon wird aus Hexosen gebildet und dient in Lebensmitteln als allgemeiner Indikator der Maillard-Reaktion [64-66]. Im Gegensatz dazu entsteht Maltol und Isomaltol bevorzugt aus den 1-Desoxyosonen der Maltose bzw. Lactose [67]. Maltol riecht nach Karamell, verstärkt den süßen Geschmack und ist damit ein Beispiel für ein aromaaktives Zyklisierungsprodukt. Nach Ringschluss und Wasserabspaltung von 1-Amino-1,4-didesoxyoson entstehen die sogenannten Aminoacetylfurane. Die Bildung des Furosins, einem bedeutenden Marker der Maillard-Reaktion, wird auf diesem Wege postuliert [2]. Der weitaus wichtigere Bildungsweg dieser Proteinmodifikation ist allerdings der Abbau des Amadori-Produktes unter säurehydrolytischen Bedingungen (Abschnitt 1.2.1).

Wie in Abschnitt 1.1.1 bereits erwähnt, entstehen im Verlauf der Maillard-Reaktion weitere α -Dicarbonylverbindungen durch Fragmentierung der Kohlenstoffkette. Bei Nachbarschaft einer Hydroxygruppe in β -Position kann mit Hilfe der Retro-Aldol-Kondensation die Bildung einer Reihe von Maillard-Reaktionsprodukten (MRPs) erklärt werden [68]. Zusätzlich werden in der Literatur die hydrolytische [69] sowie die oxidative α -Dicarbonylspaltung [70] beschrieben. Der hydrolytische Mechanismus konnte in aktuellen Untersuchungen nicht bestätigt werden [17]. Durch Wanderung der Carbonylgruppe entlang der Kohlenstoffkette besteht die Möglichkeit der hydrolytischen β -Dicarbonylspaltung [71]. Die Bildungen verschiedener Aldehyde (z.B. Glycerinaldehyd, Glycolaldehyd) und organischer Säuren (z.B. Essigsäure, Milchsäure) in Maillard-Modellinkubationen werden durch diese Reaktion erklärt [27].

Eine Besonderheit von α -Dicarbonylverbindungen mit α -Hydroxygruppen ist die Ausbildung von Reduktonstrukturen. Sie gelten wegen ihrer stark reduzierenden Eigenschaften als natürliche Antioxidantien (vgl. Ascorbinsäure), deren Wirkung auf der Ausbildung resonanzstabilisierter Radikale beruht. Diese können dann zu Tricarbonylverbindungen und Hydroxycarbonylverbindungen disproportionieren [72]. Während der Maillard-Reaktion entsteht eine Vielzahl solcher Verbindungen, die unter anderem zu farbigen Strukturen führen [73]. Die Verfärbung von Lebensmitteln und von Modellinkubationen ist einer der wichtigsten Effekte der Maillard-Reaktion. Aufgrund des

breiten Spektrums an Verbindungen während der nicht-enzymatischen Bräunung und den verschlungenen Reaktionsmechanismen sind α -Dicarbonylverbindungen sowohl als Vorläufer als auch als Intermediate bei der Bildung von farbigen Verbindungen anzusehen. So konnten in Modellinkubationen gelbe Kondensationsprodukte des 3-DG mit HMF nachgewiesen werden [74]. Im Lebensmittel können diese niedermolekularen Strukturen (< 1000 Da) zu hochmolekularen Pigmenten (100000 Da), den sogenannten Melanoidinen, polymerisieren. Zusätzlich werden als Bildungsmechanismen der Melanoidine Folgereaktionen von Aldehyden und α -Dicarbonylen mit Proteinen postuliert [75; 76].

Durch Kondensation der α -Dicarbonylstruktur mit den nukleophilen Gruppen der Aminosäuren erlangt diese Substanzklasse *in vivo* als auch im Lebensmittel zusätzlich an Bedeutung. Bei höheren Temperaturen besteht nach Reaktion mit der α -Aminogruppe aufgrund des Elektronenzugs der zweiten Carbonylfunktion die Möglichkeit zur Decarboxylierung der Aminosäure. Nach Hydrolyse entstehen aus den Dicarbonylverbindungen α -Aminoketone und aus den Aminosäuren die um ein Kohlenstoffatom verkürzten Aldehyde [77]. Durch Oxidation des intermediär auftretenden Enaminols [78] ist die Bildung der entsprechenden Säuren von z.B. Leucin oder Phenylalanin in gekochtem Rindfleisch [79] zu erklären. Diese als Strecker-Abbau bezeichnete Reaktion ist für das Entstehen von Koch-, Back- und Röstaromen in Lebensmitteln von essentieller Bedeutung. So sind die Strecker-Aldehyde 3-Methylbutanal und Phenylacetaldehyd Leitstrukturen für den Geruch von Schokolade oder der Kruste von Weizen- und Roggenbrot [80; 81]. Aus den α -Aminoketonen entstehen durch Kondensation zahlreiche flüchtige Pyrazine mit starkem Aromapotentiale, wobei unter anderem GL, MGO und DA als Vorläufer beschrieben werden [21; 82]. Der Strecker-Abbau von Cystein führt direkt zur Freisetzung von Schwefelwasserstoff und so zu einer Vielzahl an schwefelhaltigen Folgeverbindungen, die durch ihre niedrigen Geruchsschwellenwerte stark das Aroma von Lebensmitteln beeinflussen [2; 83]. Aufgrund der sekundären Aminofunktion von Prolin ist eine Desaminierung während des Strecker-Abbaus nicht möglich. Dennoch ist diese Aminosäure zentral für die Bildung von Röstaromen und Bitterstoffen im Zuge der Maillard-Reaktion verantwortlich [84; 85].

Die Reaktion von α -Dicarbonylverbindungen mit nukleophilen Strukturelementen von Makromolekülen ist vor allem unter physiologischen Bedingungen von Interesse. Aufgrund der hohen Reaktivität und der vielfältigen Entstehungsmöglichkeiten (Abschnitt 1.1.1) spielen dabei MGO und GL eine herausragende Rolle. Sie sind in der Lage, die Nukleinbasen der DNA zu modifizieren, wobei Guanin und Adenosin die höchste Reaktivität aufweisen [86]. Als Produkte wurden mono- und bisubstituierte Verbindungen identifiziert [87; 88]. Diese

Modifikationen und die MGO-induzierte DNA-Protein-Quervernetzungen [89] erklären eventuell die mutagene Wirkung von MGO [90; 91]. Proteine besitzen ebenfalls nukleophile Gruppen. Ihre Modifizierung durch α -Dicarbonylverbindungen wird ausführlich in Abschnitt 1.2 beschrieben. Die Bedeutung dieser wichtigen Folgereaktionen *in vivo* und im Lebensmittel wird ebenfalls dort dargestellt.

1.1.3 Nachweis von α -Dicarbonylverbindungen

Aufgrund hoher Reaktivität, geringer Konzentrationen und der unterschiedlichen Polarität der verschiedenen Strukturen ist die Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen eine besondere Herausforderung der modernen analytischen Chemie. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgt nahezu ausschließlich nach dem Derivatisieren mit geeigneten Abfangreagenzien und anschließender chromatographischer Trennung des Reaktionsgemisches. Die mit der Gaschromatographie bestimmbaren Oxime, Thiazolidine und 3-Amino-1,2,4-Triazine werden durch Reaktion der α -Dicarbonyle mit Hydroxylamin [92], Cysteamin [93] bzw. Aminoguanidin gebildet [94; 95]. Diese können mit unspezifischen Flammenionisations- (FID) und massenspektrometrischen (MS) oder elementspezifische Elektroneneinfang- (ECD) und Stickstoff-Phosphor-Detektoren (NPD) analysiert werden. Für die flüssigkeitschromatographische Bestimmung sind besonders die Hydrazin- [28], Triaminopyrimidin- [96] und die 1,2-Diaminoderivate von Benzol [97] bzw. Naphthalin [58] geeignet. Die entstandenen Osazone, Pteridine bzw. Chinoxaline werden dabei entweder durch UV-, Fluoreszenz- (FLD) oder MS-Detektion bestimmt. In Abbildung 5 sind die wichtigsten Bestimmungsmethoden von α -Dicarbonylverbindungen zusammengefasst.

Trotz der Vorteile des Derivatisierens (erhöhte Sensitivität und Selektivität) ist eine kritische Beurteilung der Analyseergebnisse notwendig. Durch die unterschiedliche strukturelle Beschaffenheit der verschiedenen α -Dicarbonylverbindungen ist eine intensive Methodenentwicklung und -validierung vor der Bestimmung unerlässlich. Während unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten bei zu geringer Derivatisierungszeit zu falsch-negativen Ergebnissen führen können, sind aufgrund der verschiedenen Polaritäten und Flüchtigkeiten Diskriminierungen zwischen den Reaktionsprodukten möglich. Abfangreagenzien, wie o-Phenylendiamin (o-PD), verändern das Redoxpotential des untersuchten Systems und nehmen damit Einfluss auf oxidative Bildungsmechanismen oder verschieben das chemische Gleichgewicht. Die Analytik kann dann zu falsch-positiven Ergebnissen führen [97]. Neben dem Derivatisierungsmittel beeinflussen auch die Derivatisierungsbedingungen die Richtigkeit des Ergebnisses. So kann z.B. in biologischen

Proben bei einem alkalischen pH-Wert MGO aus den Triosephosphaten DHAP und G3P gebildet werden [41].

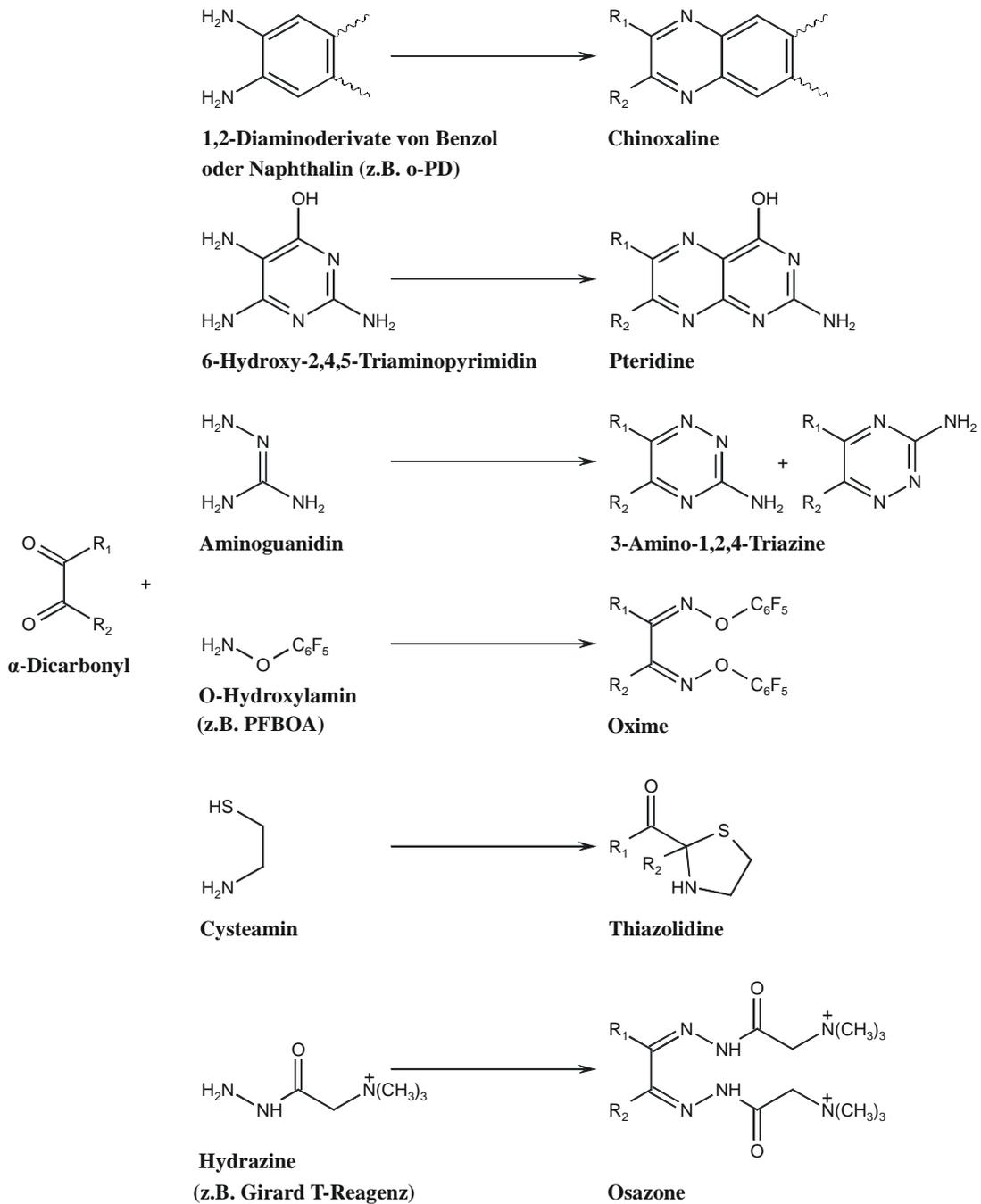


Abbildung 5: Derivatisierungsmöglichkeiten zum Nachweis von α -Dicarbonylverbindungen

Neben der Analyse von Modellinkubationen zur Aufklärung der Bildungsmechanismen sind Lebensmittel und biologische Proben auf α -Dicarbonylverbindungen untersucht worden. Der Schwerpunkt lag vor allem auf kurzkettigen Strukturen wie GL, MGO oder DA. Die untersuchten Lebensmittel waren vor allem fermentativ oder stark hitzebehandelte Produkte. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in ausgewählten Lebensmitteln bestimmten Gehalte.

Tabelle 1: Gehalte verschiedener α -Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln

Lebensmittel	α -Dicarbonylverbindung [mg/l bzw. mg/kg]				Literatur
	GL	MGO	DA	3-DG	
Bier	0,02-0,04	0,09-0,24	0,04-0,05	-	[98]
Wein rot	0,74	0,91	2,75	-	[98]
rot	0,15-0,22	0,10-0,37	-	-	[92]
Wein weiß	0,50	2,90	0,96	-	[98]
weiß	0,18-0,84	0,16-0,29	-	-	[92]
weiß	-	0,11	-	-	[93]
Joghurt	0,63-0,92	0,61-1,28	0,90-2,23	-	[98]
Käse	4,29-41,14	1,98-10,89	0,59-2,87	-	[99]
Milchpulver	0,6-0,8	n. n. ^a	-	2,0-2,2	[100]
probiotischer Drink	1,4	1,6	-	8,6	[100]
Honig	0,2-2,7	0,4-5,4	-	79-1266	[101]
	0,3-13	0,8-33	0-4,3	143-1099	[102]
	0,1-10,9	0,2-2,9	-	75,9-808,6	[103]
Kekse	4,8-20,5	3,7-78,0	-	-	[104]
Kaffee (gebrüht)	-	25	-	-	[93]
	0,87	7,0	-	-	[105]

^a nicht nachweisbar

In verschiedenen Untersuchungen wurde die Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen genutzt, um den Herstellungsprozess von Lebensmitteln zu charakterisieren. So korrelieren GL und MGO mit der Röstung von Kaffee [106], der Fermentation und Oxidation von Wein [92] oder der Backzeit von Keksen [104]. Außerdem gab es Bestrebungen, die Authentizität von Honig durch den Gehalt von α -Dicarbonylverbindungen zu bestätigen [102; 103]. Obwohl 3-DG in hohen Konzentrationen in Honig nachgewiesen wurde, ist wenig über andere Maillard-spezifische α -Dicarbonyle in Lebensmitteln bekannt. Hellwig et al. bestimmten das 3-Desoxyoson der Galactose in lactosehydrolysierten Milchprodukten. 3-Desoxygalactoson konnte auch in galactosefreien Produkten nachgewiesen werden. Als Quelle wurde die Isomerisierung von 3-DG bestätigt [100]. Das Intermediat ist das 3,4-Didesoxyglucoson-3-en, das ebenfalls in Honig identifiziert wurde und den Vorläufer von HMF darstellt [102]. α -Dicarbonylverbindungen, die zunächst nur postuliert oder in Modellinkubationen nachgewiesen wurden, bestätigten die Maillard-Reaktion während der Bierherstellung und -alterung [107]. Durch Abfangreaktion der α -Dicarbonyle wurde in dieser

Studie außerdem die Bildung von Strecker-Aldehyden verhindert. Dadurch wurde der Einfluss dieser Substanzklasse auf das Aroma des Lebensmittels bestätigt. Eine weitere exogene Quelle von GL und MGO ist Trinkwasser [108]. Die α -Dicarbonylverbindungen entstehen hier wahrscheinlich während der Trinkwasseraufbereitung bei der Ozonierung aus den Huminstoffen [109]. Außerdem wurden MGO und GL in der urbanen Atmosphäre [110], in Schnee und Regenwasser [111] sowie im Zigarettenrauch [112] nachgewiesen.

Tabelle 2: Ausgewählte α -Dicarbonylverbindungen *in vivo*

Matrix	α -Dicarbonylverbindung [nmol/l bzw. nmol/g]						Literatur
	GL		MGO		3-DG		
	normal	DM/U	normal	DM/U ^a	normal	DM/U ^a	
Augenlinsen	-	-	-	-	0,4	5	[47]
Erythrozyten	-	-	-	-	13,8 ^b	92,4 ^b	[113]
Blut	-	-	256	479	-	-	[114]
Plasma	-	-	-	-	58,6 ^c	98,5 ^c	[115]
					1710 ^d		
Serum	584 ^e	2577 ^e	568 ^e	2444 ^e	-	-	[116]
Plasma	1154	1343	652	2193	160	500	[58]
		3808 ^f		1527 ^f		364 ^f	

^a Diabetes mellitus/Urämie

^b bezogen auf den Hämoglobingehalt der Erythrozyten (nmol/g Hb)

^c Ultrazentrifugation des Plasmas

^d Ethanolextraktion des Plasmas

^e Mittelwert der in der Studie aufgeführten Einzelwerte

^f Urämie-Patienten

Obwohl α -Dicarbonyle cytotoxisch wirken [117] und vor allem MGO mutagene und kanzerogene Eigenschaften aufweist [90; 105], ist die toxikologisch bedenkliche Aufnahme durch Lebensmittel gering [118]. Im Zusammenhang mit der Bildung, Wirkung und Entgiftung von α -Dicarbonylverbindungen *in vivo* sind vor allem GL, MGO und 3-DG in biologischen Proben bestimmt worden. Aufgrund der unter Abschnitt 1.1.1 dargestellten Bildungswege sind hier spezielle physiologische oder pathologische Zustände von Bedeutung. In Hungerperioden konnten infolge des Lipidstoffwechsel und der Gluconeogenese gesteigerte MGO-Gehalte in menschlichem Blutplasma bestimmt werden [43]. Aufgrund der Maillard-Reaktion *in vivo* sind vor allem bei Diabetes mellitus und assoziierten Folgeerkrankungen erhöhte Konzentrationen an α -Dicarbonylverbindungen in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten detektierbar. Bei gestörter Nierenfunktion (Urämie) können sich diese Verbindungen ebenfalls anreichern. Tabelle 2 zeigt Unterschiede zwischen

gesunden und erkrankten Probanden sowie zwischen den verschiedenen Kompartimenten. Auf die Bedeutung der Methodenentwicklung und Interpretation der Gehalte soll an dieser Stelle erneut hingewiesen werden. Während man durch Ultrazentrifugation als Schritt der Proteinabtrennung beim Aufarbeiten des Blutplasmas ausschließlich das freie 3-DG bestimmt, wird durch die Ethanolextraktion gebundenes 3-DG freigesetzt [115].

1.2 Proteinmodifizierung – Veränderung und Funktionalisierung biologischer Makromoleküle

Proteine bestehen aus Aminocarbonsäuren, die miteinander über die Peptidbindung verknüpft sind. Die Biopolymere variieren durch den verschiedenartigen Einbau der 20 proteinogenen L-Aminosäuren (Primärstruktur), der räumlichen Nahordnung (Sekundärstruktur) und der daraus resultierenden strukturellen Konformation (Tertiärstruktur). Auch unterscheiden sich Proteine in der Assoziation mehrerer gleicher oder verschiedener Peptidketten (Quartärstruktur). Biosynthetisch wird die Primärstruktur in den Ribosomen durch Translation der mRNA nach vorheriger Transkription der DNA des Zellkerns gebildet. Die Polymerisation erfolgt dabei vom amino- zum carboxyterminalen Ende der Peptidkette. Die anschließende korrekte Faltung und Oligomerisierung erfolgt aus energetischen Gründen und wird durch Chaperone kontrolliert. Diese stabilisieren die nicht-native Konformation oder binden zeitweise noch ungebundene Untereinheiten. Aufgrund der strukturellen Vielseitigkeit zeichnen sich Proteine durch ein breites Spektrum verschiedener physikalischer Eigenschaften aus und erfüllen dadurch unterschiedliche Aufgaben. Darüber hinaus erfolgen weitere wichtige physiologische Funktionalisierungen durch gezielte co- oder posttranslationale Modifizierungen.

Neben dieser systematischen Modifizierung zur Steuerung verschiedener biochemischer Prozesse sind zusätzliche enzymatische und chemische Veränderungen von Proteinen während des Alterns und bei pathologischen Zuständen oder bei der Lagerung und Verarbeitung von Lebensmitteln von Bedeutung. Zusätzlich bietet die technologisch-gerichtete Modifizierung von Proteinen die Möglichkeit physikalisch-chemische Eigenschaften gezielt zu beeinflussen, um damit eine Funktionalisierung zu erreichen.

1.2.1 Klassifizierung und Charakterisierung von Proteinmodifizierungen

Proteinmodifizierungen können in zwei Kategorien unterteilt werden: 1. in die proteolytische Spaltung eines Teils der Sequenz und 2. in die Veränderung einzelner Aminosäuren. Die Art der Modifikation ist dabei abhängig von der Anzahl der beteiligten Aminosäuren. Während bei monovalenten Strukturen eine Aminosäure durch Redoxreaktion

oder kovalente Bindungen verschiedener Substrate modifiziert wird, werden in bi- oder polyvalenten Modifikationen zwei bzw. mehrere Aminosäuren miteinander verknüpft. Diese Quervernetzung zwischen den Peptidketten kann entweder intra- oder intermolekular erfolgen.

Enzymatisch induzierte co- oder posttranslationale Proteinmodifizierungen *in vivo*

Physiologische Prozesse, wie [119]:

- Aktivierung/Inaktivierung der Enzymaktivität,
- Regulation der Genexpression,
- zelluläre Lokalisierung,
- Modulation der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen,
- Markierung für den proteosomalen Abbau

werden durch selektive Veränderungen ausgewählter Aminosäuren der Proteinsequenz bewirkt. Diese enzymatisch gesteuerten Modifizierungen sind [119]:

- Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten,
- Reaktion freier Aminogruppen mit Ubiquitin,
- Acetylierung *N*-terminaler Serin-, Alanin und Methioninreste,
- Mono-, Di- oder Trimethylierung von Alanin, Methionin oder Lysin,
- *N*- oder *O*-Glycosylierung mit Mono-, Di- oder Oligosacchariden,
- Nitrosylierung von Cystein

Grundsätzlich ist auch die reversible Disulfidbindung zweier Cysteinreste zum Cystin als eine Proteinmodifizierung aufzufassen. Diese Quervernetzung ist oftmals für die korrekte Faltung des Proteins und bei den Enzymen für ihre Aktivität verantwortlich. Das Tripeptid L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin (Glutathion) schützt durch die reversible Disulfidbindung essentielle Thiol-Gruppen von Proteinen oder bestimmt durch seine Dimerisierung den Redox-Zustand der Zelle [120]. Die Quervernetzung von Proteinen kann *in vivo* zusätzlich über enzymatisch erzeugte Isopeptidbindungen erfolgen. Als Beispiel ist die Verknüpfung des L- γ -Glutamylrestes mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins durch Transglutaminase während des Prozesses der Wundheilung zu nennen [121]. Durch enzymatische Oxidation von Lysin und 5-Hydroxylysin durch Lysinoxidase und anschließende kovalente Quervernetzung wird die Struktur von Kollagenfasern stabilisiert. Die gebildeten α -Aminoaldehydreste [122] sind in der Lage durch Aldolreaktionen untereinander und/oder durch die Reaktion mit Lysin-, 5-Hydroxylysin- oder Histidinseitenketten lineare (Hydroxy)lysinonorleucine [123], Merodesmosine [124], cyclische Desmosine [125] oder Pyridinoline [126] zu bilden. Neben

den enzymatisch erzeugten Aminosäuremodifikationen werden Proteine zusätzlich durch chemische Reaktionen modifiziert.

Chemische Proteinmodifizierungen *in vivo* und im Lebensmittel

Veränderungen von Proteinen durch chemische Reaktionen sind spontane Prozesse, die entweder thermisch- oder kinetisch gesteuert ablaufen. Im Folgenden werden unterschiedliche Aminosäuremodifikationen beschrieben, wie sie unter den im Lebensmittel oder *in vivo* vorherrschenden Bedingungen gebildet werden.

Methionin wird durch reaktive Sauerstoffspezies zum Methioninsulfoxid oxidiert, wobei die biologische Aktivität des Proteins verloren gehen kann [127]. Als weiteren Marker des oxidativen Stresses wurde die bivalente Aminosäuremodifikation o,o'-Dityrosin etabliert [128]. 3-Nitrotyrosin repräsentiert den Nitrosierungsgrad von Proteinen. Da bei Entzündungsprozessen neben reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auch Stickoxid gebildet wird, ist diese Aminosäuremodifikation ebenfalls *in vivo* von Bedeutung [129]. Bei der Lebensmittelherstellung besteht durch thermische oder alkalische Prozesse die Möglichkeit der chemischen Quervernetzung. Die dabei gebildeten Isopeptide [130] oder Dehydroalanin-induzierten Aminosäuren Lysinoalanin und Histidinoalanin [131] haben Anteil an der Proteinpolymerisierung unter drastischeren Reaktionsbedingungen.

Wie in Abschnitt 1.1.1 bereits dargestellt, spielt die Maillard-Reaktion sowohl *in vivo* als auch im Lebensmittel eine entscheidende Rolle. Die primären Aminogruppen der N-terminalen Enden und der Lysinseitenketten werden im Zuge der nicht-enzymatischen Bräunung modifiziert, wobei die entsprechenden Amadori-Produkte die ersten stabileren Aminosäuremodifikationen darstellen. Während der konventionellen Säurehydrolyse des Proteins werden Amadori-Produkte zerstört und das freie Amin sowie Furoyl- und Pyridonylderivate gebildet. Unter kontrollierten Bedingungen entstehen aus N^ε-Fructoselysins ca. 10 % Pyridosin und ca. 30-40 % Furosin ([132], Tabelle 3). Entsprechende N^α-(2-Furoylmethyl)-Derivate der α-Aminogruppe ausgewählter Aminosäuren konnten ebenfalls nachgewiesen werden [133-135]. Stabile Endprodukte N-terminaler Proteinmodifizierung sind Pyrazinone. In Inkubationen von Modellpeptiden oder Insulin mit GL oder MGO wurden diese fluoreszierenden Verbindungen nachgewiesen [136]. Weitere Maillard-induzierte Lysinmodifikationen werden in der Tabelle 3 angegeben.

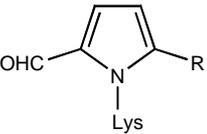
Wichtige Edukte für die Bildung dieser Verbindungen sind die in Abschnitt 1.1.1 beschriebenen α-Dicarbonylverbindungen. So wurden als direkte Vorläufer von GALA, von Formylin und Pyrralin das GL [137], 3-Desoxypentosen [138] bzw. das 3-Desoxyglucoson [139] identifiziert. Die N^ε-Lysinamide der Ameisen-, Essig-, Glycerin- und Milchsäure

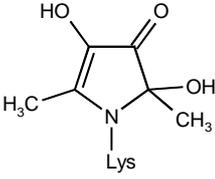
entstehen u. a. durch Reaktion der ϵ -Aminogruppe mit dem 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson und anschließender β -Spaltung [140].

Tabelle 3: Monovalente Lysin-Modifikationen (Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe)

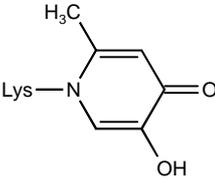
Struktur	R	Trivialname (Abkürzung)	Literatur
$\text{Lys}-\text{NH}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	H	<i>N</i> ^ε -Carboxymethyllysin (CML)	[141]
	CH ₃	<i>N</i> ^ε -Carboxyethyllysin (CEL)	[142]

$\text{Lys}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$	H	<i>N</i> ^ε -Formyl-Lysin	[143]
	CH ₃	<i>N</i> ^ε -Acetyl-Lysin	[140]
	CH ₂ OH	Glycolsäurelysylamid (GALA)	[137]
	COOH	Oxalsäuremonolysylamid (OMA)	[144]
	CHOH – CH ₃	<i>N</i> ^ε -Lactoyl-Lysin	[140]
	CHOH – CH ₂ OH	<i>N</i> ^ε -Glycerinyl-Lysin	[140]

	H	Formylin	[138]
	CH ₂ OH	Pyrralin	[145]

		<i>N</i> ^ε -Pronyl-Lysin	[146]

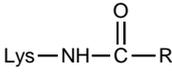
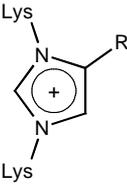
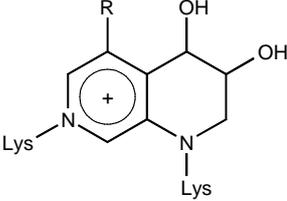
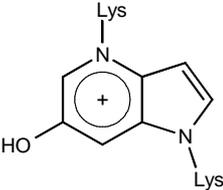
$\text{Lys}-\text{NH}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_5\text{H}_4\text{O}$		Furosin	[147-149]

		Pyridosin	[150]

Die Bildungsmechanismen des CMLs, der mit Abstand bedeutendsten monovalenten Lysinmodifikation, sind vielfältig. Es besteht die Möglichkeit der oxidativen Fragmentierung des Amadori-Produkts in CML und Erythronsäure [141]. Weiterhin bilden GL und GLC durch intramolekulare Disproportionierung bzw. Oxidation des Imin-Intermediats dieses stabile Endprodukt [151]. Im Gegensatz zum CML ist als Quelle für das homologe CEL nur

die Reaktion mit MGO bekannt [142]. Neben den monovalenten Strukturen werden außerdem bivalente Modifikationen während der Maillard-Reaktion beschrieben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Bivalente Lysin-Lysin-Modifikationen (Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe)

Struktur	R	Trivialname (Abkürzung)	Literatur
	CH ₂ -NH-Lys	Glyoxal-Lysin-Amid (GOLA)	[137]
	H	Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD)	[152]
	CH ₃	Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD)	[153; 154]
	CH ₂ -(CHOH) ₂ -CH ₂ OH	3-Desoxyglucoson-Lysin-Dimer (DOLD)	[155]
	(CHOH) ₃ -CH ₂ OH	Glucose-Lysin-Dimer (GLUCOLD)	[156]
		Pyraziniumradikalkation (CROSSPY)	[25; 157]
	(CHOH) ₃ -CH ₂ OH	Crossline	[158]
		Vesperlysin A	[159-161]

Auch bei der Quervernetzung von zwei Lysinseitenketten sind reaktive α -Dicarbonylverbindungen wichtig. Die Bildung der Imidazolium-Salze GOLD [152], MOLD [153] und DOLD [155] wird über die Reaktion des entsprechenden α -Dicarbonyls unter Beteiligung eines weiteren α -Dicarbonylmoleküls und Fragmentierung der um ein C-Atom verkürzten Säure postuliert. Das Lysinamid GOLA entsteht nach der Reaktion der ϵ -Aminogruppe mit GL. Zusätzlich kann dieses Crosslink, ähnlich wie CML, durch oxidative Fragmentierung des Amadori-Produkts gebildet werden [137]. In Reaktionsgemischen von N^{α} -Acetyl-L-Lysin mit Glucose wurden zwei Epimere der fluorophoren Quervernetzung Crossline identifiziert [158]. Als Intermediat wird das Lederer-Glucoson [7] vorgeschlagen, das nach Reaktion mit dem Amadori-Produkt die bivalente Lysinmodifikation bildet [156]. Hofmann et al. identifizierten GLC als Precursor des Pyraziniumradikalkations [25]. Diese Quervernetzung korreliert mit der Bildung von Melanoidinen und der Bräunung in GLC-

Rinderserumalbumin-Inkubationen [157]. Als Vorläufer des Vesperlysin A werden neben Glucose [160] vor allem Ascorbinsäure, Ribose und Threose beschrieben [161], wobei die genauen Reaktionsmechanismen unbekannt sind.

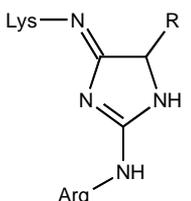
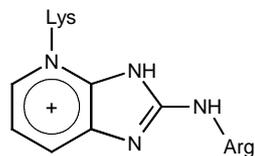
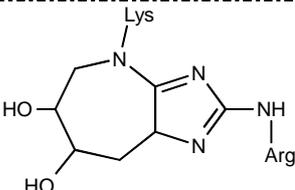
Tabelle 5: Monovalente Arginin-Modifikationen (Arg kennzeichnet die Modifizierung der Guanidinogruppe)

Struktur	R	Trivialname (Abkürzung)	Literatur
	H	<i>N</i> ^ω -Carboxymethylarginin (CMA)	[162]
	CH ₃	<i>N</i> ^ω -Carboxyethylarginin (CEA)	[163; 164]
	H	Glyoxal-Imidazolinon 1 (G-H1)	[165; 166]
	CH ₃	Methylglyoxal-Imidazolinon 1 (MG-H1)	[167]
	CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ OH	Propyl-Imidazolinon (PIO)	[168]
	CH ₂ – (CHOH) ₂ – CH ₂ OH	3-Desoxyglucoson-Imidazo. 1 (3DG-H1)	[169]
	H	nicht beschrieben (G-H2)	
	CH ₃	Methylglyoxal-Imidazolinon 2 (MG-H2)	[165]
	CH ₂ – (CHOH) ₂ – CH ₂ OH	3-Desoxyglucoson-Imidazo. 2 (3DG-H2)	[170]
	H	Glyoxal-Imidazolinon 2 (G-H3)	[171]
	CH ₃	Methylglyoxal-Imidazolinon 3 (MG-H3)	[165]
	CH ₂ – (CHOH) ₂ – CH ₂ OH	3-Desoxyglucoson-Imidazo. 3 (3DG-H3)	[170]
		Argpyrimidin (AP)	[172]
		Tetrahydropyrimidin (THP)	[173]

Neben der ε-Aminogruppe des Lysins ist die Guanidinogruppe des Arginins eine weitere Aminosäureseitenkette, die im Zuge der Maillard-Reaktion vielfältig modifiziert wird. Hierbei werden für die monovalenten Strukturen (Tabelle 5) ausschließlich α-Dicarbonyl-

verbindungen als unmittelbare Vorläufer genannt. Neben den linearen Modifikationen CMA [162] und CEA [163; 164], die aus der Reaktion mit GL bzw. MGO resultieren, sind vor allem cyclische Strukturen, wie Imidazolinone und Pyrimidine von Bedeutung. Für die Imidazolinone können drei Konstitutionsisomere mit unterschiedlicher Stellung der δ -Aminogruppe postuliert werden. Während in den GL-, MGO- bzw. 3-DG-Arginin-Modifikationen Typ 2 und 3 (Tabelle 5) der δ -Stickstoff endocyclisch vorliegt, reagiert die Guanidinogruppe im Isomer Typ 1 zum Imidazolinon mit exocyclischen δ -Stickstoff [165; 170]. Im MG-H1 konnten durch die Doppelbindung am Stickstoffatom zwei zusätzliche tautomere Formen nachgewiesen werden [167]. Weitere Isomere entstehen durch Racemisierung des chiralen Zentrums im Imidazolinonring. So wurden in Modellinkubationen für MG-H2 und MG-H3 jeweils zwei Diastereomere zu gleichen Anteilen gebildet [165]. Als stabiles, fluoreszierendes Endprodukt der Reaktion von Arginin mit MGO wurde zunächst das 5-Methylimidazol [174] beschrieben, das in weiteren Untersuchungen allerdings als Pyrimidinderivat AP [172] identifiziert wurde. Ein weiteres Derivat, das THP [173], entsteht ebenfalls durch Reaktion der Guanidinogruppe mit zwei Molekülen MGO und ist aufgrund seiner Struktur ein möglicher Vorläufer des APs.

Tabelle 6: Bivalente Lysin-Arginin-Modifikationen
(Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe, Arg die Modifizierung der Guanidinogruppe)

Struktur	R	Trivialname (Abkürzung)	Literatur
	H	Glyoxal-Lys-Arg-Crosslink (GODIC)	[175]
	CH ₃	Methylglyoxal-Lys-Arg-Crossl.(MODIC)	[175]
	CH ₂ – (CHOH) ₂ – CH ₂ OH	3-Desoxyglucoson-Lys-Arg-Crosslink (DODIC)	[176]
		Pentosidin	[177]
		Glucosepan	[178]

Weitere bivalente Aminosäuremodifikationen sind Lysin-Arginin-Quervernetzungen. Diese wurden sowohl in Modellinkubationen als auch in Lebensmitteln und *in vivo*

nachgewiesen. Tabelle 6 zeigt die wichtigsten Strukturen. α -Dicarbonylverbindungen sind auch bei diesen Modifikationen von zentraler Bedeutung. Während bei den „-ODIC“-Verbindungen die jeweiligen namensgebenden α -Dicarbonyle (Tabelle 6) durch Aldiminbildung [175] unmittelbare Vorläufer sind, wird Glucosepan [178] aus dem Amadori-Produkt des Lysins und dessen Umlagerung in das Lederer-Glucoson gebildet. Nach Ringschluss und Wassereliminierung dieser intermediären α -Dicarbonylverbindung folgt die Reaktion mit der Guanidinogruppe des Arginins [7; 176]. Durch Inkubation von proteingebundenem Lysin und Arginin mit Pentosen, wie Ribose, Arabinose und Xylose konnte das fluoreszierende Pentosidin [177] isoliert werden. Es entsteht über ein bicyclisches Intermediat [176], das oxidiert wird und anschließend Wasser abspaltet.

Die Analytik der einzelnen Aminosäuremodifikationen muss der entsprechenden Struktur angepasst werden. Während die Bestimmung der freien Verbindungen in Modellinkubationen, Lebensmitteln oder physiologischen Proben verhältnismäßig einfach ist, können proteingebundene Modifikationen erst nach vollständiger Hydrolyse der Peptidbindungen analysiert werden. Die Totalhydrolyse des Proteins erfolgt zumeist durch Einwirkung starker Säuren und hoher Temperaturen. Da viele der beschriebenen Strukturen unter diesen extremen Bedingungen zerstört werden, wurden Methoden etabliert, die eine Hydrolyse des Proteins durch mehrere Enzyme beinhalten [137; 179]. Weiterhin entstehen einige der oben genannten Verbindungen erst im Verlauf der Säurehydrolyse und stellen somit keine nativen Proteinmodifikationen dar. Als Beispiele hierfür sind das Furosin und das Glyoxal-Imidazolinon 3 (G-H3) zu nennen, die erst während der Säurehydrolyse aus dem Amadori-Produkt bzw. dem Dihydroxyimidazolidin und dem CMA gebildet werden [132; 180]. Neben der chemisch-instrumentellen Bestimmung der unterschiedlichen Modifikationen wurden für einige Strukturen immuno-chemische Analyseverfahren entwickelt. Nachteile dieser schnellen und kostengünstigen Methoden sind ihre geringere Spezifität, ihre Matrix-abhängigkeit und die Möglichkeit von Kreuzreaktion [181; 182].

1.2.2 Bedeutung von Proteinmodifizierungen in Lebensmitteln und *in vivo*

Die Modifizierung von Lebensmittelproteinen reicht von der enzymatischen Proteolyse in fermentierten Produkten über chemische Modifikation einzelner Aminosäureseitenketten bis zur kovalenten Polymerisation der Makromoleküle während der Herstellung, Lagerung und Verarbeitung. Bekanntes Beispiel für proteolytische Proteinmodifizierung in fermentierten Lebensmitteln ist bei der Käseherstellung und -reifung die Spaltung der Caseine durch Labenzym, Starterbakterien oder sekundäre Mikroorganismen [183; 184]. Chemische Proteinmodifizierungen sind z. B. die Oxidationen und Proteinquervernetzungen bei teilweise

extremen Herstellungs- und Verarbeitungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur usw.). Die gebildeten Aminosäuremodifikationen bestimmen dabei maßgeblich die Textur sowie die ernährungsphysiologischen Eigenschaften des Lebensmittels. So ist die oxidative Bildung von Disulfidbrücken für die strukturellen Veränderungen beim Kochen von Fleisch [185] sowie deren Transfer für die viskoelastischen Eigenschaften des Teiges von Backwaren verantwortlich [186]. Die Gelierung und die damit verbundene Texturveränderung von Fischmuskelfleisch bei der Herstellung von Surimi wird ebenfalls auf die Ausbildung von Crosslinks zurückgeführt. Die in diesem traditionell japanischen Lebensmittel nachgewiesenen Aminosäuremodifikationen sind die durch Transglutaminase erzeugte Isopeptidbindungen [187]. Als weiteren positiven Effekt der Proteinmodifizierung wird die gesteigerte antioxidative Kapazität eines Lebensmittels durch Bildung von MRPs wie Pronyl-Lysin diskutiert [146; 188].

Neben den gewünschten Einflüssen auf die Textur und auf die oxidative Stabilität, verringern Modifizierungen von Proteinen allerdings auch deren Verdaulichkeit und damit die ernährungsphysiologische Qualität des Lebensmittels. Thermisch- und alkali-induzierte Crosslinks wie Lysino-, Histidinoalanin und Lanthionin reduzieren wesentlich die Effektivität von Verdauungsenzymen [131; 189; 190]. Darüber hinaus führen Lysinoalanin und andere stabile Lysinmodifikationen der Maillard-Reaktion zum irreversiblen Verlust dieser für den Menschen essentiellen Aminosäure. Die Bedeutung der Maillard-Reaktion zur Bewertung der ernährungsphysiologischen Qualität von Lebensmittelproteinen wird durch die Verwendung von Aminosäuremodifikationen, wie Furosin [191], CML [192], Pyrralin [193] oder Pentosidin [194] hervorgehoben. Außerdem konnten Gehalte von GODIC, MODIC oder Glucosepan in Lebensmitteln in ähnlichen Größenordnungen wie von Lysino- und Histidinoalanin bestimmt werden [131; 195].

Da die Modifizierungsrate durch Reaktionen der nicht-enzymatischen Bräunung mit der Temperatur stark zunimmt, ist es theoretisch möglich, die Bestimmung von Aminosäuremodifikationen als „Prozesskontrolle“ bei der Herstellung von hitzeempfindlichen Lebensmitteln zu wählen. So wurden z.B. in Modellversuchen die Bildung von CML, Furosin oder Pronyl-Lysin beim Rösten von Kaffee [196], Erhitzen von Milch [197; 198] oder beim Backen von Brot [146] untersucht. Durch Temperatureinwirkung bei der Sprühtrocknung und Sterilisation von Babynahrung sind bei diesem sensiblen Lebensmittel Lysinblockade und Polymerisation von großer Bedeutung. Hier bedarf es einer ständigen Kontrolle [199]. Die Bildung von MRPs wurde auch in fermentierten Lebensmitteln wie Bier und Käse während Produktion und Lagerung untersucht. Der AP-Gehalt in kommerziell erhältlichen Bieren

korreliert direkt mit dem Würzegehalt und der Farbe und ermöglicht damit Rückschlüsse auf die jeweiligen Herstellungsbedingungen [200]. Die Reifung von Käse kann durch die Bestimmung von N^α - und N^ϵ -2-Furoylmethylaminosäuren, also durch MRPs der frühen Phase, charakterisiert werden [201].

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, werden Proteine *in vivo* für bestimmte Aufgaben und Funktionen umfangreich proteolytisch oder mono- bzw. polyvalent modifiziert. Die entsprechenden Veränderungen wurden eingehend untersucht und sollen an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden. Zusätzliche Bedeutung erhielten Proteinmodifizierungen mit dem Nachweis der Maillard-Reaktion unter physiologischen Bedingungen. Dieser erfolgte durch die chromatographische Auftrennung verschiedener Fraktionen (Sammelbegriff HbA₁) des Hämoglobins [202] und der Identifizierung des Amadori-Produktes am N-terminalen Ende der β -Kette der Fraktion HbA_{1c} [203]. Der Anstieg der Fluoreszenz von Proteinen mit gesteigerter Glucosylierung [204] deutet auf die komplexen Folgereaktionen der nicht-enzymatischen Bräunung hin. Vor allem im Alter oder bei Diabetes mellitus werden Hautcollagen, Augenlinsenprotein oder Blutproteine vermehrt durch Glucose modifiziert. Sowohl N^ϵ -Fructoselysin (FL) [205] als auch fluoreszierende (Pentosidin [205; 206], Crossline [207], Vesperlysin A [161], AP [206]) sowie nicht-fluoreszierende (CML [205], CEL [142], Glucosepan [208], MG-H1/H2 [209], GOLD/MOLD [210]) Lysin- und Argininmodifikationen konnten in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben nachgewiesen werden. Die stabilen Strukturen werden im angelsächsischen Sprachgebrauch aufgrund des zunächst beschriebenen Bildungsmechanismus als „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) bezeichnet. Neben Glucose sind reaktive α -Dicarbonylverbindungen direkte Vorläufer für AGEs. Da die Quellen dieser Strukturen (Abschnitt 1.1.1) vielfältig sind, ist auch die Bildung der resultierenden Aminosäuremodifikationen *in vivo* nicht unmittelbar auf erhöhte Glucosegehalte beschränkt. Trotz normaler Blutzuckerwerte können infolge erhöhter α -Dicarbonylgehalte durch Oxidation von Zuckern [22; 28; 211] oder Lipiden [55-57], bei Niereninsuffizienz [58; 212; 213] und genetischer Disposition [214] Proteinmodifizierungen und gesteigerte AGE-Gehalte gemessen werden. Die Oxidation von Serin durch Myeloperoxidase [215] oder NADPH-Oxidase [60] bei inflammatorischer Stimulation stellt eine weitere AGE-Quelle *in vivo* dar, da intermediär gebildetes GLC (Abschnitt 1.1.1) unmittelbarer Vorläufer des CMLs ist [151]. Neben der endogenen AGE-Synthese werden diese stabilen Verbindungen zusätzlich durch Lebensmittel aufgenommen. Bei Patienten mit Nierenerkrankungen führt dies zur Erhöhung der Serum-AGE-Gehalte [216]. Absorption und anschließende Exkretion der Lebensmittel-AGEs ist dabei abhängig von der jeweiligen

Aminosäuremodifikation und dem Verhältnis zwischen proteingebundener und freier Form [217]. Einen Überblick zu den bekannten Mechanismen der AGE-Bildung *in vivo* zeigt Abbildung 6.

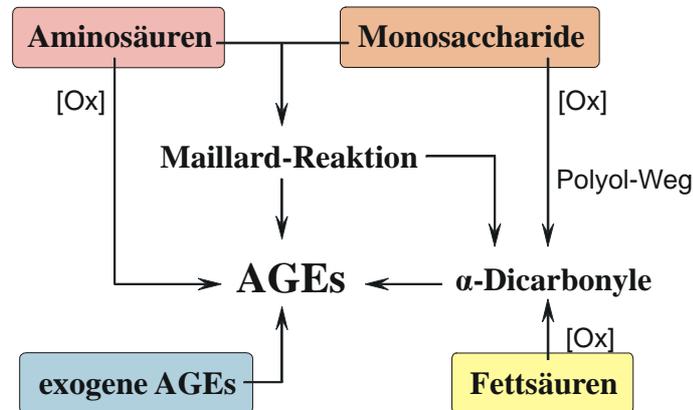


Abbildung 6: Mechanismen der AGE-Bildung

Neben der Funktion als Marker *in vivo* gibt es zahlreiche Belege, dass AGEs unmittelbar bei der Entwicklung von Folgekrankheiten im Alterungsprozess oder bei Diabetes mellitus sowie bei der Entstehung von Urämie und Alzheimer beteiligt sind [218]. Makro- (Arteriosklerose) und mikrovaskuläre Erkrankungen der Retina, des Nephrons und peripherer Nerven korrelieren direkt mit den AGE-Gehalten in den betreffenden Geweben [170]. Dabei wurden spezifische Rezeptoren identifiziert, die bei den verschiedenen pathologischen Zuständen, vermehrt gebildet und durch AGEs aktiviert werden. Sie führen zu Entzündungsprozessen und zellulären Dysfunktionen [219]. Ein sehr intensiv untersuchter pro-inflammatorischer Rezeptor ist der AGE-bindende Rezeptor (RAGE). Er gehört zur Familie der Immunoglobuline von Zelloberflächenmolekülen und ist auf Muskel-, Endothel-, Nervenzellen und Makrophagen lokalisiert. RAGE aktiviert Signalwege zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie intrazellulärer und vaskulärer Adhäsionsmoleküle [220]. Proteingebundenes CML wurde als Bindungsstelle von RAGE nachgewiesen und deren Wechselwirkung als Auslöser pathogener Gefäß- und Entzündungskomplikationen identifiziert [221].

1.2.3 Funktionalisierung durch Proteinmodifizierung

Aufgrund ihrer physiko-chemischen und strukturellen Merkmale besitzen Proteine zum Teil einzigartige funktionelle Eigenschaften. Die Ausbildung stabiler Schäume, Emulsionen und Gele oder die Möglichkeit der Beschichtung und Filmbildung wird dabei durch intrinsische (z.B. Aminosäuresequenz, Nettoladung, Ladungsverteilung) und extrinsische (z. B. Temperatur, pH, Ionenstärke) Faktoren beeinflusst [222]. Die funktionellen Eigenschaften werden durch zwei molekulare Aspekte bestimmt. Oberflächenbezogene Merkmale wie

Nettoladung, Ladungsverteilung oder sterische Aspekte haben unmittelbaren Einfluss auf die Löslichkeit, die Schaumbildung und die Emulgierbarkeit. Größe, Gestalt und Flexibilität von Proteinen regulieren die hydrodynamischen Eigenschaften wie Viskosität und Gelbildung [223]. Durch physikalische, chemische oder enzymatische Modifizierungen können diese Eigenschaften für Anwendungen in der Medizin, Pharma-, Lebensmittel- oder Kosmetikindustrie gezielt beeinflusst werden [222-224].

Schäume sind disperse Luft/Wasser-Gemische. Durch ihren amphiphilen Charakter adsorbieren Proteine mit ihren hydrophoben Bereichen an der Phasengrenze, verringern die Grenzflächenspannung und assoziieren durch intermolekulare Wechselwirkungen in kohäsive, viskoelastische Filme. Die verschiedenen Proteine unterscheiden sich im Bildungsvermögen und in der Stabilität der Schäume. Während β -Casein die Oberflächenspannung stark reduziert und schnell das Volumen des Systems erhöht, sind aufgrund begrenzter Protein-Protein-Wechselwirkungen die resultierenden Schäume relativ instabil. Dagegen bleibt bei Rinderserumalbumin die Tertiärstruktur an der Phasengrenze erhalten. Durch Ausbildung eines stabilen intermolekularen Netzwerks entstehen starke zusammenhängende Filme, die die Stabilität der Schäume erhöhen [223]. Modifizierungen von Proteinen sind in der Lage die Schaumbildung und -stabilität zu verbessern. So führt eine schonende Hitzebehandlung von Ovalbumin zur teilweisen Auffaltung der starren Konformation. Die Flexibilität und der Anteil hydrophober Abschnitte nehmen zu, womit die Schaumdichte erhöht und das Abfließen der Flüssigkeit verringert wird [225]. Die Schaumeigenschaften von Molkenproteinen können durch partielle enzymatische Hydrolyse beeinflusst werden [226]. Allgemein verschlechtern sich die Schaumeigenschaften mit steigendem Hydrolysegrad. Peptide mit dem Molekulargewicht von 3-5 kDa fördern allerdings die Schaumbildung und die Fraktionen über 7 kDa erhöhen dessen Stabilität [227]. Die Funktionalisierung von Proteinen kann außerdem durch Modifikation der Aminosäuren im Zuge der Maillard-Reaktion erfolgen [222]. Mono- und Polysaccharide binden als Amadori-Produkt kovalent an die primären Aminogruppen und verbessern sowohl Schaumvermögen als auch Schaumstabilität durch Entfaltung und Freilegung hydrophober Abschnitte sowie durch Proteinoligomerisierung [228]. Die Effekte sind dabei abhängig von der Reaktivität des verwendeten Zuckers [229].

Die oberflächenaktiven Eigenschaften von Proteinen bestimmen außerdem die Bildung und Stabilisierung von Öl-in-Wasser-Emulsionen. Die Faktoren (Adsorptionsrate an der Phasengrenze, Verringerung der Grenzflächenspannung, Filmbildung), die dieses disperse System beeinflussen, sind ähnlich der der schaumbildenden. Hervorzuheben ist die Verteilung

der hydrophoben Aminosäuren im Makromolekül, da die Oberflächenhydrophobizität direkt mit der emulgierenden Wirkung korreliert [223]. Das Bildungsvermögen und die Stabilität einer Emulsion kann durch Modifizierung der Proteine verbessert werden. Die Methoden sind aufgrund der molekularen Grundlagen dieser funktionellen Eigenschaft ähnlich denen zur Verbesserung des Schaumverhaltens. So wird durch trockenes Erhitzen die Hydrophobizität der Oberfläche von Ovalbumin vergrößert. Dies führt zu einem Anstieg der Emulsionsaktivität (maximale Phasengrenzfläche pro Gewichtseinheit des Proteins) und -stabilität [230]. Glycosylierung mit Glucose oder Galactomannan erhöhen entweder durch Konformationsänderung des Proteins [231] oder durch physikalischen Schutz des Proteinfilms der Öltröpfchen die Stabilität der Emulsion [232]. Enzymatische Umwandlungen von Asparagin und Glutamin in die entsprechenden Säuren wirken ebenfalls stabilisierend. Die Auswirkung dieser Art der Modifizierung auf die Emulsionsaktivität ist hingegen vom Protein abhängig. So wird dieser Parameter bei Sojaprotein [233] erhöht, während die maximale Phasengrenzfläche pro Gewichtseinheit bei einem Haferproteinisolat durch Deamidierung reduziert wird [234].

Für die Bildung von Schäumen und Emulsionen sind die Wechselwirkungen mit den Phasengrenzen Protein-Gas bzw. Protein-Fett bedeutsam. Zur Ausbildung eines Gels sind Interaktionen zwischen Proteinen essentiell. Ein Gel ist ein disperses System bei dem die disperse Phase ein dreidimensionales Netzwerk bildet und dabei das Dispersionsmittel immobilisiert. Es besitzt viskoelastisches Verhalten und vereint daher die Eigenschaften einer Flüssigkeit mit denen eines Festkörpers. Strukturell können Proteingele nach Flory [235] in:

- durch physikalische Polymerisation gebildete Netzwerke mit größtenteils ungeordneten, jedoch einigen lokal geordneten Bereichen oder
- ungeordnete Strukturen aus aggregierten Dispersionen eingeteilt werden.

Namensgebend für den gesamten Prozess der Gelierung ist die thermoreversible Sol-Gel-Umwandlung einer erhitzten Gelatinelösung. Dieses zur ersten Klasse zählende Proteingel entsteht durch Bildung geordneter Bereiche, ähnlich der Konformation des nativen Collagens. Die hoch geordneten Triplehelices oder „junction zones“, die hauptsächlich durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden, werden durch Regionen einzelner Proteinketten unterbrochen [236; 237]. Während bei Gelatine die Gelbildung mit der Renaturierung der Peptidketten einhergeht, gelieren nichtfibrilläre Proteine durch Denaturierung der nativen Konformation. Globuläre Proteine werden durch Hitze oder extreme pH-Werte denaturiert und lagern sich durch intermolekulare Wechselwirkungen (kovalente Vernetzung, polare und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoff- und Salzbrücken) zu dreidimensionalen

Netzwerken an. Da durch partielle Denaturierung vermehrt hydrophobe Abschnitte freigelegt werden, dominieren diese Wechselwirkungen und bedingen den hauptsächlich thermo-irreversiblen Charakter dieser Gele [72; 238]. Die Eigenschaften eines Gels lassen sich durch Proteinmodifizierung systematisch beeinflussen. So wirken Zucker stabilisierend gegenüber der Hitzedenaturierung von Molkeproteinen [239]. Außerdem erhöht die Maillard-induzierte Polymerisation die Gelstärke von Ovalbumin [240]. Die Quervernetzung von Gelatine durch Transglutaminase [236; 241] oder Methacrylamid [242] unterstreicht den Einfluss kovalenter Crosslinks auf die Stabilität eines Hydrogels. Vor allem Transglutaminase ist eine der Möglichkeiten der Funktionalisierung von Proteinen. Diese Art der Quervernetzung erhöht die Stichfestigkeit von Joghurt [243]. Sie hat aber keinen Einfluss auf die ernährungsphysiologische Qualität, da weiterhin die Aminosäuren der Isopeptidbindungen während der Verdauung verfügbar sind [244].

Wie zuvor erwähnt, sind Proteine in der Lage kohäsive Filme auszubilden. Damit können sie in der Lebensmittelindustrie als „Essbare Beschichtung“ genutzt werden oder die klassischen erdölbasierenden Folien als nachwachsendes, biologisch abbaubares Biopolymer ersetzen. Die Proteinquellen sind vielfältig. Quantitativ bedeutend sind aufgrund der Rohstoffe tierische Proteine wie Gelatine [245] und Milchproteine [246] sowie pflanzliche Proteinisolate von Soja oder Getreide [247; 248]. Je nach Anwendung müssen diese Folien bestimmte Anforderungen erfüllen. Von Bedeutung sind vor allem die Barriereigenschaften [249] gegenüber Wasserdampf, Sauerstoff oder Aromastoffen und die Beständigkeit gegenüber Lösungsmitteln oder mechanischen Beanspruchungen [250]. Um diese Eigenschaften gezielt zu beeinflussen, werden die Proteine entweder enzymatisch oder chemisch modifiziert. Als Modifier dienen bifunktionelle Strukturen wie Glutaraldehyd [251], GL [252] oder Diisocyanate [253] und andere aminosäurereaktive Substanzen wie Genipin [254] oder Formaldehyd [252]. Die chemische aber auch die enzymatische Vernetzung mit Transglutaminase reduzieren das Quellvermögen sowie die Löslichkeit und erhöhen die Steifigkeit der Folien [252]. Ziel der Forschung ist die physikalischen Parameter mit den molekularen Eigenschaften zu korrelieren, um hochfunktionelle Produkte reproduzierbar zu erzeugen.

2 Zielstellung

Die Modifizierung von Proteinen bei der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln als auch unter physiologischen Bedingungen ist von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus können die Eigenschaften dieser Makromoleküle gezielt beeinflusst und sie damit für bestimmte Anwendungen funktionalisiert werden. Vor allem hochreaktive α -Dicarbonylverbindungen sind von Interesse, da sie aufgrund vielfältiger Bildungsmechanismen sowohl im Lebensmittel als auch *in vivo* wichtige Reaktionspartner mit Aminosäureseitenketten darstellen. Glyoxal und Methylglyoxal sind die mit Abstand bedeutendsten Strukturen, Arginin und Lysin aufgrund ihrer Reaktivität die bevorzugten Modifizierungsstellen im Protein. Trotz zahlreicher Untersuchungen zu den Reaktionsmechanismen konnten diese nicht abschließend aufgeklärt werden. Weiteren Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Proteinmodifizierung im Zusammenhang mit der Maillard-Reaktion besteht bei der Funktionalisierung von Proteinen und der Herstellung von Lebensmitteln mit geringer Temperatureinwirkung.

Ziel vorliegender Arbeit war es daher, detaillierte Einblicke in den Mechanismus der Argininmodifizierung durch Methylglyoxal zu erhalten. Dazu wurden wichtige Intermediate der Reaktion isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Durch Inkubation der Einzelverbindungen wurde dann der Reaktionsmechanismus aufgestellt, der die gegenseitigen Beziehungen der in der Literatur beschriebenen Methylglyoxal-Arginin-Modifikationen beschreibt. Besonderes Augenmerk lag auf den zentralen Intermediaten und den stabilen Endprodukten.

Der anwendungsbezogene Aspekt der Arbeit wurde durch die Untersuchung Maillard-modifizierter Gelatinefolien und durch die Bestimmung von Maillard-relevanten Verbindungen während der Käsureifung herausgearbeitet. Gelatine wurde in wässriger Lösung mit Glyoxal modifiziert. Die nach der Gelierung und Trocknung erhaltenen Folien wurden umfangreich charakterisiert. Die chemisch-physikalischen Parameter wurden dann mit anwendungsrelevanten Eigenschaften wie mechanische Beständigkeit und Gaspermeabilität korreliert. Die Bestimmung von Lysinmodifikationen der frühen sowie fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion während der Käsureifung diente als Anwendungsbeispiel für die Proteinmodifizierung bei der Lebensmittelherstellung. Gleichzeitig wurden wichtige α -Dicarbonylverbindungen sowohl bei der Lagerung von Sauermilchkäse unter definierten Bedingungen als auch bei kommerziell erhältlichen Goudas unterschiedlicher Reifegrade analysiert. Der Zusammenhang zwischen Aminosäuremodifizierung und α -Dicarbonylverbindungen wurde erarbeitet.

3 Einordnung und Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

3.1 Mechanistische Untersuchungen zu Proteinmodifikationen

Aufgrund der vielfältigen Bildungsmechanismen (Abschnitt 1.1.1) ist MGO eines der bedeutendsten α -Dicarbonyle. Es konnte in diversen Lebensmitteln und in physiologischen Proben nachgewiesen werden (Tabelle 1, Tabelle 2). Neben der intermolekularen Polymerisation in hochkonzentrierten Lösungen [255] ist die Reaktion mit nukleophilen Verbindungen von Bedeutung. Während der nicht-enzymatischen Bräunung sind hierbei die Seitenketten der Aminosäuren Lysin, Arginin und Cystein wichtigste Reaktionspartner, wobei die Guanidinogruppe des Arginins in Modellinkubationen sowohl reversibel als auch irreversibel den größten Anteil des MGOs bindet [174]. Wie in Abschnitt 1.2.1 gezeigt, gehören zu den irreversiblen Strukturen Proteinquervernetzungen (MODIC) und monovalente Modifikationen (CEA, Imidazolinon-Derivate, Pyrimidin-Derivate). Die Relevanz dieser Verbindungen wird neben der Bildung in Modellinkubationen durch den Nachweis in Lebensmitteln sowie physiologischen Proben verstärkt. Tabelle 7 zeigt die Gehalte einiger MGO-Arginin-Modifikationen in unterschiedlichen Matrices. Trotz der quantitativen Bestimmung ist wenig über den genauen Bildungsweg und den mechanistischen Zusammenhang dieser Verbindungen bekannt.

Tabelle 7: MGO-Arginin-Modifikationen in Lebensmitteln und physiologischen Matrices

Matrix	Argininmodifikation [nmol/l bzw. nmol/kg Protein]				Literatur	
	MG-H1	MG-H2	AP	MODIC		
Bier	-	-	< 27 ^a	-	[200]	
Cola	10,1 ^a	-	-	-	[256]	
Milch	roh	51 ^a 756 ^b	-	-	[256]	
	pasteurisiert	42 ^a 2066 ^b	-	-	[256]	
Brezelkruste	3947-5702 ^b		-	124; 306 ^b	[167; 195]	
Augenlinsen	klar	2848 ^b	1504 ^b	72 ^b	65,5 ^b	[209; 257]
	Katarakt	5278 ^b	3348 ^b	256 ^b	80 ^b	[209; 257]
Blut	frei	1 ^{a, c}	-	> 18 ^{a, c}	-	[170]
	gebunden	15540 ^{b, c}	-	< 500 ^{b, c}	4,1 ^{b, d}	[170; 257]

^a frei

^b proteingebunden

^c Blutplasma [nmol/l]

^d Serumalbumin [nmol/kg Protein]

3.1.1 Bildung von Methylglyoxal-Arginin-Modifikationen

Um den Mechanismus zwischen der Reaktion von MGO mit der Guanidinogruppe aufzuklären, wurde N^α -geschütztes L-Arginin unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4; 37 °C) mit frisch synthetisiertem MGO umgesetzt. Nach 24 h konnten sechs Verbindungen durch Ionenpaar-RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung gemessen werden (Abbildung 7). AP wurde durch Messung der nativen Fluoreszenz detektiert. Die analytischen Referenzsubstanzen wurden entweder synthetisiert oder aus Arginin-MGO-Inkubationen durch Ionenaustausch- und Ionenpaarchromatographie isoliert und aufgereinigt. Die Strukturauflösung erfolgte anschließend mittels ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie (NMR). Die Bestimmung der Summenformeln durch hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) bestätigte die chemische Struktur der Verbindungen. Neben dem CEA, den Imidazolin-Derivaten MG-H1 und MG-H3 sowie den Pyrimidinverbindungen THP und AP konnten zwei neue Modifikationen (7 + 8) detektiert werden. Da letztere sich schnell ineinander zu einem 1:1-Gleichgewicht umwandeln und gleichzeitig extrem labil waren, gelang es nicht die Strukturen abschließend aufzuklären. Die genauen Versuchsanleitungen und Ergebnisse sind detailliert in der Veröffentlichung „*Formation of Arginine Modifications in a Model System of N^α -tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal*“ [258] am Ende dieses Abschnitts wiedergegeben.

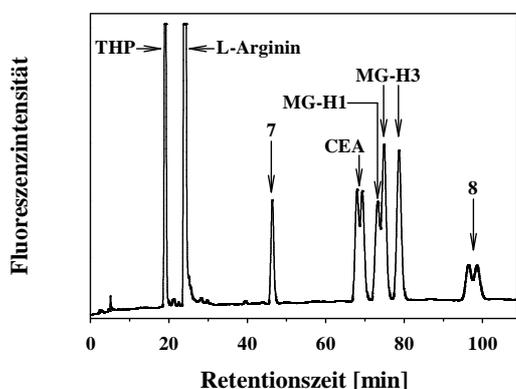


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm der N^α -*t*-Boc-Arginin-MGO-Inkubation nach 24 h

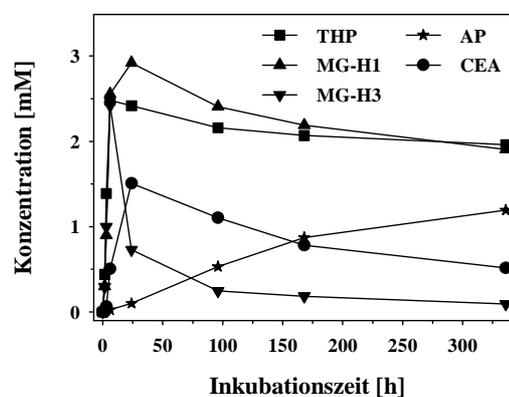


Abbildung 8: Konzentrationen wichtiger Verbindungen während der Inkubation von N^α -*t*-Boc-Arginin mit MGO

Abbildung 8 zeigt den Konzentrationsverlauf wichtiger Modifikationen bei 14-tägiger Inkubation von N^α -*t*-Boc-Arginin mit MGO. Als zentrales Intermediat der Reaktion wurde MG-H3 identifiziert. Unter den Versuchsbedingungen ist AP das einzige stabile Endprodukt und reicherte sich kontinuierlich während des Untersuchungszeitraums an. Durch Einzelinkubationen der Reinsubstanzen wurde der in Abbildung 9 gezeigte Reaktionsmechanismus aufgestellt. Die Versuche bestätigten die Stellung des MG-H3 als zentrales

Intermediat. Interessanterweise konnte das dritte in der Literatur beschriebene Imidazolinon-Isomer MG-H2 [165] nicht nachgewiesen werden. Obwohl diese Verbindung *in vivo* quantifiziert wurde (Tabelle 7), bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu Umsetzungen von Augenlinsenproteinen [209] oder N^α -*t*-Boc-Arginin [259] mit MGO. Als Gründe werden zum einen die bevorzugte Bildung des MG-H1 aufgrund sterischer Effekte und zum anderen die Reaktion des nukleophilsten Stickstoffatoms der Guanidinogruppe (N^δ) mit der reaktivsten Carbonylfunktion im MGO (Aldehydgruppe) zum MG-H3 benannt [259]. Die vorliegenden Ergebnisse stützen diese These und stellen den mechanistischen Zusammenhang zwischen den Imidazolinon-Derivaten dar.

Ähnlich der Reaktion von Arginin mit GL [180] wurde das Isomer mit endocyclischem N^δ -Stickstoff MG-H3 aus dem entsprechenden Dihydroxyimidazolidin kinetisch kontrolliert gebildet. Dieses wandelte sich mit steigendem pH-Wert über das offenkettige CEA in das thermodynamisch stabilere MG-H1 mit exocyclischem N^δ -Stickstoff um. Die beiden C-8-Diastereomere des MG-H3 bildeten ein racemisches Gemisch (Verhältnis 1:1), wobei die Umwandlung zwischen beiden Strukturen über enolische Intermediate erfolgte. Alternative Erklärungen mit Ringöffnung und -schluss konnten ausgeschlossen werden, da in den entsprechenden Inkubationen kein CEA detektiert wurde.

Das azide C-8-Proton ist sowohl für die Keto-Enol-Tautomerie als auch für die Reaktivität des MG-H3 essentiell und bestimmt seine zentrale Stellung im gesamten Reaktionsmechanismus. So ist die Struktur in der Lage, mit einer Carbonylgruppe über Aldolkondensation entsprechende Produkte zu bilden. Der Nachweis des Aldolprodukts von MG-H3 in kommerziellen MGO-Lösungen wird somit durch Verunreinigungen mit Formaldehyd (HCHO) erklärt und wurde in Einzelinkubationen bestätigt. Überraschender Weise konnte für MG-H1 weder die Racemisierung noch die Aldolreaktion mit HCHO beobachtet werden. Da bei Inkubation von isoliertem MG-H3 mit MGO sowohl das THP als auch das AP gebildet wurde, kann hierbei ebenfalls ein Aldolkondensationsprodukt als Intermediat postuliert werden. Die Umsetzung von isoliertem CEA mit MGO bestätigte diese Annahme, da hierbei die Reaktionskinetik zunächst den Ringschluss zum MG-H3 und die Reaktion anschließend mit der α -Dicarbonylverbindung unter Bildung der Pyrimidinderivate vermuten lässt.

Obwohl das THP durch Decarboxylierung, Wassereliminierung und Oxidation als AP-Vorgänger postuliert wurde [165], konnte in den Einzelinkubationen dieser Struktur das stabile Endprodukt nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wurden die unbekannt Strukturen

7 + 8 als unmittelbare Vorläufer identifiziert. So konnte durch anaerobe Umsetzung des aufgereinigten Substanzgemisches der oxidative Schritt bei der AP-Bildung gezeigt werden. Für eine abschließende Aufklärung des Reaktionsmechanismus von MGO mit Arginin sollten diese Verbindungen allerdings in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt werden.

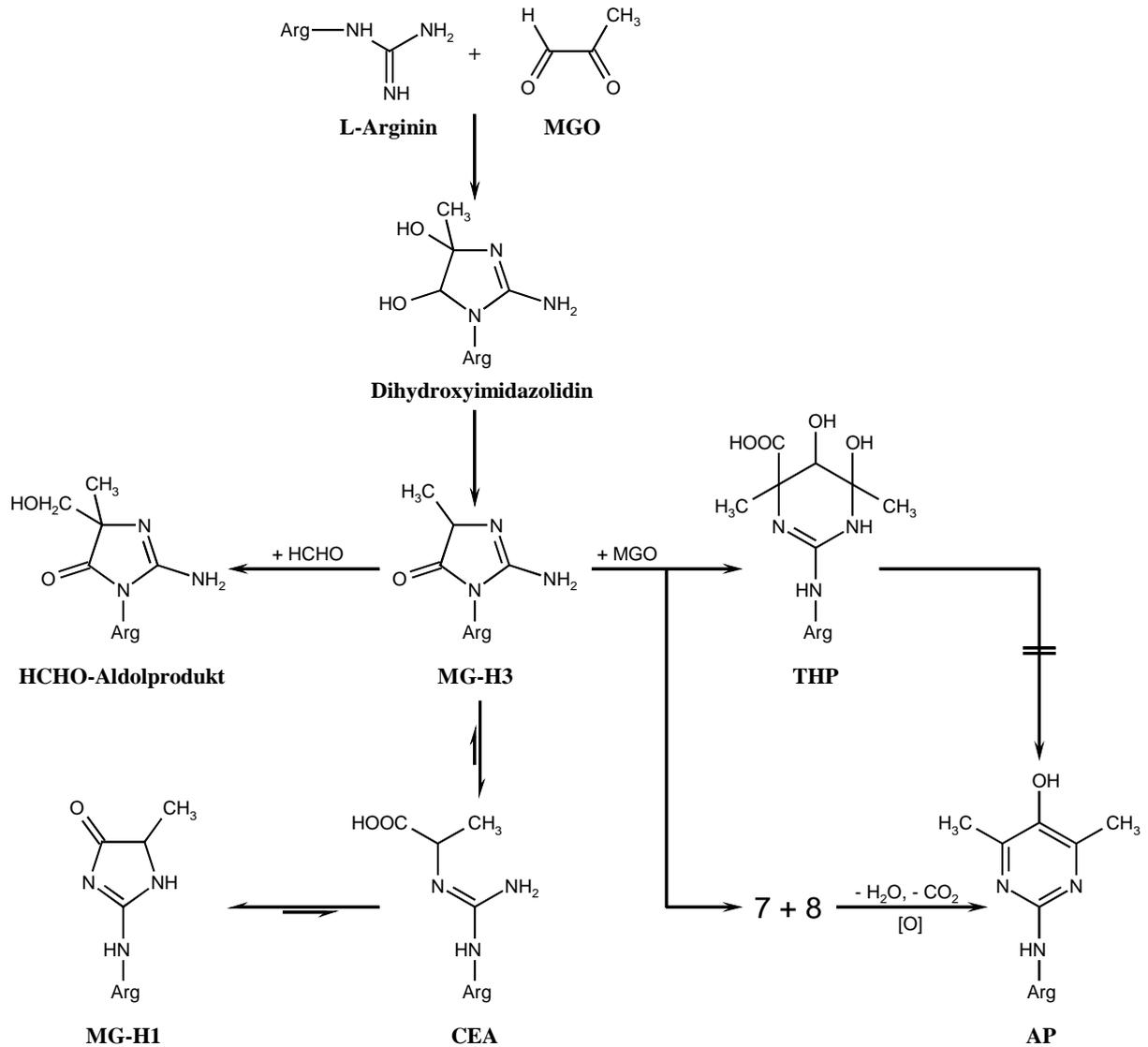


Abbildung 9: Bildung und Reaktionswege von MGO-Arginin-Modifikationen

3.1.2 Weiterführende Untersuchungen

Die Reaktivität von MG-H3 wurde durch weitergehende Untersuchungen unterstrichen. Dazu wurde isoliertes MG-H3 mit verschiedenen physiologisch- und lebensmittelrelevanten Carbonylverbindungen umgesetzt. Bei der Reaktion mit Acetaldehyd (für die Inkubationsbedingungen, Isolierung der Strukturen und die Analyse des Umsetzungsgemisch vgl. „Material and Methods“ in [258]) konnte neben den bereits beschriebenen Strukturen die Bildung zweier neuer Modifikationen beobachtet werden. Ein entsprechendes RP-FLD-Chromatogramm ist in Abbildung 10 dargestellt. Durch Ionenaustausch- und Ionenpaarchromatographie wurden beide Verbindungen isoliert und konnten mittels NMR und HR-MS in ihrer Struktur verifiziert werden (Tabelle A - 1, Tabelle A - 2). Es handelte sich um diastereomere Aldolkondensationsprodukte (Acet1, Acet2) von Acetaldehyd mit MG-H3 an Position C-8 des *N*^δ-endozyclischen Imidazolinonrings. Damit wurde die Reaktivität der C-H-aziden Position bestätigt. Die Bildung von Acet1 und Acet2 erfolgte innerhalb 24 h. Im weiteren Verlauf bauten sich die Strukturen wieder ab (Abbildung 11). Die Inkubationen der isolierten Referenzsubstanzen bestätigten diesen Abbau zum ursprünglichen MG-H3 und zum CEA (Anhang Abbildung A - 1, Abbildung A - 2).

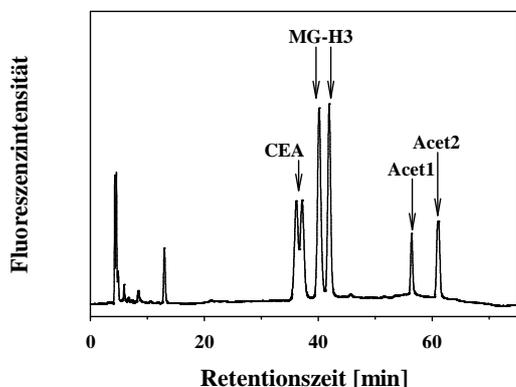


Abbildung 10: Chromatogramm der Inkubation (37 °C, pH 7,4) von 5 mM MG-H3 mit 2,5 mM Acetaldehyd nach 6 h

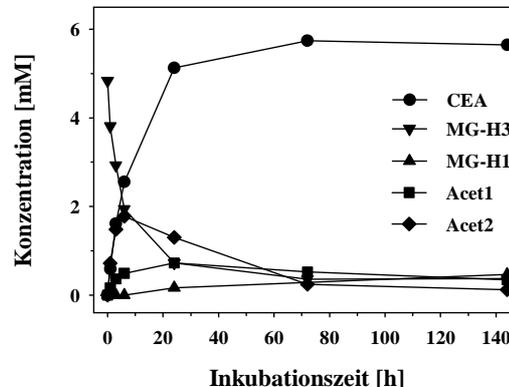


Abbildung 11: Konzentrationen der Verbindungen während der Inkubation (37 °C, pH 7,4) von 5 mM MG-H3 mit 2,5 mM Acetaldehyd

Im Gegensatz zur Aldolkondensation von MG-H3 mit Formaldehyd werden bei der Reaktion mit Acetaldehyd die beiden Diastereomere nicht im Verhältnis 1:1 gebildet. Dies ist möglicherweise auf sterische Effekte zurückzuführen. Neben Acetaldehyd wurde auch Glyceraldehyd mit MG-H3 inkubiert. Bei dieser Umsetzung konnten mehrere Strukturen detektiert werden. Durch LC-MS-Messungen wurde das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) dieser Verbindungen von 319 bestimmt (Abbildung A - 3). Dies entspricht dem positiv geladenen Ion des Kondensationsproduktes. Durch die zusätzlichen enantiomeren Zentren im Glyceraldehyd sind die Signale durch die Bildung mehrerer Diastereomere zu erklären.

Aufgrund des aziden Proton an C-8-Position des MG-H3 wurde außerdem eine verstärkte Elektrophilie der benachbarten Carbonylgruppe vermutet. Um diese These zu bestätigen, wurde das N^{δ} -endozyclische Imidazolinon mit verschiedenen nukleophilen Verbindungen wie Lysin, Cystein, Cystin und Cysteamin umgesetzt. Vor allem die Reaktion der ϵ -Aminogruppe des Lysins erhielt besondere Aufmerksamkeit, da dies einen alternativen Bildungsweg von MODIC darstellt. Hier kann der nukleophile Angriff an der Carbonylfunktion, gefolgt von Ringöffnung, Wassereliminierung und erneutem Ringschluss zum N^{δ} -exozyclischen MODIC formuliert werden. In den verschiedenen Inkubationen wurden allerdings für keine der verwendeten Nukleophile zusätzlichen Modifikationen detektiert. Der alternative MODIC-Bildungsmechanismus wurde somit nicht bestätigt. Da in der Inkubation von MGO mit Lysin und der Argininzugabe nach 24 h mehr MODIC nachgewiesen wurde als bei der Reaktion von MGO mit Arginin und anschließender Lysinzugabe kann der in der Literatur [175] beschriebene Mechanismus bestätigt werden (Abbildung 12, Abbildung 13). Dabei kondensiert Lysin zuerst mit der Aldehydfunktion des MGOs und erst im zweiten Schritt reagiert die Guanidinogruppe des Arginin mit dem Aldimin.

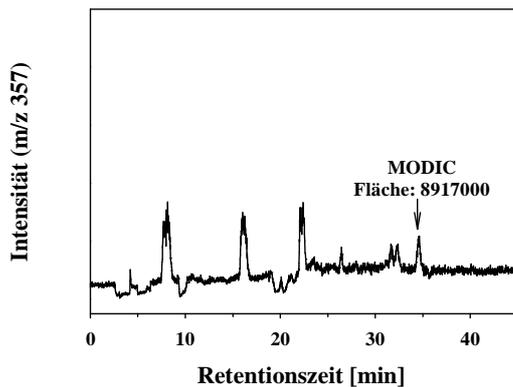


Abbildung 12: Bildung von MODIC ($t = 77$ h) in der Inkubation von 20 mM Arginin mit 20 mM MGO und Zugabe von 20 mM Lysin nach 24 h

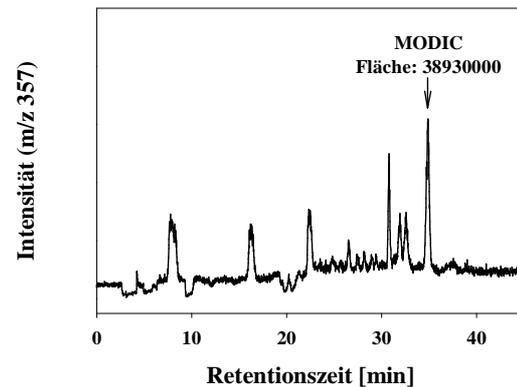


Abbildung 13: Bildung von MODIC ($t = 77$ h) in der Inkubation von 20 mM Lysin mit 20 mM MGO und Zugabe von 20 mM Arginin nach 24 h

Die Umsetzungen mit weiteren Carbonylverbindungen bestätigte die Reaktivität von MG-H3 und unterstreicht damit seine Bedeutung bei der Reaktion von MGO mit Arginin. Weiterhin wurden bisher nicht beschriebene Aminosäuremodifikationen nachgewiesen. Obwohl ein Abbau dieser Strukturen beobachtet wurde, kann der Nachweis im Lebensmittel oder *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. Die Reaktionsbedingungen im Vergleich zu den untersuchten Modellinkubationen unterscheiden sich offensichtlich erheblich (vgl. Nachweis von MG-H2 *in vivo*). Außerdem konnte der in der Literatur postulierte Bildungsmechanismus von MODIC durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden.

3.2 Anwendungsbezogene Untersuchungen zur Proteinmodifizierung

Der anwendungsbezogene Aspekt der vorliegenden Arbeit wurde durch zwei Themenkomplexe herausgearbeitet. Zunächst wird die gezielte Proteinmodifizierung am Beispiel der Funktionalisierung von Gelatinefolien aufgezeigt. Weiterhin wird die Käse- reifung anhand der Veränderungen von Aminosäuren durch α -Dicarbonylverbindungen charakterisiert. Die dabei beobachtete Modifizierung ist ungerichtet, kann aber eventuell als Prozessparameter bei der Herstellung dieses Lebensmittels eingesetzt werden.

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung chemisch modifizierter Gelatinefolien

Gelatine wurde als Kleber bereits vor 8000 Jahren von den Höhlenbewohnern des Mittleren Ostens verwendet. Auch die alten Ägypter nutzten nachweislich diese Eigenschaft des Biopolymers. Am Hof des englischen Königs Henry VIII (1491-1547) wurden eingelegte Gerichte mit „glitzerndem Kalbsfußgelee“ serviert. Während der napoleonischen Ära diente Gelatine als Proteinquelle der französischen Armee. Aufgrund der herausragenden Eigenschaften haben sich die Einsatzgebiete stetig erweitert. Die Produktion erfolgt heute großindustriell [224], wobei ca. 63 % in der Lebensmittel-, 27 % in der Pharmaindustrie und 5 % für technische Anwendungen genutzt werden [260].

Gelatine ist ein hochmolekulares Polypeptidgemisch, das durch partielle Hydrolyse aus Collagen gebildet wird. Letzteres ist als Skleroprotein Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen und Bindegewebe und macht 25-30 % des menschlichen Gesamtproteins aus. Durch zwei verschiedene Aufschlussverfahren werden die Quervernetzungen des Haut- und Knochencollagens von Schweinen, Rindern und Fischen gespalten. Das zunächst unlösliche Protein kann in der Folge mit Wasser extrahiert werden. Anschließend werden die erhaltenen Gelatinelösungen entsalzt, konzentriert und sterilisiert und nach dem Trocknen als Pulver oder in Blattform in den Handel gebracht. Die durch Säureaufschluss (Acidic) hergestellte Typ A-Gelatine unterscheidet sich aufgrund dieses Behandlungsverfahrens von der durch Laugen (Basic) extrahierten Typ B-Variante in ihrer Aminosäurezusammensetzung und der Molekulargewichtsverteilung der Polypeptidketten [224; 261].

2005 wurden weltweit ca. 305000 Tonnen Gelatine produziert [224]. Aufgrund der teilweise einzigartigen Eigenschaften wird dieses Biopolymer vielfältig verwendet und ist z.B. in der Analogfotografie als Schutzkolloid unersetzlich. In kosmetischen Präparaten und in der Lebensmittelindustrie dient Gelatine aufgrund der Oberflächenaktivität als Stabilisator, Emulgator oder Klärungs- bzw. Schönungsmittel. Eine der bedeutendsten Eigenschaften ist der Einfluss auf die Textur eines Lebensmittels durch Ausbildung thermoreversibler Gele

[262-264]. Populäre Beispiele sind Gummibärchen, Tortenguss und „Wackelpudding“ [224]. Auch in der Medizin und pharmazeutischen Industrie wird Gelatine umfangreich verwendet. Schwämme aus Gelatine wirken blutstillend und ermöglichen die Migration neuer Gewebszellen [224]. Wirkstoffe werden durch Gelatine kapseln oder -umhüllungen (Coatings) vor Sauerstoff, Licht und mikrobiellen Befall geschützt und vermeiden einen bitteren Geschmack bei oraler Applikation [265]. Wie auch bei den technischen Anwendungen (Korrosionsschutz von Metallen) und in der Lebensmittelindustrie („Essbare Folien“) ist vor allem die Fähigkeit der Filmbildung ausschlaggebend. Grundsätzlich besteht hierbei die Möglichkeit, erdölbasierende Kunststofffolien durch erneuerbare, biologisch abbaubare Biopolymere zu ersetzen [224; 245].

Tabelle 8: Bestimmung und Bedeutung der untersuchten Folienparameter

Parameter	Kenngroße	Bedeutung	Methode
physikalisch	Wasseraufnahme	Quellvermögen	gravimetrische Bestimmungen nach Wasserlagerung der Folien unter definierten Bedingungen
	Masseverlust	Löslichkeit	
mechanisch	E-Modul	Steifigkeit	Aufnahme der Spannungs-Dehnung-Kurven durch Zugversuch der Folien
	Zugdehnung	Dehnbarkeit	
chemisch	Arginin, Lysin	Gehalt unmodifizierter AS	Aminosäureanalytik mit RP-HPLC
	G-H3, CML	Modifizierungsgrad (Lysin, Arginin)	
	GOLD	Grad der Quervernetzung	
	GL, GLC	Gehalt an nicht reagiertem Vernetzer	Derivatisierung (RP-HPLC, GC)

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Entwicklung, Charakterisierung und Funktionalisierung von biologisch abbaubaren Gelatinefolien. Nach Abschnitt 1.2.3 können Proteine durch chemische oder enzymatische Modifizierung funktionalisiert und Eigenschaften gezielt auf die entsprechende Anwendung angepasst werden. Im Zuge eines BMELV-Verbundprojektes sollten sprühfähige, biologisch abbaubare Gelatinefolien für den Einsatz in der Landwirtschaft entwickelt werden. Als Voraussetzung für ihre Anwendung wurden wässrige Systeme mit umweltunbedenklichen Chemikalien bei möglichst niedrigen Kosten definiert. Es sollten wasserunlösliche Folien aus wässrigen Gelatinelösungen hergestellt werden. Da die in der Literatur beschriebenen Vernetzer entweder enzymatisch [252] und damit relativ teuer oder umweltschädlich [251] sind, wurde das Konzept der Proteinquervernetzung durch Intermediate der Maillard-Reaktion angewendet. Die Folien wurden unter definierten Bedingungen (Temperatur, Zeit) hergestellt. Grundlage war eine 4 %-ige (w/v) Gelatinelösung, die mit unterschiedlichen GL- bzw. GLC-Konzentrationen

modifiziert wurde. Durch definierte Trocknung dieser Lösungen konnten Folien erzeugt werden, die anschließend physikalisch, mechanisch und chemisch charakterisiert wurden. Eine Übersicht der verschiedenen Parameter zeigt Tabelle 8. Die genauen Versuchsbedingungen sind in der Veröffentlichung „*Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde*“ [266] am Ende dieses Abschnittes aufgeführt.

Durch die Verwendung von GL oder GLC konnten die physikalischen und mechanischen Eigenschaften der Folien zielgerichtet beeinflusst werden. Für die α -Dicarbonylverbindung ist das Quellvermögen und die Löslichkeit in Abbildung 14 dargestellt. In Abhängigkeit von der Konzentration konnten die Wasseraufnahme und der Masseverlust sowohl durch GL als auch durch GLC stark reduziert werden, wobei sich die quantitativen Ergebnisse zwischen beiden Vernetzern allerdings unterschieden. Dies wurde durch die Bestimmung der mechanischen Parameter bestätigt. So waren die Zunahme des E-Moduls und die Abnahme der Reißdehnung in GL-Folien (Abbildung 15) stärker ausgeprägt als bei GLC-Vernetzung.

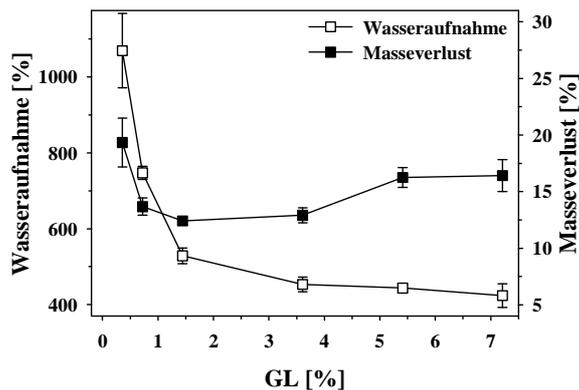


Abbildung 14: physikalische Eigenschaften GL-vernetzter Gelatinefolien

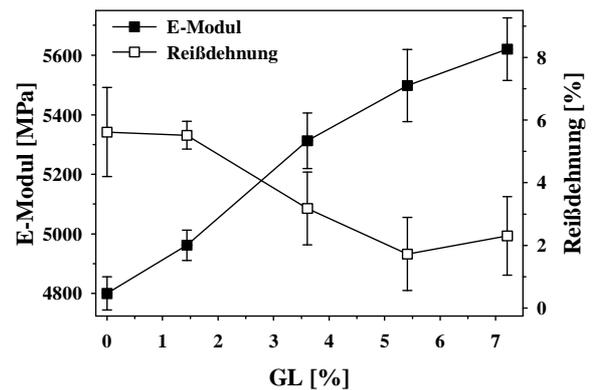


Abbildung 15: mechanische Eigenschaften GL-vernetzter Gelatinefolien

Diese Unterschiede sind auf die verschiedenen Vernetzungsmechanismen der verwendeten Verbindungen zurückzuführen. Die Bestimmung der chemischen Parameter bestätigten diese Ergebnisse auf molekularer Ebene. Während durch die Analyse des freien GLCs in den Folien eine nahezu vollständige Reaktion der Carbonylverbindung beobachtet wurde, reduzierte sich der prozentuale GL-Umsatz mit steigender Vernetzerkonzentration. Der Anstieg des Masseverlusts in GL-modifizierten Folien (Abbildung 14) kann somit durch das Herauslösen von freiem bzw. reversibel gebundenem α -Dicarbonyl während der Wasserlagerung erklärt werden. Die quantitativen Bestimmungen von GL und GLC müssen kritisch diskutiert werden, da sich die jeweiligen Derivatisierungsmethoden unterscheiden. So wird bei der Reaktion mit o-PD zusätzlich reversibel gebundenes GL (z.B. als GL-Imin) mit erfasst. Weitere Unterschiede in der Modifizierung und des Vernetzungsmechanismus ergeben sich

durch die Analyse der wichtigsten im Zuge der Maillard-Reaktion modifizierten Aminosäuren Lysin und Arginin sowie deren quantitativ bedeutendsten Folgemodifikationen CML bzw. Imidazolinon (G-H3). GOLD ist eine bivalente Proteinmodifikation zwischen zwei Lysinseitenketten und spiegelt somit unmittelbar den Vernetzungsgrad wieder. Während die Zunahme der Steifigkeit in GL-modifizierten Folien eindeutig mit dem Gehalt der Lysinquer- vernetzung GOLD korrelierte, kann die gleichbleibende Zugdehnung in GLC-Folien wiederum durch das Fehlen dieser Verbindung erklärt werden. Allgemein können in GL-Folien 50 % der modifizierten Lysin/Arginin-Reste als CML, GOLD und G-H3 bestimmt werden. In GLC-modifizierten Folien beschreiben diese Kenngrößen lediglich 10 %. Durch die höheren Kosten, den schwächeren Einfluss auf die Steifigkeit und die unzureichende Beschreibung der Modifizierung durch die gewählten Kenngrößen in GLC-Folien, wurden die folgenden Untersuchungen nur noch mit GL als Vernetzer durchgeführt.

Ziel des Projektes war der Einsatz sprühfähiger Lösungen. Da beim Abkühlen durch thermoreversible Gelierung die Viskosität stark ansteigt, wurden Möglichkeiten erarbeitet den Gelpunkt zu verschieben. Die Bestimmung des Gelpunktes der filmbildenden Gelatine- lösung (FFS) und die Charakterisierung der gebildeten Hydrogele erfolgten mittels deforma- tionskontrollierter Oszillationsrheometrie. Diese Messmethode gestattet Aussagen über die strukturelle Anordnung und das Verhalten der Polymerketten innerhalb des Gels [236; 241; 242]. Da es sich bei einem Gel um eine viskoelastische Substanz handelt, sind das Speicher (G')- und Verlustmodul (G'') wichtige Parameter. Dabei stellt G' den elastischen und G'' den viskosen Anteil dar. Der Sol-Gel-Übergang ist die Umwandlung einer Substanz mit überwiegend viskosen Eigenschaften in eine mit vornehmlich elastischen. Als Maß zur Bestimmung des Gelpunktes dient $G' = G''$ [267]. Durch das Abkühlen der Gelatine lagern sich einzelne Proteinketten zu Triplehelices, ähnlich dem des Collagens zusammen [236] und bilden dadurch ein thermoreversibles dreidimensionales Netzwerk [237]. Dieses ist in der Lage Wasser zu immobilisieren. Durch partielle Hydrolyse und gezielte Acetylierung der Gelatine im Vorfeld der chemischen Vernetzung mit GL konnten sowohl die rheologischen Eigenschaften der FFS als auch die physikalischen und chemischen Parameter der resultierenden Folien systematisch beeinflusst werden. Die genauen Vorschriften der chemischen Modifizierung durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure (HCl) und Acetylierung mit Essigsäureanhydrid (AAH) sind in der Veröffentlichung „*Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films*“ [268] am Ende dieses Abschnittes aufgeführt. Die anschließende Vernetzung mit GL entsprach den Versuchen im vorstehenden Untersuchungskomplex. Temperaturprofil und Dauer der rheo-

logischen Messungen wurden der chemischen Vernetzung und den Bedingungen der möglichen Anwendung angepasst.

Wie die Abbildung 16 zeigt, verzögerte sich die Gelierzeit mit dem Grad der Hydrolyse bzw. der Acetylierung. Bei der chemischen Modifizierung mit AAH ist insbesondere der pH-Wert von Bedeutung, da dieser die Reaktivität der entsprechenden Aminosäure bestimmt. Bei pH 2 lagen die ϵ -Aminogruppen des Lysins protoniert vor und AAH reagierte daher überwiegend mit den Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins und Hydroxylysins. Mit steigendem pH-Wert wurden zusätzlich die ϵ -Aminogruppen des Lysins acetyliert, was entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Triplehelices hatte. Zusätzlich wird dies durch das Verhältnis von viskosem zu elastischem Anteil ($\tan \delta$) im resultierenden Gel bestätigt, da dieser Parameter sowohl bei Hydrolyse als auch bei pH 7-Acetylierung zunimmt. Wichtige Informationen über die Eigenschaften eines chemisch-modifizierten Gels lieferte $\tan \delta$ auch nach Vernetzung der Gelatine. Hierfür wurden unbehandelte (UTG), partiell hydrolysierte (HG) und acetylierte (AG-pH 2, AG-pH 7) FFS mit GL vernetzt. Zum besseren Vergleich zwischen den verschiedenen FFS wurde in Abbildung 17 $\tan \delta$ auf den entsprechenden Wert ohne GL normalisiert. Bis auf die bei pH 7 acetylierten Proben sank dieser Parameter mit steigender GL-Konzentration und kann mit der Ausbildung zusätzlicher kovalenter Bindungen erklärt werden [236; 241]. Weiterhin konnte in den hydrolysierten und acetylierten Proben eine Zunahme der Gelierzeit durch Reaktion mit GL beobachtet werden.

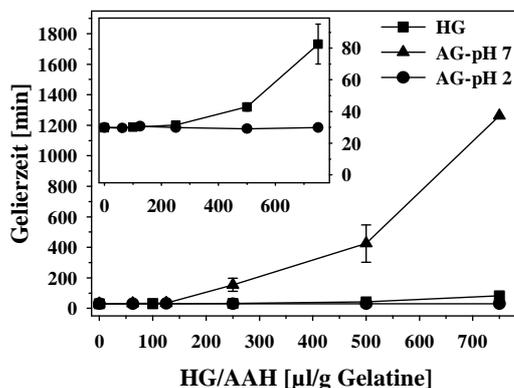


Abbildung 16: Gelierzeit chemisch-modifizierter FFS

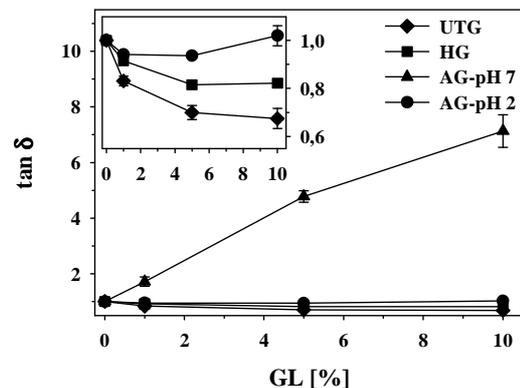


Abbildung 17: Visko-elastische Eigenschaften des Hydrogels chemisch-modifizierter FFS

Für die chemisch-physikalischen Untersuchungen wurde die unterschiedlich vorbehandelte Gelatine (HG, AAH) mit 5 % GL vernetzt, da diese Vernetzerkonzentration in den zuvor beschriebenen Untersuchungen (Abbildung 14, Abbildung 15) die besten Ergebnisse lieferte. Durch die Reaktion mit AAH bei pH 7 waren die Lysinseitenketten für die Vernetzung mit GL blockiert und die Bildung von Quervernetzungen wurde verhindert. Dies bestätigten die physikalischen und chemischen Kenngrößen der resultierenden Folien, da die CML- und

GOLD-Gehalte sehr gering bzw. nicht nachweisbar und die Folien in Wasser löslich waren. Auch in den hydrolytisch vorbehandelten Gelatinefolien wurden diese Parameter maßgeblich durch die molekular-strukturellen Eigenschaften des ursprünglichen Hydrogels bestimmt. Die Zunahme der Wasserabsorption und des Gewichtsverlusts mit steigender Hydrolyse konnten durch weniger Triplehelices und höheren viskosen Anteil erklärt werden. Gleichzeitig war durch die längere Gelierzeit eine gesteigerte GOLD-Bildung durch die erhöhte Mobilität der Polypeptidketten im Gel zu beobachten.

Auch der Einfluss der Hydrolyse oder Vernetzung auf die Barriereigenschaften zeigt: Die chemische Modifizierung ist ein leistungsstarkes Werkzeug der gezielten Proteinfunktionalisierung. Die Wasserdampf- und die Sauerstoffpermeabilität korrelierten mit den Merkmalen der filmbildenden Lösungen. Die Vernetzung mit GL reduzierte die Wasserdampfpermeabilität der unbehandelten Folien um ca. 50 %. Durch die Verwendung von Glycerin als Weichmacher wurde das freie Volumen des Systems vergrößert, die Dichte des Netzwerks reduziert und dieser Effekt ausgeglichen. Da durch die partielle Hydrolyse die resultierenden Folien sehr spröde waren, konnte durch Glycerin zusätzlich die Flexibilität der Folien erhöht werden. Weiterhin wurde die Wasserdampfdurchlässigkeit durch die Hydrolyse und durch die Acetylierung erhöht, was die strukturellen Merkmale des ursprünglichen Hydrogels widerspiegelt. Interessanterweise beeinflusste die Acetylierung der Hydroxygruppen durch niedrigen pH-Wert die Barriereigenschaften nur geringfügig, obwohl das Quellvermögen dieser Folien stark verringert werden konnte. Die chemische Vernetzung hat auf die Sauerstoffpermeabilität nur einen geringen Einfluss. Einzig die Behandlung der Gelatine mit HCl erhöhte diesen Parameter leicht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden: Gelatinefolien können durch Maillard-induzierte Quervernetzung hinsichtlich ihrer mechanischen, physikalischen und Barriereigenschaften anwendungsgerichtet funktionalisiert werden. Im Zuge der Untersuchungen wurden chemische Parameter identifiziert, die die makroskopischen Merkmale auf molekularer Ebene beschreiben. Zusätzliche Modifizierungen durch partielle Hydrolyse oder Acetylierung der Gelatine im Vorfeld der Vernetzung zeigen Möglichkeiten auf, die Gelierzeit den Anforderungen einer technischen Realisierung anzupassen oder gezielt die Eigenschaften des entstehenden Hydrogels zu beeinflussen. Dabei wurden erstmals die Zusammenhänge zwischen den strukturellen Merkmalen des Gels mit den physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Folien auf wissenschaftlicher Ebene korreliert. Als Ausblick soll der mögliche Einfluss auf die Schaumstabilität erwähnt werden. Wie unter

1.2.3 beschrieben, sind für diese funktionelle Eigenschaft ebenfalls die viskoelastischen und mechanischen Merkmale sowie die Gasdurchlässigkeit der Proteinfilme von Bedeutung.

3.2.2 α -Dicarbonylverbindungen und Aminosäuremodifikationen als Marker der Käsereifung

Mit der Domestizierung von Weidetieren wie Ziegen, Schafen und Kühen verfügten die Menschen neben dem Fleisch zusätzlich über deren Milch. Seit etwa 8000 Jahren ist daher auch Käse Bestandteil unserer Ernährung. Während der Lagerung der Milch in Gefäßen aus Ton oder Tiermägen koagulierten die Milchproteine durch Vermehrung von Milchsäurebakterien oder durch Restmengen der in den Mägen enthaltenen Proteasen [269]. Später wurde Milch gezielt für die Herstellung von Käse verwendet und heutzutage stehen dem Verbraucher weltweit etwa 2000 Varietäten zur Verfügung [72], deren gleichbleibend hohe Qualität bei der industriellen Produktion gewährleistet sein muss.

Das Dicklegen der Milch erfolgt nach zwei Verfahren, die je nach Käsesorte auch in Kombination angewandt werden. Durch die mikrobielle Verwertung der Lactose zu Milchsäure wird der pH-Wert der Milch in die Nähe des isoelektrischen Punktes der Caseine abgesenkt. Mit neutraler Nettoladung sind diese nicht mehr im wässrigen Medium löslich und koagulieren zu Sauermilchquark [270]. Die proteolytische Dicklegung der Milch erfolgt vor allem durch Lab-Enzym und beruht auf der Spaltung des κ -Caseins in das para- κ -Casein und das Glycomacropeptid. Der stabilisierende Effekt dieses Proteins auf die Caseinmicellen geht verloren. Die Hydrophobizität der Mizellen steigt und durch ionische Wechselwirkungen aggregieren positiv geladenes para- κ -Casein und negativ geladene α - und β -Caseine zu unlöslichen Netzwerken [269; 271]. Nach dem Abtrennen der Molke und dem Formen des Käsebruchs erfolgen je nach Sorte die Behandlung mit Sekundärkulturen und die Reifung unter definierten Bedingungen.

Dieser Prozess ist komplex und beinhaltet mikrobiologische und biochemische Veränderungen, die für das Aroma und die Textur der Käsesorte von entscheidender Bedeutung sind [272]. Vor allem Proteinmodifizierungen durch den proteolytischen Abbau der Caseine und die Modifikationen der Aminosäureseitenketten im Zuge der Maillard-Reaktion sind hierbei von Interesse. Die Käsereifung kann daher über das Ausmaß der Proteolyse [273; 274] oder über die Bestimmung von Verbindungen der nicht-enzymatischen Bräunung charakterisiert werden. Obwohl CML in norwegischen Molkenkäse [275] und Cheddar [276] nachgewiesen wurde, wird in der Literatur vorwiegend das Amadori-Produkt als Marker der Käsereifung beschrieben. So wurde Furosin und N^α -Furoylmethylaminosäuren mit der Alterung diverser Käsesorten wie Manchengo [277], Grana Padano [278], Gouda [279], Cheddar [201] und Camembert [201] korreliert. α -Dicarbonylverbindungen stellen auch in diesem Lebensmittel potentielle Reaktionspartner bei Proteinmodifizierung dar.

Neben ihrer Bildung im Zuge der Maillard-Reaktion werden vor allem GL, MGO und DA während des Wachstums von Starterbakterien oder sekundären Mikroorganismen produziert und konnten in einigen Käsesorten nachgewiesen werden [99; 280-282]. Vor allem DA gilt als sehr aromapotent. Es besitzt eine buttrige Note und bildet durch Reaktion mit Aminosäuren weitere wichtige Aromastoffe in Milchprodukten [283; 284]. GL und MGO reagieren ebenfalls mit Aminosäuren, bilden jedoch hauptsächlich MRPs (Abschnitt 1.2.1).

Da die stofflichen Veränderungen während der Käsereifung essentiell für die Eigenschaften des Produktes sind, ist das vollständige Verständnis der zugrundeliegenden Reaktionen Grundlage für eine wirksame Qualitätsbewertung und -sicherung. Die Charakterisierung der Käsereifung auf der Grundlage der nicht-enzymatischen Bräunung erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse verschiedener MRPs der frühen und fortgeschrittenen Phase sowie durch die Quantifizierung ausgewählter α -Dicarbonylverbindungen. Als einen in der Literatur etablierten Parameter wurde das Ausmaß der Proteolyse durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Die genauen Versuchsvorschriften und Analysenmethoden sowie die ausführliche Darstellung und Diskussion der Ergebnisse erfolgte in der Veröffentlichung „*Formation of Early and Advanced Maillard Reaction Products Correlates to the Ripening of Cheese*“ am Ende dieses Abschnitts.

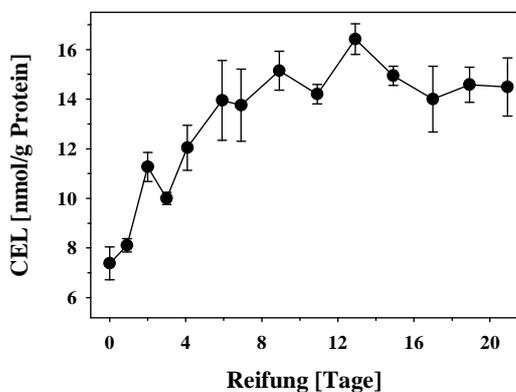


Abbildung 18: CEL-Gehalt während der Reifung von Sauermilchkäse

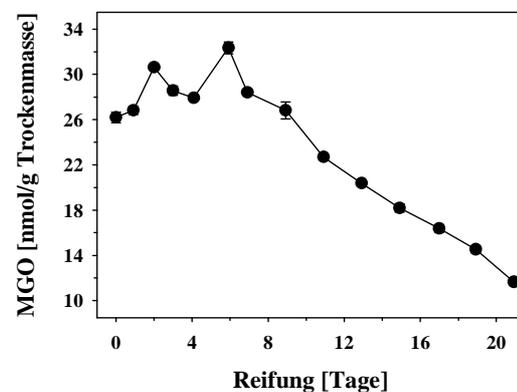


Abbildung 19: MGO-Gehalt während der Reifung von Sauermilchkäse

Aufgrund des geringen Fettgehaltes und der deutlichen Veränderungen der Textur während der Alterung wurde ein traditioneller Deutscher Sauermilchkäse („Harzer Käse“, Handkäse) als Modellsystem für den Reifungsprozess unter definierten Bedingungen (16 °C, 93 % rel. Luftfeuchte) gelagert. Kommerziell erhältliche, mit Labenzym koagulierte Goudasorten unterschiedlicher Reifegrade (jung: 6-8 Wochen, mittel: 2-6 Monate, alt: > 1 Jahr) dienen als Vergleich. Optisch konnte der Laib des Sauermilchkäses zu Beginn der Reifung in den weißen, Quark-ähnlichen, krümeligen Kern und den gelblichen, semitransparenten elastischen

Rand unterteilt werden. Die Reifung erfolgte bei dieser Käsesorte vom Rand in den Kern und konnte durch die Analyse des Caseinabbaus bestätigt werden. Die Art der Dicklegung beeinflusste signifikant die Proteolyse während der Reifung. Im Gegensatz zum Gouda wurde ein verstärkter Abbau des β -Caseins zu Gunsten kleinerer Peptide beobachtet. Diese Art der Proteinmodifizierung liefert Aussagen über das Ausmaß der Reifung innerhalb einer Sorte. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Käsetypen ist allerdings nicht möglich.

Neben der Hydrolyse der Peptidbindung werden die Proteine auch durch Reaktionen der nicht-enzymatischen Bräunung modifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen vor allem Umsetzungen der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion. Mit zunehmender Reifung sank der Gehalt des Amadori-Produktes im Rand als auch im Kern des Sauermilchkäses und die stabilen MRPs CML und CEL (Abbildung 18) reicherten sich an. Die Abnahme des Furosingehaltes bestätigt damit die in Abschnitt 1.2.1 beschriebene oxidative Fragmentierung des Amadori-Produktes als Bildungsmechanismus des CMLs. Durch gleichzeitige Abnahme der GL und MGO-Gehalte (Abbildung 19) wurden zusätzlich α -Dicarbonylverbindungen als unmittelbare Ausgangsstoffe stabiler Lysinmodifikationen identifiziert.

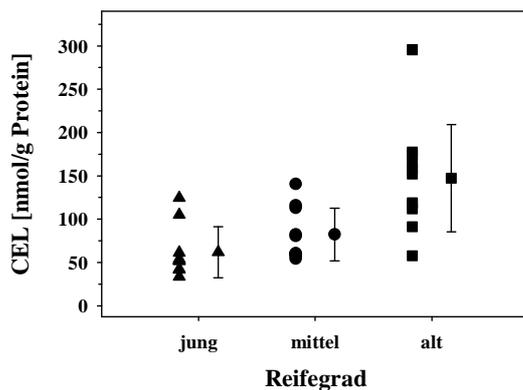


Abbildung 20: CEL-Gehalt der Goudasorten

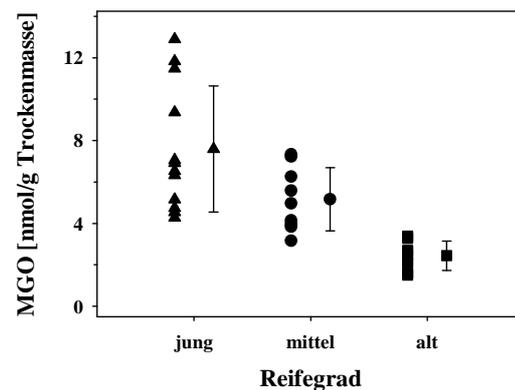


Abbildung 21: MGO-Gehalt der Goudasorten

Aufgrund der verschiedenen Produktionsbedingungen und Rohstoffe sind die Unterschiede zwischen Markern der nicht-enzymatischen Bräunung in kommerziell erhältlichen Goudaprobe nicht so stark ausgeprägt. Einzig CEL (Abbildung 20) und MGO (Abbildung 21) konnten als robuste Parameter zur Charakterisierung des Reifegrades genutzt werden. Sie zeigten damit unabhängig von der Art der Dicklegung denselben Trend wie bei der Lagerung des Sauermilchkäses. Allgemein wiesen die höheren Gehalte an Furosin, CML und CEL in Gouda auf eine verstärkte Proteinmodifizierung durch die Maillard-Reaktion im Gegensatz zu den Veränderungen bei Sauermilchkäse hin. Beim Gouda korrelierten sie damit mit dem höheren Grad der Proteolyse in selbst geringfügig gealterten Proben.

Proteinmodifizierungen während der Herstellung und Lagerung von Käse sind schon seit Jahrzehnten im Fokus der Wissenschaft. Es wurde insbesondere die Proteolyse der Caseine untersucht. Veränderungen von Aminosäureseitenketten konnten zwar nachgewiesen werden, die Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen als Vorläufer stabiler Modifikationen war dabei allerdings nicht von Interesse. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen jedoch die Bedeutung dieser reaktiven Substanzklasse für die Proteinmodifizierung. Besonders herauszustellen sind die Veränderungen von CEL und MGO während der Reifung. Mit dem Verhältnis zwischen den beiden Parametern kann der Reifestatus unabhängig von der Käsesorte beschrieben werden. Für ein besseres Verständnis sollten zukünftig daher weitere Käsesorten und die Entstehung von MGO in Milchprodukten untersucht werden.

4 Zusammenfassung der Dissertation

Die vorliegende Dissertation befasste sich mit ausgewählten Aspekten der Modifizierung von Proteinen durch α -Dicarbonylverbindungen. Die zum Gebiet der nicht-enzymatischen Bräunung zählenden Reaktionen spielen sowohl bei der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln als auch unter physiologischen Bedingungen bei pathologischen Veränderungen eine entscheidende Rolle. Für die umfassende Bewertung dieser Reaktionen ist das Verständnis der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen unerlässlich. Ziel der Arbeit war es daher mit mechanistischen Untersuchungen die Modifikation von Aminosäureseitenketten durch α -Dicarbonylverbindungen zu entschlüsseln. Weiterhin war die Charakterisierung des Herstellungsprozesses von Lebensmitteln durch Proteinmodifizierungen ebenso Bestandteil der Forschung wie die zielgerichtete Reaktion von α -Dicarbonylverbindungen zur Proteinfunktionalisierung.

Durch Modellinkubationen von N^α -geschütztem Arginin mit Methylglyoxal konnte die Reaktion dieser wichtigen α -Dicarbonylverbindungen mit der Guanidinogruppe der Argininseitenkette aufgeklärt werden. Dafür wurden zunächst die verschiedenen Modifikationen durch Ionenaustauschchromatographie und präparative RP-HPLC isoliert und durch verschiedene NMR-Techniken und durch die hochauflösende Massenspektrometrie in ihrer Struktur aufgeklärt. Durch Inkubation der isolierten Referenzsubstanzen konnte der Reaktionsmechanismus aufgestellt werden. Als zentrales Intermediat wurde das Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 3 identifiziert. Dieses Imidazolinon wird kinetisch kontrolliert gebildet und wandelt sich durch Ringöffnung in das thermodynamisch stabilere Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 1 um. Die Bedeutung von Methylglyoxal-Imidazolinon Typ 3 wird zusätzlich durch das azide Proton an C-8-Position des Imidazolinonrings bestimmt. Neben der Umwandlung eines Diastereomers in das jeweils Andere, ist vor allem die Aldolkondensation mit Carbonylverbindungen entscheidend. Die Reaktion mit einem weiteren Molekül Methylglyoxal führt nachweislich zur Bildung des einzigen stabilen Endproduktes, dem Argpyrimidin. Die in der Literatur postulierte Bildung dieses Pyrimidinderivats aus dem Tetrahydropyrimidin konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr wurden zwei bisher unbekannte Strukturen als unmittelbare Vorläufer identifiziert, die allerdings aufgrund der Ausbildung eines chemischen Gleichgewichtes untereinander nicht abschließend in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten.

Das zielgerichtete Beeinflussen bestimmter Eigenschaften von Gelatinefolien durch die Modifizierung mit Intermediaten der Maillard-Reaktion erweitert das Prinzip der nicht-enzymatischen Bräunung auf die Funktionalisierung von Proteinen. Wie gezeigt, können anwendungsbezogene Merkmale wie physikalische und mechanische Beständigkeit sowie Gaspermeabilität von Biopolymerfolien durch chemische Modifikation mit dem α -Dicarbonyl Glyoxal gesteuert werden. Die Proteinmodifizierung wurde durch die Bestimmung von Lysin und Arginin sowie ihrer quantitativ bedeutsamsten Modifikationen auf molekularer Ebene nachgewiesen. Die kovalente Quervernetzung reduzierte das Quellvermögen, die Löslichkeit und die Wasserdampfpermeabilität der Folien. Gleichzeitig konnte die Zunahme der Steifigkeit beobachtet werden. Die Herstellung der Folien erfolgte durch Trocknen der Gelatinelösungen unter definierten Bedingungen. Die strukturelle Anordnung der Polymerketten innerhalb des intermediär gebildeten Hydrogels bestimmen dabei direkt die funktionellen Merkmale der Folien. Durch die deformationskontrollierte Oszillationsrheometrie konnten sowohl die Gelierzeit als auch die viskoelastischen Eigenschaften des Hydrogels bestimmt werden. Partielle Hydrolyse oder Acetylierung der Gelatine im Vorfeld der chemischen Vernetzung mit Glyoxal hatte zum Teil drastischen Einfluss auf das rheologische Verhalten und spiegelt damit den Einfluss der molekularen Modifikation der Proteinketten wider. Die Analyse der chemisch-physikalischen Parameter der resultierenden Folien bestätigte die strukturellen Überlegungen zum Polymernetzwerk des Hydrogels auf der Ebene des Proteinfilms.

Neben dem Verändern von Proteinen mit dem Ziel ihrer Funktionalisierung, bestand ein Teil der vorliegenden Arbeit in der Charakterisierung der Käsureifung anhand der ungerichteten Modifizierung. Als Marker wurden neben Aminosäuremodifikationen der frühen und fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion auch kurzkettige α -Dicarbonylverbindungen analysiert. Als Vergleich diente die als Reifungsparameter in der Literatur etablierte Proteolyse der Caseine. Während der Lagerung von Sauermilchkäse unter definierten Bedingungen wurden sowohl Furosine als auch N^{ϵ} -Carboxymethyllysin und N^{ϵ} -Carboxyethyllysin als alterungsabhängige Kenngrößen identifiziert. Der Anstieg der Lysinmodifikationen der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion konnte mit der Abnahme des Amadori-Produktes und den unmittelbaren Vorläufern Glyoxal und Methylglyoxal korreliert werden. Durch die Untersuchung von kommerziell erhältlichem Gouda unterschiedlichen Reifegrades wurde N^{ϵ} -Carboxyethyllysin und Methylglyoxal als robuste Marker der Käsureifung etabliert. Im Gegensatz zur Proteolyse sind diese Kenngrößen unabhängig von der Art der Dicklegung. Zusätzlich bestätigten die Zunahme von N^{ϵ} -Carboxyethyllysin und

die gleichzeitige Abnahme von Methylglyoxal den Bildungsmechanismus dieses stabilen Maillard-Reaktionsprodukts.

Mit der vorliegenden Dissertation wurden grundlegende Erkenntnisse für die komplexen Reaktionen der nicht-enzymatischen Bräunung gewonnen. Darüber hinaus konnten Möglichkeiten gezeigt werden, die Maillard-Reaktion zur zielgerichteten Funktionalisierung von Proteinen und zur Charakterisierung der Lebensmittelherstellung als „Prozesskontrolle“ oder als Authentizitätsmerkmal zu nutzen.

5 Abstract

The present work deals with selected aspects of protein modification by α -dicarbonyl compounds. These reactions belong to the field of non-enzymatic browning and play an important role in production and processing of foods and in the development of diseases under physiological conditions. The underlying mechanistic pathways are essential for the comprehensive assessment of these reactions. Because of that, the aim of this work was the mechanistic investigation of the modification of amino acid side chains by highly reactive α -dicarbonyls. Furthermore, protein modifications were used to characterize the process of food production. The targeted reaction of α -dicarbonyls with proteins for improved functional properties was an additional part of this dissertation.

N^α -protected arginine was incubated with methylglyoxal in a model system to elucidate the mechanism of guanidino group modification by this important α -dicarbonyls compound. The formed modifications were isolated and purified by ion exchange chromatography and RP-HPLC and structures were verified by NMR and high resolution mass spectrometry. Incubation of isolated compounds gave insights to the reaction mechanism. Methylglyoxal-imidazolinone type 3 was determined as the key intermediate precursor within the total reaction scheme. Kinetic studies identified methylglyoxal-imidazolinone type 1 as the thermodynamically more stable product which was formed via ring opening. Further investigations revealed an acidic proton at C-8 of the imidazolinon ring of methylglyoxal-imidazolinone type 3 to trigger aldol condensations. This reactivity allowed the addition of another molecule methylglyoxal to form the single stable product argpyrimidine. The formation of this structure was described in literature by oxidation and decarboxylation of tetrahydropyrimidine. The present study clearly rejected this hypothesis. Instead, two previously unknown structures were identified as the immediate precursors. Because of a 1:1 equilibrium of both structures the isolation and purification was not successful.

Chemical modifications of gelatin films with intermediates of the Maillard-reaction were performed to intentionally affect certain properties and extend the concept of the non-enzymatic browning to protein functionalization. Technical features like physical and mechanical resistance and also gas permeability of biopolymer films were regulated by reaction with glyoxal. The changes were demonstrated at the molecular level of the protein by determination of lysine, arginine and their quantitative most important modifications. Covalent crosslinking reduced swelling behavior, solubility and water vapor permeability and increased stiffness. Films were prepared by drying of gelatin solutions under defined conditions. The structural arrangement of polymer chains within the temporarily formed

hydrogel predefined the functional properties of resulting films. To characterize the process of gelation, dynamic oscillatory measurements with a rheometer were performed. Partial hydrolyzation and acetylation of gelatin before chemical crosslinking with glyoxal had effect on gelling time and visco-elastic properties of gels and mirrored the influence of molecular changes. Analysis of chemical and physical parameters of the resulting films confirmed the structural considerations of the polymer network of the hydrogel at the level of the protein films.

Beside the modification to change functional properties of proteins, another part of the present work was the characterization of cheese ripening by unintentional protein alteration. For this, amino acid modification of the early and advanced Maillard-reaction and α -dicarbonyl compounds were analyzed. As a well established ripening parameter, the proteolysis of caseins was determined. Furosine, N^{ϵ} -carboxymethyllysine and N^{ϵ} -carboxyethyllysine confirmed the ripening of a traditional German acid curd cheese under defined conditions. The increase of advanced Maillard-reaction lysine modifications correlated with the decrease of the Amadori product and the direct precursors glyoxal and methylglyoxal. To extend the results of experimental maturation to commercial cheeses, different aged Gouda types were investigated. Here, N^{ϵ} -carboxyethyllysine and methylglyoxal were identified as robust markers of cheese ripening since in contrast to proteolysis these parameters were independent of coagulation type. Additionally, the increase of N^{ϵ} -carboxyethyllysine and the simultaneously decrease of methylglyoxal confirmed the mechanism of formation of this stable Maillard-reaction product.

The present dissertation provides essential knowledge of the complex reaction pathways of non-enzymatic browning. Furthermore, possibilities were shown to use the Maillard-reaction for intentional functionalization of proteins and for characterization of food production.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1912**, *154*, 66-68.
- [2] Ledl, F. and Schleicher, E. The Maillard reaction in food and in the human body - new results in chemistry, biochemistry and medicine *Angewandte Chemie* **1990**, *102*, 597-626.
- [3] Wrodnigg, T. and Eder, B. Glycoscience - Epimerisation, Isomerisation and Rearrangement Reactions of Carbohydrates: The Amadori and Heyns Rearrangements: Landmarks in the History of Carbohydrate Chemistry or Unrecognized Synthetic Opportunities?, *Topics in Current Chemistry* **2001**, Springer-Verlag Berlin / Heidelberg, 115-152
- [4] Morita, N.; Inoue, K. and Takagi, M. Quinoxalines Derived from Disaccharides with Ortho-Phenylenediamine Under Weakly Acidic Reflux Conditions *Agricultural and Biological Chemistry* **1985**, *49*, 3279-3289.
- [5] Beck, J.; Ledl, F. and Severin, T. Formation of Glucosyl-Deoxyosones from Amadori Compounds of Maltose *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1989**, *188*, 118-121.
- [6] Reihl, O.; Rothenbacher, T. M.; Lederer, M. O. et al. Carbohydrate carbonyl mobility - the key process in the formation of α -dicarbonyl intermediates *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 1609-1618.
- [7] Biemel, K. M.; Conrad, J. and Lederer, M. O. Unexpected carbonyl mobility in aminoketoses: the key to major Maillard crosslinks *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41*, 801-804.
- [8] Kramhöller, B.; Pischetsrieder, M. and Severin, T. Maillard Reactions of Lactose and Maltose *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 347-351.
- [9] Hollnagel, A. and Kroh, L. W. Degradation of oligosaccharides in non-enzymatic browning by formation of alpha-dicarbonyl compounds via a "peeling off" mechanism *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 6219-6226.
- [10] Gobert, J. and Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 8591-8597.
- [11] Kawakishi, S.; Tsunehiro, J. and Uchida, K. Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper-ion *Carbohydrate Research* **1991**, *211*, 167-171.
- [12] Nedvidek, W.; Ledl, F. and Fischer, P. Detection of 5-Hydroxymethyl-2-Methyl-3(2H)-Furanone and of α -Dicarbonyl Compounds in Reaction Mixtures of Hexoses and Pentoses with Different Amines *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1992**, *194*, 222-228.
- [13] Cerny, C. and Davidek, T. Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the Maillard reaction *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 2714-2721.

-
- [14] Hollnagel, A. and Kroh, L. W. 3-Deoxypentosulose: An α -Dicarbonyl Compound Predominating in Nonenzymatic Browning of Oligosaccharides in Aqueous Solution *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1659-1664.
- [15] Mavric, E. and Henle, T. Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages *European Food Research and Technology* **2006**, *223*, 803-810.
- [16] Smuda, M. and Glomb, M. A. Novel Insights into the Maillard Catalyzed Degradation of Maltose *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 13254-13264.
- [17] Voigt, M. and Glomb, M. A. Reactivity of 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose: A Key Intermediate in the Maillard Chemistry of Hexoses *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 4765-4770.
- [18] Usui, T.; Yanagisawa, S.; Ohguchi, M. et al. Identification and Determination of α -Dicarbonyl Compounds Formed in the Degradation of Sugars *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2007**, *71*, 2465-2472.
- [19] Pfeifer, Y. V. and Kroh, L. W. Investigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds Generated from the Maillard Reactions of L-Methionine with Reducing Sugars via Their Stable Quinoxaline Derivatives *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 8293-8299.
- [20] Yaylayan, V. A. and Keyhani, A. Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in D-glucose/L-alanine maillard model systems *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 3280-3284.
- [21] Keyhani, A. and Yaylayan, V. A. Elucidation of the Mechanism of Pyrazinone Formation in Glycine Model Systems Using Labeled Sugars and Amino Acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 2511-2516.
- [22] Thornalley, P. J.; Langborg, A. and Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose *Biochemical Journal* **1999**, *344*, 109-116.
- [23] Yaylayan, V. A. and Keyhani, A. Origin of Carbohydrate Degradation Products in L-Alanine/D- ^{13}C Glucose Model Systems *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 2415-2419.
- [24] Hollnagel, A. and Kroh, L. W. Formation of α -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A: Food Research and Technology* **1998**, *207*, 50-54.
- [25] Hofmann, T.; Bors, W. and Stettmaier, K. Studies on Radical Intermediates in the Early Stage of the Nonenzymatic Browning Reaction of Carbohydrates and Amino Acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 379-390.
- [26] Hayashi, T. and Namiki, M. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, *50*, 1965-1970.

- [27] Voigt, M.; Smuda, M.; Pfahler, C. et al. Oxygen-Dependent Fragmentation Reactions during the Degradation of 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5685-5691.
- [28] Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D. V.; Litchfield, J. E. et al. Mechanism of Autoxidative Glycosylation - Identification of Glyoxal and Arabinose As Intermediates in the Autoxidative Modification of Proteins by Glucose *Biochemistry* **1995**, *34*, 3702-3709.
- [29] Morita, N.; Inoue, K.; Hayashi, H. et al. Structural Changes of Quinoxaline Derivatives, with Special Reference to 2-(2',3'-Dihydroxypropyl)-3-Hydroxymethylquinoxaline in Alkaline and Acidic Solutions *Agricultural and Biological Chemistry* **1983**, *47*, 2053-2059.
- [30] Kroh, L. W. Caramelisation in food and beverages *Food Chemistry* **1994**, *51*, 373-379.
- [31] Cämmerer, B.; Wedzicha, B. L. and Kroh, L. W. Nonenzymatic browning reactions of retro-aldol degradation products of carbohydrates *European Food Research and Technology* **1999**, *209*, 261-265.
- [32] Schulz, A.; Trage, C.; Schwarz, H. et al. Electrospray ionization mass spectrometric investigations of α -dicarbonyl compounds - Probing intermediates formed in the course of the nonenzymatic browning reaction of L-ascorbic acid *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *262*, 169-173.
- [33] Vernin, G.; Chakib, S.; Rogacheva, S. M. et al. Thermal decomposition of ascorbic acid *Carbohydrate Research* **1997**, *305*, 1-15.
- [34] Kurata, T. and Sakurai, Y. Degradation of L-Ascorbic Acid and Mechanism of Nonenzymic Browning Reaction: Part III. Oxidative Degradation of L-Ascorbic Acid (Degradation of Dehydro-L-ascorbic Acid) *Agricultural and Biological Chemistry* **1967**, *31*, 177-184.
- [35] Kurata, T. and Sakurai, Y. Degradation of L-Ascorbic Acid and Mechanism of Nonenzymic Browning Reaction: Part II. Non-oxidative Degradation of L-Ascorbic Acid Including Formation of 3-Deoxy-L-pentosone *Agricultural and Biological Chemistry* **1967**, *31*, 170-176.
- [36] Nishikawa, Y.; Toyoshima, Y. and Kurata, T. Identification of 3,4-Dihydroxy-2-oxo-butanal (L-threosone) as an Intermediate Compound in Oxidative Degradation of Dehydro-L-ascorbic Acid and 2,3-Diketo-L-gulonic Acid in a Deuterium Oxide Phosphate Buffer *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 1707-1712.
- [37] Kalapos, M. P. Methylglyoxal toxicity in mammals *Toxicology Letters* **1994**, *73*, 3-24.
- [38] Ray, S. and Ray, M. Isolation of Methylglyoxal Synthase from Goat Liver *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 6230-6233.
- [39] Richard, J. P. Reaction of Triosephosphate Isomerase with L-Glyceraldehyde 3-Phosphate and Triose 1,2-Enediol 3-Phosphate *Biochemistry* **1985**, *24*, 949-953.
- [40] Pompliano, D. L.; Peyman, A. and Knowles, J. R. Stabilization of a Reaction Intermediate as a Catalytic Device: Definition of the Functional Role of the Flexible Loop in Triosephosphate Isomerase *Biochemistry* **1990**, *29*, 3186-3194.

-
- [41] Phillips, S. A. and Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates: Investigation using a specific assay for methylglyoxal *European Journal of Biochemistry* **1993**, *212*, 101-105.
- [42] Richard, J. P. Kinetic-Parameters for the Elimination-Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase and An Estimation of the Reactions Physiological Significance *Biochemistry* **1991**, *30*, 4581-4585.
- [43] Thornalley, P. J. Pharmacology of Methylglyoxal: Formation, Modification of Proteins and Nucleic Acids, and Enzymatic Detoxification - A Role in Pathogenesis and Antiproliferative Chemotherapy *General Pharmacology: The Vascular System* **1996**, *27*, 565-573.
- [44] Lee, A. Y. W. and Chung, S. S. M. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract *The FASEB Journal* **1999**, *13*, 23-30.
- [45] Lorenzi, M. The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive, and Resilient *Experimental Diabetes Research* **2007**,
- [46] Szwegold, B. S.; Kappler, F. and Brown, T. R. Identification of Fructose-3-Phosphate in the Lens of Diabetic Rats *Science* **1990**, *247*, 451-454.
- [47] Lal, S.; Szwegold, B. S.; Taylor, A. H. et al. Metabolism of Fructose-3-phosphate in the Diabetic Rat Lens *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *318*, 191-199.
- [48] Casazza, J. P.; Felver, M. E. and Veech, R. L. The Metabolism of Acetone in Rat *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 231-236.
- [49] Reichard, G. A.; Haff, A. C.; Skutches, C. L. et al. Plasma Acetone Metabolism in the Fasting Human *Journal of Clinical Investigation* **1979**, *63*, 619-626.
- [50] Reichard, G. A.; Skutches, C. L.; Hoeldtke, R. D. et al. Acetone Metabolism in Humans During Diabetic-Ketoacidosis *Diabetes* **1986**, *35*, 668-674.
- [51] Kalapos, M. P. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications *Toxicology Letters* **1999**, *110*, 145-175.
- [52] Lyles, G. A. and Chalmers, J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery *Biochemical Pharmacology* **1992**, *43*, 1409-1414.
- [53] Marver, H. S.; Tschudy, D. P.; Perlroth, M. G. et al. Determination of Aminoketones in Biological Fluids *Analytical Biochemistry* **1966**, *14*, 53-60.
- [54] Urata, G. and Granick, S. Biosynthesis of α -Aminoketones and Metabolism of Aminoacetone *Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238*, 811-820.
- [55] Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2003**, *41*, 1159-1165.
- [56] Fu, M. X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J. et al. The advanced glycation end product, N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 9982-9986.

- [57] Niyati-Shirkhodae, F. and Shibamoto, T. Gas-Chromatographic Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal Formed from Lipids and Related Compounds upon Ultraviolet-Irradiation *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 227-230.
- [58] Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto, Y. et al. Increase in Three α,β -Dicarbonyl Compound Levels in Human Uremic Plasma: Specific *in Vivo* Determination of Intermediates in Advanced Maillard Reaction *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *256*, 89-93.
- [59] Anderson, M. M.; Hazen, S. L.; Hsu, F. F. et al. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein - A mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *99*, 424-432.
- [60] Anderson, M. M. and Heinecke, J. W. Production of N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase - A role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation *Diabetes* **2003**, *52*, 2137-2143.
- [61] Feather, M. S. and Harris, J. F. The absence of proton exchange during the conversion of hexose to 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde *Tetrahedron Letters* **1968**, *9*, 5807-5810.
- [62] Morales, F. J.; Romero, C. and JimenezPerez, S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 1570-1573.
- [63] Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernandez, E. and Garcia-Villanova, B. Browning indicators in bread *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 4176-4181.
- [64] Kim, M. O. and Baltes, W. On the Role of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard Reaction *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 282-289.
- [65] Ledl, F.; Schnell, W. and Severin, T. Nachweis von 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on in Lebensmitteln *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A: Food Research and Technology* **1976**, *160*, 367-370.
- [66] Mills, F. D.; Weisleder, D. and Hodge, J. E. 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one, a novel nonenzymatic browning product *Tetrahedron Letters* **1970**, *11*, 1243-1246.
- [67] Patton, S. The Formation of Maltol in Certain Carbohydrate-Glycine Systems *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *184*, 131-134.
- [68] Weenen, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry *Food Chemistry* **1998**, *62*, 393-401.
- [69] Brands, C. M. J. and van Boekel, M. A. J. S. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: Building of a reaction network model *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 4667-4675.

- [70] Davídek, T.; Robert, F.; Devaud, S. et al. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative α -dicarbonyl cleavage pathway *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 6677-6684.
- [71] Davídek, T.; Devaud, S.; Robert, F. et al. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic β -dicarbonyl cleavage mechanism *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 6667-6676.
- [72] Belitz, H. D., Grosch, W. et al. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg **2008**
- [73] Hofmann, T. Acetylformoin - A chemical switch in the formation of colored Maillard reaction products from hexoses and primary and secondary amino acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 3918-3928.
- [74] Ledl, F.; Hiebl, J. and Severin, T. Formation of Colored β -Pyranones from Hexoses and Pentoses. 19. Investigations Relating to the Maillard Reaction *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1983**, *177*, 353-355.
- [75] Hofmann, T. Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 3891-3895.
- [76] Wang, H. Y.; Qian, H. and Yao, W. R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity *Food Chemistry* **2011**, *128*, 573-584.
- [77] Schönberg, A. and Moubacher, R. The Strecker Degradation of α -Amino Acids *Chemical Reviews* **1952**, *50*, 261-277.
- [78] Hofmann, T.; Munch, P. and Schieberle, P. Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 434-440.
- [79] Kerscher, R. and Grosch, W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology* **1997**, *204*, 3-6.
- [80] Schieberle, P. and Grosch, W. Evaluation of the Flavor of Wheat and Rye Bread Crusts by Aroma Extract Dilution Analysis *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1987**, *185*, 111-113.
- [81] Schnermann, P. and Schieberle, P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 867-872.
- [82] Pripis-Nicolau, L.; de Revel, G.; Bertrand, A. et al. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 3761-3766.

- [83] Hofmann, T. and Schieberle, P. Evaluation of the Key Odorants in A Thermally Treated Solution of Ribose and Cysteine by Aroma Extract Dilution Techniques *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 2187-2194.
- [84] Tressl, R.; Helak, B.; Kersten, E. et al. Formation of Proline-Specific and Hydroxyproline-Specific Maillard Products from [1-¹³C]Glucose *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 547-553.
- [85] Tressl, R.; Helak, B.; Koppler, H. et al. Formation of 2-(1-Pyrrolidinyl)-2-Cyclopentenones and Cyclopent(B)Azepin-8(1H)-Ones As Proline Specific Maillard Products *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1985**, *33*, 1132-1137.
- [86] Krymkiewicz, N. Reactions of Methylglyoxal with Nucleic-Acids *Febs Letters* **1973**, *29*, 51-54.
- [87] Frischmann, M.; Bidmon, C.; Angerer, J. et al. Identification of DNA adducts of methylglyoxal *Chemical Research in Toxicology* **2005**, *18*, 1586-1592.
- [88] Shapiro, R.; Cohen, B. I.; Shiuey, S. J. et al. On Reaction of Guanine with Glyoxal Pyruvaldehyde and Kethoxal and Structure of Acylguanines . A New Synthesis of N²-Alkylguanines *Biochemistry* **1969**, *8*, 238-&.
- [89] Murata-Kamiya, N. and Kamiya, H. Methylglyoxal, an endogenous, aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 3433-3438.
- [90] Pischetsrieder, M.; Seidel, W.; Munch, G. et al. N-2-(1-carboxyethyl)deoxyguanosine, a nonenzymatic glycation adduct of DNA, induces single-strand breaks and increases mutation frequencies *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *264*, 544-549.
- [91] Migliore, L.; Barale, R.; Bosco, E. et al. Genotoxicity of Methylglyoxal - Cytogenetic Damage in Human-Lymphocytes Invitro and in Intestinal-Cells of Mice *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1503-1507.
- [92] de Revel, G. and Bertrand, A. A Method for the Detection of Carbonyl-Compounds in Wine: Glyoxal and Methylglyoxal *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, *61*, 267-272.
- [93] Hayashi, T. and Shibamoto, T. Analysis of Methyl Glyoxal in Foods and Beverages *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1985**, *33*, 1090-1093.
- [94] Hirsch, J.; Petrakova, E. and Feather, M. S. The Reaction of Some Dicarbonyl Sugars with Aminoguanidine *Carbohydrate Research* **1992**, *232*, 125-130.
- [95] Hirsch, J.; Mossine, V. V. and Feather, M. S. The Detection of Some Dicarbonyl Intermediates Arising from the Degradation of Amadori Compounds (the Maillard Reaction) *Carbohydrate Research* **1995**, *273*, 171-177.
- [96] Espinosa-Mansilla, A.; Duran-Meras, I. and Salinas, F. High-performance liquid chromatographic fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings *Analytical Biochemistry* **1998**, *255*, 263-273.

- [97] Glomb, M. A. and Tschirnich, R. Detection of α -Dicarbonyl Compounds in Maillard Reaction Systems and in Vivo *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5543-5550.
- [98] Yamaguchi, M.; Ishida, J.; Zhu, X. X. et al. Determination of Glyoxal, Methylglyoxal, Diacetyl, and 2,3-Pentanedione in Fermented Foods by High-Performance Liquid-Chromatography with Fluorescence Detection *Journal of Liquid Chromatography* **1994**, *17*, 203-211.
- [99] Bednarski, W.; Jedrychowski, L.; Hammond, E. G. et al. A method for the determination of α -dicarbonyl compounds *Journal of Dairy Science* **1989**, *72*, 2474-2477.
- [100] Hellwig, M.; Degen, J. and Henle, T. 3-Deoxygalactosone, a "New" 1,2-Dicarbonyl Compound in Milk Products *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 10752-10760.
- [101] Weigel, K. U.; Opitz, T. and Henle, T. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey *European Food Research and Technology* **2004**, *218*, 147-151.
- [102] Marceau, E. and Yaylayan, V. A. Profiling of α -Dicarbonyl Content of Commercial Honeys from Different Botanical Origins: Identification of 3,4-Dideoxyglucosone (3,4-DGE) and Related Compounds *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 10837-10844.
- [103] Arena, E.; Ballistreri, G.; Tomaselli, F. et al. Survey of 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commercial Honey of Different Floral Origin *Journal of Food Science* **2011**, *76*, C1203-C1210.
- [104] Arribas-Lorenzo, G. and Morales, F. J. Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 2966-2972.
- [105] Nagao, M.; Fujita, Y.; Wakabayashi, K. et al. Mutagens in Coffee and Other Beverages *Environmental Health Perspectives* **1986**, *67*, 89-91.
- [106] Daglia, M.; Papetti, A.; Aceti, C. et al. Isolation and determination of α -dicarbonyl compounds by RP-HPLC-DAD in green and roasted coffee *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 8877-8882.
- [107] Bravo, A.; Herrera, J. C.; Scherer, E. et al. Formation of α -dicarbonyl compounds in beer during storage of Pilsner *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 4134-4144.
- [108] Bao, M. L.; Pantani, F.; Griffini, O. et al. Determination of carbonyl compounds in water by derivatization - solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis *Journal of Chromatography A* **1998**, *809*, 75-87.
- [109] Matsuda, H.; Sato, T.; Nagase, H. et al. Aldehydes As Mutagens Formed by Ozonation of Humic Substances *Science of the Total Environment* **1992**, *114*, 205-213.

- [110] Atkinson, R.; Carter, W. P. L.; Darnall, K. R. et al. A Smog Chamber and Modeling Study of the Gas-Phase NOX-Air Photo-Oxidation of Toluene and the Cresols *International Journal of Chemical Kinetics* **1980**, *12*, 779-836.
- [111] Matsunaga, S. and Kawamura, K. Determination of α - and β -hydroxycarbonyls and dicarbonyls in snow and rain samples by GC/FID and GC/MS employing benzyl hydroxyl grime derivatization *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4742-4746.
- [112] Fujioka, K. and Shibamoto, T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke *Environmental Toxicology* **2006**, *21*, 47-54.
- [113] Tsukushi, S.; Katsuzaki, T.; Aoyama, I. et al. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: Role of the polyol pathway *Kidney International* **1999**, *55*, 1970-1976.
- [114] McLellan, A. C.; Phillips, S. A. and Thornalley, P. J. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene *Analytical Biochemistry* **1992**, *206*, 17-23.
- [115] Lal, S.; Kappler, F.; Walker, M. et al. Quantitation of 3-deoxyglucosone levels in human plasma *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, *342*, 254-260.
- [116] Mirza, M. A.; Kandhro, A. J.; Memon, S. Q. et al. Determination of glyoxal and methylglyoxal in the serum of diabetic patients by MEKC using stilbenediamine as derivatizing reagent *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3940-3947.
- [117] Abordo, E. A.; Minhas, H. S. and Thornalley, P. J. Accumulation of α -oxoaldehydes during oxidative stress: A role in cytotoxicity *Biochemical Pharmacology* **1999**, *58*, 641-648.
- [118] Wieslander, A. P.; Andren, A. H. G.; Nilssonhorell, C. et al. Are Aldehydes in Heat-Sterilized Peritoneal-Dialysis Fluids Toxic In-Vitro? *Peritoneal Dialysis International* **1995**, *15*, 348-352.
- [119] Canas, B.; Lopez-Ferrer, D.; Ramos-Fernandez, A. et al. Mass spectrometry technologies for proteomics *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **2006**, *4*, 295-320.
- [120] Gallogly, M. M. and Mieyal, J. J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress *Current Opinion in Pharmacology* **2007**, *7*, 381-391.
- [121] Verderio, E. A. M.; Johnson, T. and Griffin, M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: Review article *Amino Acids* **2004**, *26*, 387-404.
- [122] Pinnell, S. R. and Martin, G. R. Cross-Linking of Collagen and Elastin - Enzymatic Conversion of Lysine in Peptide Linkage to α -Amino adipic- δ -Semiaaldehyde (Allysine) by An Extract from Bone *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1968**, *61*, 708-716.
- [123] Bailey, A. J. and Peach, C. M. Isolation and Structural Identification of A Labile Intermolecular Crosslink in Collagen *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, *33*, 812-819.

- [124] Tanzer, M. L. Crosslinking of Collagen *Science* **1973**, *180*, 561-566.
- [125] Piez, K. A. Cross-Linking of Collagen and Elastin *Annual Review of Biochemistry* **1968**, *37*, 547-570.
- [126] Eyre, D. R.; Koob, T. J. and Vanness, K. P. Quantitation of Hydroxypyridinium Crosslinks in Collagen by High-Performance Liquid-Chromatography *Analytical Biochemistry* **1984**, *137*, 380-388.
- [127] Brot, N. and Weissbach, H. Peptide methionine sulfoxide reductase: Biochemistry and physiological role *Biopolymers* **2000**, *55*, 288-296.
- [128] Bhattacharjee, S.; Pennathur, S.; Byun, J. et al. NADPH oxidase of neutrophils elevates o,o'-dityrosine cross-links in proteins and urine during inflammation *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *395*, 69-77.
- [129] Eiserich, J. P.; Hristova, M.; Cross, C. E. et al. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils *Nature* **1998**, *391*, 393-397.
- [130] Schmitz, I.; Zahn, H.; Klostermeyer, H. et al. Occurrence of Isopeptide Bonds in Heated Milk Protein *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1976**, *160*, 377-381.
- [131] Friedman, M. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1295-1319.
- [132] Erbersdobler, H. and Somoza, V. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, *51*, 423-430.
- [133] Penndorf, I.; Li, C. H.; Schwarzenbolz, U. et al. N-terminal glycation of proteins and peptides in foods and in vivo - Evaluation of N-(2-furoylmethyl) valine in acid hydrolyzates of human hemoglobin *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**, 118-123.
- [134] del Castillo, M. D.; Corzo, N. and Olano, A. Early Stages of Maillard Reaction in Dehydrated Orange Juice *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 4388-4390.
- [135] Penndorf, I.; Biedermann, D.; Maurer, S. V. et al. Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: Quantification of N^α-(2-furoylmethyl) amino acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 723-727.
- [136] Krause, R.; Kuhn, J.; Penndorf, I. et al. N-Terminal pyrazinones: a new class of peptide-bound advanced glycation end-products *Amino Acids* **2004**, *27*, 9-18.
- [137] Glomb, M. A. and Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 41638-41647.
- [138] Hellwig, M. and Henle, T. Formyllysine, a new glycation compound from the reaction of lysine and 3-deoxyxypentose *European Food Research and Technology* **2010**, *230*, 903-914.

- [139] Portero-Otin, M.; Nagaraj, R. H. and Monnier, V. M. Chromatographic Evidence for Pyrraline Formation During Protein Glycation In-Vitro and In-Vivo *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, 1247, 74-80.
- [140] Smuda, M.; Voigt, M. and Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 6458-6464.
- [141] Ahmed, M. U.; Thorpe, S. R. and Baynes, J. W. Identification of N^{ϵ} -Carboxymethyllysine As A Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein *Journal of Biological Chemistry* **1986**, 261, 4889-4894.
- [142] Ahmed, M. U.; Frye, E. B.; Degenhardt, T. P. et al. N^{ϵ} -Carboxyethyllysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins *Biochemical Journal* **1997**, 324, 565-570.
- [143] Hasenkopf, K.; Ronner, B.; Hiller, H. et al. Analysis of glycated and ascorbylated proteins by gas chromatography-mass spectrometry *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 5697-5703.
- [144] Hasenkopf, K.; Ubel, B.; Bordiehn, T. et al. Determination of the Maillard product oxalic acidmonolysinylamide (OMA) in heated milk products by ELISA *Nahrung-Food* **2001**, 45, 206-209.
- [145] Nakayama, T.; Hayase, F. and Kato, H. Formation of ϵ -(2-Formyl-5-Hydroxymethyl-Pyrrol-1-yl)-L-Norleucine in the Maillard Reaction Between D-Glucose and L-Lysine *Agricultural and Biological Chemistry* **1980**, 44, 1201-1202.
- [146] Lindenmeier, M.; Faist, V. and Hofmann, T. Structural and Functional Characterization of Pronyl-lysine, a Novel Protein Modification in Bread Crust Melanoidins Showing in Vitro Antioxidative and Phase I/II Enzyme Modulating Activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 6997-7006.
- [147] Erbersdobler, H. and Zucker, H. Lysine and available lysine in skim milk powder *Milchwissenschaft-Milk Science International* **1966**, 21, 564-568.
- [148] Finot, P. A.; Bricout, J.; Viani, R. et al. Identification of A New Lysine Derivative Obtained Upon Acid Hydrolysis of Heated Milk *Experientia* **1968**, 24, 1097-1099.
- [149] Heyns, K.; Heukesho, J. and Brose, K. H. Degradation of Fructose Amino Acids to N-(2-Furoylmethyl)Amino Acids . Intermediates in Browning Reactions *Angewandte Chemie - International Edition* **1968**, 7, 628-629.
- [150] Finot, P. A.; Viani, R.; Bricout, J. et al. Detection and Identification of Pyridosine A Second Lysine Derivative Obtained Upon Acid Hydrolysis of Heated Milk *Experientia* **1969**, 25, 134-135.
- [151] Glomb, M. A. and Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 10017-10026.

- [152] Wells-Knecht, K. J.; Brinkmann, E. and Baynes, J. W. Characterization of an Imidazolium Salt Formed from Glyoxal and N^α -Hippuryllysine: A Model for Maillard Reaction Crosslinks in Proteins *Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 6246-6247.
- [153] Brinkmann, E.; Wells-Knecht, K. J.; Thorpe, S. R. et al. Characterization of an imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and N^α -hippuryllysine *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1995**, 2817-2818.
- [154] Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N. and Faust, F. M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 19338-19345.
- [155] Skovsted, I. C.; Christensen, M.; Breinholt, J. et al. Characterization of a novel AGE-compound derived from lysine and 3-deoxyglucosone *Cellular and Molecular Biology (Paris)* **1998**, *44*, 1159-1163.
- [156] Nemet, I.; Strauch, C. and Monnier, V. Favored and disfavored pathways of protein crosslinking by glucose: glucose lysine dimer (GLUCOLD) and crossline versus glucosepane *Amino Acids* **2011**, *40*, 167-181.
- [157] Hofmann, T.; Bors, W. and Stettmaier, K. Radical-Assisted Melanoidin Formation during Thermal Processing of Foods as well as under Physiological Conditions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 391-396.
- [158] Nakamura, K.; Hasegawa, T.; Fukunaga, Y. et al. Crosslines A and B as candidates for the fluorophores in age- and diabetes-related cross-linked proteins, and their diacetates produced by Maillard reaction of N^α -acetyl-L-lysine with D-glucose *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, 992-994.
- [159] Nagaraj, R. H. and Monnier, V. M. Isolation and Characterization of A Blue Fluorophore from Human Eye Lens Crystallins - In vitro Formation from Maillard Reaction with Ascorbate and Ribose *Biochimica et Biophysica Acta* **1992**, *1116*, 34-42.
- [160] Nakamura, K.; Nakazawa, Y. and Ienaga, K. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: Vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the maillard reaction between lysine or proteins with glucose *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *232*, 227-230.
- [161] Tessier, F.; Obrenovich, M. and Monnier, V. M. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1 - Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 20796-20804.
- [162] Iijima, K.; Murata, M.; Takahara, H. et al. Identification of N^ω -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen *Biochemical Journal* **2000**, *347*, 23-27.
- [163] Alt, N. and Schieberle, P. Model Studies on the Influence of High Hydrostatic Pressure on the Formation of Glycated Arginine Modifications at Elevated Temperatures *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5789-5797.

- [164] Alt, N. and Schieberle, P. Identification of N^7 -(1-Carboxyethyl)-Arginine, a Novel Posttranslational Protein Modification of Arginine Formed at High Hydrostatic Pressure *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, 1043, 55-58.
- [165] Ahmed, N.; Argirov, O. K.; Minhas, H. S. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N^{ϵ} -carboxymethyl-lysine- and N^{ϵ} -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin *Biochemical Journal* **2002**, 364, 1-14.
- [166] Paul, R.; Avery, N. C.; Slatter, D. A. et al. Isolation and characterization of advanced glycation end products derived from the in vitro reaction of ribose and collagen *Biochemical Journal* **1998**, 330, 1241-1248.
- [167] Henle, T.; Walter, A. W.; Haebner, R. et al. Detection and Identification of a Protein-Bound Imidazolone Resulting from the Reaction of Arginine Residues and Methylglyoxal *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1994**, 199, 55-58.
- [168] Mavric, E.; Kumpf, Y.; Schuster, K. et al. A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages *European Food Research and Technology* **2004**, 218, 213-218.
- [169] Hayase, F.; Konishi, Y. and Kato, H. Identification of the Modified Structure of Arginine Residues in Proteins with 3-Deoxyglucosone, A Maillard Reaction Intermediate *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1995**, 59, 1407-1411.
- [170] Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N. et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry *Biochemical Journal* **2003**, 375, 581-592.
- [171] Schwarzenbolz, U.; Henle, T.; Haebner, R. et al. On the reaction of glyoxal with proteins *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A: Food Research and Technology* **1997**, 205, 121-124.
- [172] Shipanova, I. N.; Glomb, M. A. and Nagaraj, R. H. Protein Modification by Methylglyoxal: Chemical Nature and Synthetic Mechanism of a Major Fluorescent Adduct *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, 344, 29-36.
- [173] Oya, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y. et al. Methylglyoxal Modification of Protein. Chemical and Immunochemical Characterization of Methylglyoxal-Arginine Adducts *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 18492-18502.
- [174] Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C. et al. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N^{α} -acetylarginine, N^{α} -acetylcysteine, and N^{α} -acetyllysine, and bovine serum albumin *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 32299-32305.
- [175] Lederer, M. O. and Klaiber, R. G. Cross-linking of proteins by maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7, 2499-2507.

- [176] Biemel, K. M.; Reihl, O.; Conrad, J. et al. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes - Unraveling the structure of a pentosidine precursor *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 23405-23412.
- [177] Sell, D. R. and Monnier, V. M. Structure Elucidation of A Senescence Cross-Link from Human Extracellular-Matrix - Implication of Pentoses in the Aging Process *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 21597-21602.
- [178] Lederer, M. O. and Bühler, H. P. Cross-linking of proteins by Maillard processes - Characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 1081-1088.
- [179] Henle, T.; Walter, H. and Klostermeyer, H. Evaluation of the Extent of the Early Maillard-Reaction in Milk-Products by Direct Measurement of the Amadori-Product Lactuloselysine *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1991**, *193*, 119-122.
- [180] Glomb, M. A. and Lang, G. Isolation and Characterization of Glyoxal-Arginine Modifications *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1493-1501.
- [181] Ames, J. M. Determination of *N*^ε-(Carboxymethyl)lysine in Foods and Related Systems *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**, *1126*, 20-24.
- [182] Koito, W.; Araki, T.; Horiuchi, S. et al. Conventional Antibody against *N*^ε-(Carboxymethyl)Lysine (CML) Shows Cross-Reaction to *N*^ε-(Carboxyethyl)Lysine (CEL): Immunochemical Quantification of CML with a Specific Antibody *Journal of Biochemistry* **2004**, *136*, 831-837.
- [183] McSweeney, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* **2004**, Academic Press London, 347-360
- [184] Sousa, M. J.; Ardö, Y. and McSweeney, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 327-345.
- [185] Singh, H. Modification of food proteins by covalent crosslinking *Trends in Food Science & Technology* **1991**, *2*, 196-200.
- [186] Lindsay, M. P. and Skerritt, J. H. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives *Trends in Food Science & Technology* **1999**, *10*, 247-253.
- [187] An, H.; Peters, M. Y. and Seymour, T. A. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation *Trends in Food Science & Technology* **1996**, *7*, 321-327.
- [188] Bressa, F.; Tesson, N.; DallaRosa, M. et al. Antioxidant effect of Maillard reaction products: Application to a butter cookie of a competition kinetics analysis *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 692-695.
- [189] Chung, S. Y.; Swaisgood, H. E. and Catignani, G. L. Effects of Alkali Treatment and Heat-Treatment in the Presence of Fructose on Digestibility of Food Proteins As

- Determined by An Immobilized Digestive Enzyme Assay (Idea) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1986**, *34*, 579-584.
- [190] Friedman, M.; Zahnley, J. C. and Masters, P. M. Relationship Between In vitro Digestibility of Casein and Its Content of Lysinoalanine and D-Amino Acids *Journal of Food Science* **1981**, *46*, 127-&.
- [191] Brüggemann, J. and Erbersdobler, H. Fructoselysin als wichtigstes Reaktionsprodukt von Lysin mit Glucose bei Hitzeschädigung von Lebens- und Futtermitteln *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **1968**, *137*, 137-143.
- [192] Büser, W. and Erbersdobler, H. F. Carboxymethyllysine, a new compound of heat damage in milk products *Milchwissenschaft-Milk Science International* **1986**, *41*, 780, 785-
- [193] Chiang, G. H. High-performance liquid chromatographic determination of ϵ -pyrrolyl lysine in processed food *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1988**, *36*, 506-509.
- [194] Henle, T.; Schwarzenbolz, U. and Klostermeyer, H. Detection and quantification of pentosidine in foods *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A: Food Research and Technology* **1997**, *204*, 95-98.
- [195] Biemel, K. M.; Buhler, H. P.; Reihl, O. et al. Identification and quantitative evaluation of the lysine-arginine crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and glucosepan in foods *Nahrung* **2001**, *45*, 210-214.
- [196] Nunes, F. M. and Coimbra, M. A. Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 3967-3977.
- [197] Erbersdobler, H. F.; Dehn, B.; Nangpal, A. et al. Determination of Furosine in Heated Milk As A Measure of Heat Intensity During Processing *Journal of Dairy Research* **1987**, *54*, 147-151.
- [198] Meyer, B.; Al-Diab, D.; Vollmer, G. et al. Mapping the glycooxidation product N^{ϵ} -carboxymethyllysine in the milk proteome *Proteomics* **2011**, *11*, 420-428.
- [199] Birlouez-Aragon, I.; Pischetsrieder, M.; Leclere, J. et al. Assessment of protein glycation markers in infant formulas *Food Chemistry* **2004**, *87*, 253-259.
- [200] Glomb, M. A.; Rosch, D. and Nagaraj, R. H. N^{δ} -(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-L-ornithine, a Novel Methylglyoxal-Arginine Modification in Beer *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 366-372.
- [201] Schwietzke, U.; Malinowski, J.; Zerge, K. et al. Quantification of Amadori products in cheese *European Food Research and Technology* **2011**, *233*, 243-251.
- [202] Allen, D. W.; Schroeder, W. A. and Balog, J. Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin - A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 1628-1634.

- [203] Bunn, H. F.; Haney, D. N.; Gabbay, K. H. et al. Further Identification of Nature and Linkage of Carbohydrate in Hemoglobin-A1C *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1975**, *67*, 103-109.
- [204] Monnier, V. M.; Kohn, R. R. and Cerami, A. Accelerated Age-Related Browning of Human Collagen in Diabetes-Mellitus *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1984**, *81*, 583-587.
- [205] Dyer, D. G.; Dunn, J. A.; Thorpe, S. R. et al. Accumulation of Maillard Reaction-Products in Skin Collagen in Diabetes and Aging *Journal of Clinical Investigation* **1993**, *91*, 2463-2469.
- [206] Wilker, S. C.; Chellan, P.; Arnold, B. M. et al. Chromatographic Quantification of Argpyrimidine, a Methylglyoxal-Derived Product in Tissue Proteins: Comparison with Pentosidine *Analytical Biochemistry* **2001**, *290*, 353-358.
- [207] Obayashi, H.; Nakano, K.; Shigeta, H. et al. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *226*, 37-41.
- [208] Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O. et al. Glucosepane Is a Major Protein Cross-link of the Senescent Human Extracellular Matrix: Relationship with Diabetes *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 12310-12315.
- [209] Ahmed, N.; Thornalley, P. J.; Dawczynski, J. et al. Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins *Investigative Ophthalmology Visual Science* **2003**, *44*, 5287-5292.
- [210] Chellan, P. and Nagaraj, R. H. Protein crosslinking by the Maillard reaction: Dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *368*, 98-104.
- [211] Wolff, S. P. and Dean, R. T. Glucose Autoxidation and Protein Modification - the Potential Role of Autoxidative Glycosylation in Diabetes *Biochemical Journal* **1987**, *245*, 243-250.
- [212] Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto, Y. et al. First evidence for accumulation of protein-bound and protein-free pyrroline in human uremic plasma by mass spectrometry *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *224*, 237-241.
- [213] Odani, H.; Shinzato, T.; Usami, J. et al. Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia *Febs Letters* **1998**, *427*, 381-385.
- [214] Ahmed, N.; Battah, S.; Karachalias, N. et al. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **2003**, *1639*, 121-132.
- [215] Anderson, M. M.; Requena, J. R.; Crowley, J. R. et al. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for

- producing advanced glycation end products at sites of inflammation *Journal of Clinical Investigation* **1999**, *104*, 103-113.
- [216] Koschinsky, T.; He, C. J.; Mitsuhashi, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 6474-6479.
- [217] Förster, A.; Kuhne, Y. and Henle, T. Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, *1043*, 474-481.
- [218] Thornalley, P. J. The clinical significance of glycation *Clinical Laboratory* **1999**, *45*, 263-273.
- [219] Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H. et al. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products *Diabetes Care* **2006**, *29*, 1420-1432.
- [220] Ahmed, N. Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**, *67*, 3-21.
- [221] Kislinger, T.; Fu, C. F.; Huber, B. et al. N^ε-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 31740-31749.
- [222] Oliver, C. M.; Melton, L. D. and Stanley, R. A. Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2006**, *46*, 337-350.
- [223] Hettiarachchy, N. S. and Ziegler, G. R. *Protein functionality in food systems* Marcel Dekker-Verlag, New York **1994**
- [224] Schrieber, R. and Gareis, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice* 1. Auflage, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim **2007**
- [225] Relkin, P.; Hagolle, N.; Dalglish, D. G. et al. Foam formation and stabilisation by pre-denatured ovalbumin *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **1999**, *12*, 409-416.
- [226] Althouse, P. J.; Dinakar, P. and Kilara, A. Screening of Proteolytic-Enzymes to Enhance Foaming of Whey-Protein Isolates *Journal of Food Science* **1995**, *60*, 1110-1112.
- [227] van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D. B. A. et al. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2938-2946.
- [228] Medrano, A.; Abirached, C.; Panizzolo, L. et al. The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin *Food Chemistry* **2009**, *113*, 127-133.
- [229] Chevalier, F.; Chobert, J. M.; Popineau, Y. et al. Improvement of functional properties of beta-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 145-152.

- [230] Kato, A.; Ibrahim, H. R.; Watanabe, H. et al. New Approach to Improve the Gelling and Surface Functional-Properties of Dried Egg-White by Heating in Dry State *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, *37*, 433-437.
- [231] Darewicz, M. and Dziuba, J. The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine β -casein *Nahrung-Food* **2001**, *45*, 15-20.
- [232] Kim, H. J.; Choi, S. J.; Shin, W. S. et al. Emulsifying Properties of Bovine Serum Albumin-Galactomannan Conjugates *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 1049-1056.
- [233] Suppavorasatit, I.; De Mejia, E. G. and Cadwallader, K. R. Optimization of the Enzymatic Deamidation of Soy Protein by Protein-Glutaminase and Its Effect on the Functional Properties of the Protein *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 11621-11628.
- [234] Mirmoghtadaie, L.; Kadivar, M. and Shahedi, M. Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate *Food Chemistry* **2009**, *114*, 127-131.
- [235] Flory, P. J. Gels and gelling process *Faraday Discussions of the Chemical Society* **1974**, *57*, 7-18.
- [236] Giraudier, S.; Hellio, D.; Djabourov, M. et al. Influence of Weak and Covalent Bonds on Formation and Hydrolysis of Gelatin Networks *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1662-1666.
- [237] Guo, L.; Colby, R. H.; Lusignan, C. P. et al. Physical gelation of gelatin studied with rheo-optics *Macromolecules* **2003**, *36*, 10009-10020.
- [238] Bezrukov, M. G. Spatial Structure Formation in Protein Gels *Angewandte Chemie - International Edition* **1979**, *18*, 599-610.
- [239] Rich, L. M. and Foegeding, E. A. Effects of Sugars on Whey Protein Isolate Gelation *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 5046-5052.
- [240] Sun, Y.; Hayakawa, S. and Izumori, K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: Effect on protein structure and gel properties *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 1293-1299.
- [241] Babin, H. and Dickinson, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermo reversible gelation of gelatin *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 271-276.
- [242] Van den Bulcke, A. I.; Bogdanov, B.; De Rooze, N. et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31-38.
- [243] Lauber, S.; Henle, T. and Klostermeyer, H. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt *European Food Research and Technology* **2000**, *210*, 305-309.

- [244] Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Kuraishi, C. et al. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats *Journal of Nutrition* **1996**, *126*, 2557-2562.
- [245] Antoniewski, M. N. and Barringer, S. A. Meat Shelf-life and Extension using Collagen/Gelatin Coatings: A Review *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2010**, *50*, 644-653.
- [246] Chen, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins *Journal of Dairy Science* **1995**, *78*, 2563-2583.
- [247] Brandenburg, A. H.; Weller, C. L. and Testin, R. F. Edible films and coatings from soy protein *Journal of Food Science* **1993**, *58*, 1086-1089.
- [248] Shih, F. F. Film-forming properties and edible films of plant proteins *Nahrung* **1998**, *42*, 254-256.
- [249] Miller, K. S. and Krochta, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review *Trends in Food Science & Technology* **1997**, *8*, 228-237.
- [250] Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. D. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 423-432.
- [251] Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking *Biomaterials* **2001**, *22*, 763-768.
- [252] de Carvalho, R. A. and Grosso, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde *Food Hydrocolloids* **2004**, *18*, 717-726.
- [253] Rault, I.; Frei, V.; Herbage, D. et al. Evaluation of different chemical methods for crosslinking collagen gel, films and sponges *J.Mater.Sci.: Mater.Med.* **1996**, *7*, 215-221.
- [254] Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin *Biomaterials* **2002**, *23*, 4827-4832.
- [255] Moulds, L. d. and Riley, H. L. 110. The polymerisation of methylglyoxal *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1938**,
- [256] Ahmed, N.; Mirshekar-Syahkal, B.; Kennish, L. et al. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection *Molecular Nutrition & Food Research* **2005**, *49*, 691-699.
- [257] Biemel, K. M.; Friedl, D. A. and Lederer, M. O. Identification and Quantification of Major Maillard Cross-links in Human Serum Albumin and Lens Protein. EVIDENCE FOR GLUCOSEPANE AS THE DOMINANT COMPOUND *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 24907-24915.

- [258] Klöpfer, A.; Spanneberg, R. and Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of N^α -tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 394-401.
- [259] Ahmed, N. and Thornalley, P. J. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence *Biochemical Journal* **2002**, *364*, 15-24.
- [260] www.gelita.com **2012**,
- [261] Babel, W. Gelatin. A multipurpose biopolymer. Manufacture, application, and chemical modification *Chemie in unserer Zeit* **1996**, *30*, 86-95.
- [262] Joly-Duhamel, C.; Hellio, D.; Ajdari, A. et al. All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity *Langmuir* **2002**, *18*, 7158-7166.
- [263] Joly-Duhamel, C.; Hellio, D. and Djabourov, M. All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry *Langmuir* **2002**, *18*, 7208-7217.
- [264] Nijenhuis, K. T. *Thermoreversible networks - Viscoelastic properties and structure of gels* 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin **1997**
- [265] Digenis, G. A.; Gold, T. B. and Shah, V. P. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, *83*, 915-921.
- [266] Spanneberg, R.; Osswald, F.; Kolesov, I. et al. Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3580-3585.
- [267] Mezger, T. *Ras Rheologie Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern* 1. Auflage, Vincentz-Verlag, Hannover **2000**
- [268] Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Stechmann, H. et al. Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films *Soft Matter* **2012**, *8*, 2222-2229.
- [269] Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H. Cheese: An Overview, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Volume 1: General Aspects* **2004**, Elsevier Academic Press London, 1-18
- [270] Lucey, J. A. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1: General Aspects* **2004**, Elsevier Academic Press 105-122
- [271] Crabbe, M. J. C. Rennets: General and Molecular Aspects, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Volume 1: General Aspects* **2004**, Elsevier Academic Press London, 19-45
- [272] McSweeney, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Volume 1: General Aspects* **2004**, Elsevier Academic Press London, 347-360

-
- [273] Gaiaschi, A.; Beretta, B.; Poiesi, C. et al. Proteolysis of β -Casein as a Marker of Grana Padano Cheese Ripening *Journal of Dairy Science* **2001**, *84*, 60-65.
- [274] Krause, W.; Koch, J.; Bohm, A. et al. Chemical and electrophoretic investigation of the ripening of Gouda and Karsdorfer acid curd cheeses *Milchwissenschaft-Milk Science International* **2002**, *57*, 83-87.
- [275] Drusch, S.; Faist, V. and Erbersdobler, H. F. Determination of N^{ϵ} -carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method *Food Chemistry* **1999**, *65*, 547-553.
- [276] Assar, S. H.; Moloney, C.; Lima, M. et al. Determination of N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry *Amino Acids* **2009**, *36*, 317-326.
- [277] Corzo, N.; Villamiel, M.; Arias, M. et al. The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese *Food Chemistry* **2000**, *71*, 255-258.
- [278] Pellegrino, L.; Battelli, G.; Resmini, P. et al. Effects of heat load gradient occurring in moulding on characterization and ripening of Grana Padano *Lait* **1997**, *77*, 217-228.
- [279] Schwietzke, U.; Schwarzenbolz, U. and Henle, T. Influence of cheese type and maturation time on the early Maillard reaction in cheese *Czech Journal of Food Sciences* **2009**, *27*, S140-S142.
- [280] Cooper, R. A. Metabolism of Methylglyoxal in Microorganisms *Annual Review of Microbiology* **1984**, *38*, 49-68.
- [281] Repts, A.; Hammond, E. G. and Glatz, B. A. Carbonyl-Compounds Produced by the Growth of *Lactobacillus bulgaricus* *Journal of Dairy Science* **1987**, *70*, 559-562.
- [282] Vedamuth, E. R.; Sandine, W. E. and Elliker, P. R. Flavor and Texture in Cheddar Cheese. 2. Carbonyl Compounds Produced by Mixed Strain Lactic Starter Cultures *Journal of Dairy Science* **1966**, *49*, 151-157.
- [283] Kowalewska, J.; Zelazowska, H.; Babuchowski, A. et al. Isolation of Aroma-Bearing Material from *Lactobacillus helveticus* Culture and Cheese *Journal of Dairy Science* **1985**, *68*, 2165-2171.
- [284] Urbach, G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products *International Dairy Journal* **1995**, *5*, 877-903.

7 Abbildungsverzeichnis

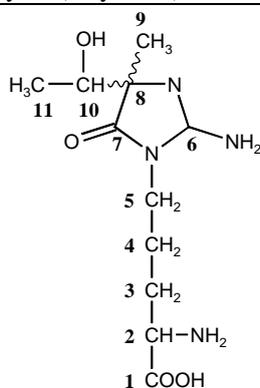
Abbildung 1: Bildung von α -Dicarbonylverbindungen mit Erhalt des Kohlenhydratrückgrats während der frühen und fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion.....	3
Abbildung 2: α -Dicarbonylverbindungen mit 2-5 Kohlenstoffatomen.....	4
Abbildung 3: Postulierte Bildungsmechanismen für MGO und GL nach [10; 18; 22-24; 27] ..	6
Abbildung 4: Zusammenfassung unterschiedlicher Bildungswege von MGO und GL.....	8
Abbildung 5: Derivatisierungsmöglichkeiten zum Nachweis von α -Dicarbonylverbindungen	12
Abbildung 6: Mechanismen der AGE-Bildung.....	25
Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm der N^α - <i>t</i> -Boc-Arginin-MGO-Inkubation nach 24 h....	31
Abbildung 8: Konzentrationen wichtiger Verbindungen während der Inkubation von N^α - <i>t</i> -Boc-Arginin mit MGO	31
Abbildung 9: Bildung und Reaktionswege von MGO-Arginin-Modifikationen	33
Abbildung 10: Chromatogramm der Inkubation (37 °C, pH 7,4) von 5 mM MG-H3 mit 2,5 mM Acetaldehyd nach 6 h.....	42
Abbildung 11: Konzentrationen der Verbindungen während der Inkubation (37 °C, pH 7,4) von 5 mM MG-H3 mit 2,5 mM Acetaldehyd.....	42
Abbildung 12: Bildung von MODIC (t = 77 h) in der Inkubation von 20 mM Arginin mit 20 mM MGO und Zugabe von 20 mM Lysin nach 24 h.....	43
Abbildung 13: Bildung von MODIC (t = 77 h) in der Inkubation von 20 mM Lysin mit 20 mM MGO und Zugabe von 20 mM Arginin nach 24 h	43
Abbildung 14: physikalische Eigenschaften GL-vernetzter Gelatinefolien	46
Abbildung 15: mechanische Eigenschaften GL-vernetzter Gelatinefolien	46
Abbildung 16: Gelierzeit chemisch-modifizierter FFS	48
Abbildung 17: Visko-elastische Eigenschaften des Hydrogels chemisch-modifizierter FFS ..	48
Abbildung 18: CEL-Gehalt während der Reifung von Sauermilchkäse	66
Abbildung 19: MGO-Gehalt während der Reifung von Sauermilchkäse.....	66
Abbildung 20: CEL-Gehalt der Goudasorten.....	67
Abbildung 21: MGO-Gehalt der Goudasorten	67
Abbildung A - 1: Abbau des Acet1 bei 37 °C, pH 7,4.....	107
Abbildung A - 2: Abbau des Acet2 bei 37 °C, pH 7,4.....	107
Abbildung A - 3: Chromatogramme der Inkubation von 5 mM MG-H3 mit 5 mM Glyceraldehyd nach 24 h bei 37 °C, pH 7,4).....	108

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gehalte verschiedener α -Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln	13
Tabelle 2: Ausgewählte α -Dicarbonylverbindungen <i>in vivo</i>	14
Tabelle 3: Monovalente Lysin-Modifikationen (Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe).....	18
Tabelle 4: Bivalente Lysin-Lysin-Modifikationen (Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe).....	19
Tabelle 5: Monovalente Arginin-Modifikationen (Arg kennzeichnet die Modifizierung der Guanidinogruppe).....	20
Tabelle 6: Bivalente Lysin-Argin-Modifikationen (Lys kennzeichnet die Modifizierung der ϵ -Aminogruppe, Arg die Modifizierung der Guanidinogruppe)	21
Tabelle 7: MGO-Arginin-Modifikationen in Lebensmitteln und physiologischen Matrices...	30
Tabelle 8: Bestimmung und Bedeutung der untersuchten Folienparameter.....	45
Tabelle A - 1: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Verbindung 2-Amino-5-(2-amino-4-methyl-4-(ethyl-1-ol)-5-imidazolinon-1-yl)-pentansäure (Acet2)	105
Tabelle A - 2: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Verbindung 2-Amino-5-(2-amino-4-methyl-4-(ethyl-1-ol)-5-imidazolinon-1-yl)-pentansäure (Acet1)	106

9 Anhang

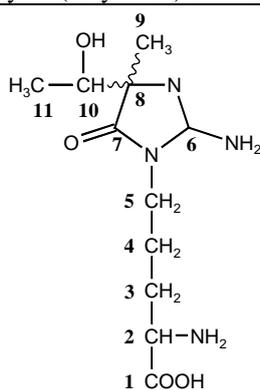
Tabelle A - 1: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Verbindung
2-Amino-5-(2-amino-4-methyl-4-(ethyl-1-ol)-5-imidazolinon-1-yl)-pentansäure (Acet2)



m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 273,15568 (ber. 273,15573 für $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_4$)

C-Atom	H-Atom		Anzahl	$J_{\text{H,H}}$ [Hz]
	δ [ppm]	δ [ppm]		
C ₁	171,50			
C ₂	53,44	C ₂ -H	1	
C ₃	24,66	C ₃ -H	2	
C ₄	28,44	C ₄ -H	2	
C ₅	39,94	C ₅ -H	2	
C ₆	159,33			
C ₇	175,82			
C ₈	69,00			
C ₉	19,60	C ₉ -H	3	
C ₁₀	71,90	C ₁₀ -H	1	$^3J_{\text{C}_{11}\text{-H}}$ 6,32
C ₁₁	17,15	C ₁₁ -H	3	$^3J_{\text{C}_{11}\text{-H}}$ 6,40

Tabelle A - 2: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Verbindung
2-Amino-5-(2-amino-4-methyl-4-(ethyl-1-ol)-5-imidazolinon-1-yl)-pentansäure (Acet1)



m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 273,15558 (ber. 273,15573 für $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_4$)

C-Atom	H-Atom		Anzahl	$J_{\text{H,H}}$ [Hz]
	δ [ppm]	δ [ppm]		
C ₁	173,74			
C ₂	54,00	C ₂ -H	1	
C ₃	24,50	C ₃ -H	2	
C ₄	28,36	C ₄ -H	2	
C ₅	39,78	C ₅ -H	2	
C ₆	159,63			
C ₇	177,04			
C ₈	69,36			
C ₉	18,42	C ₉ -H	3	
C ₁₀	71,26	C ₁₀ -H	1	$^3J_{\text{C}_{11}\text{-H}}$ 6,34
C ₁₁	17,05	C ₁₁ -H	3	$^3J_{\text{C}_{11}\text{-H}}$ 6,11

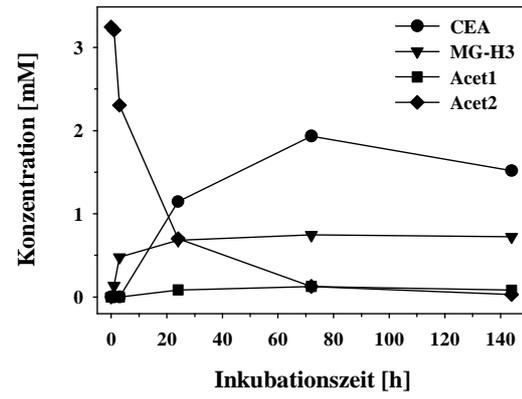
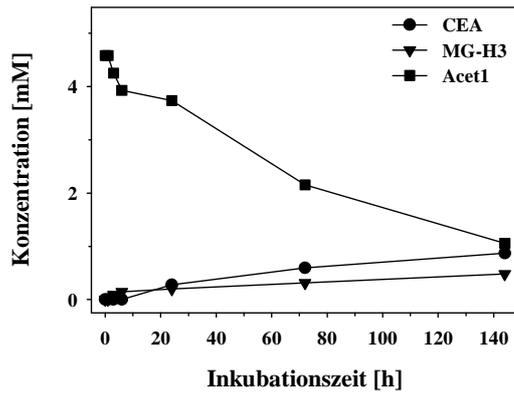


Abbildung A - 1: Abbau des Acet1 bei 37 °C, pH 7,4 Abbildung A - 2: Abbau des Acet2 bei 37 °C, pH 7,4

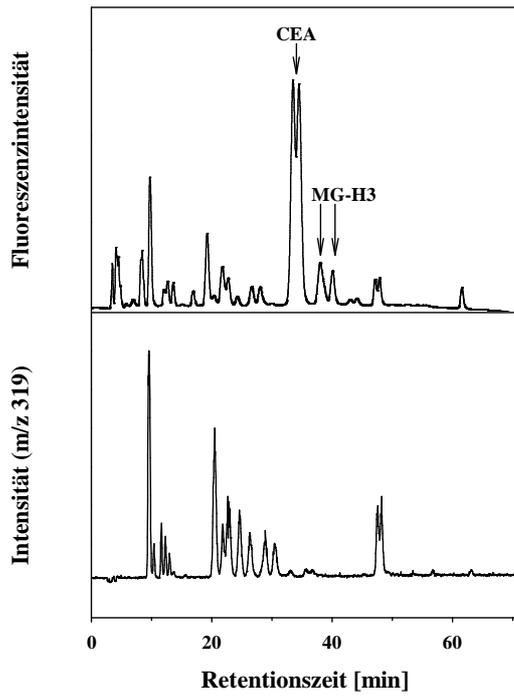


Abbildung A - 3: Chromatogramme der Inkubation von 5 mM MG-H3 mit 5 mM Glyceraldehyd nach 24 h bei 37 °C, pH 7,4)

Lebenslauf

Zur Person

Robert Spanneberg
geboren am 02.08.1981 in Halle (Saale)
ledig

Berufliche Laufbahn

Seit 03.2012	Laborleiter bei MQD Qualitätsprüfungs- und Dienstleistungsgesellschaft Mecklenburg-Vorpommern mbH
05.2007 - 04.20011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittelchemie und Umweltchemie (Arbeitskreis Prof. Dr. M.A. Glomb)

Hochschul- und Berufsausbildung

05.2006 - 04.2007	Dritter Abschnitt der Staatsprüfung für staatlich geprüfte Lebensmittelchemiker am Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
10.2001 - 04.2006	Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulische Ausbildung

09.1994 - 08.2000	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium Halle (Saale)
09.1992 - 08.1994	Südstadt-Gymnasium Halle/Saale

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Spanneberg, R.; Salzwedel, G.; Glomb, M. A. Formation of Early and Advanced Maillard Reaction Products Correlates with the Ripening of Cheese *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 600-607

Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Stechmann, H.; Figura, L.; Glomb, M. A. Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films *Soft Matter* **2012**, *8*, 2222-2229

Klöpfer, A.; **Spanneberg, R.;** Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of *N*^α-*tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, *59*, 394-401

Spanneberg, R.; Osswald, F.; Kolesov, I.; Anton, W.; Radusch, H.-J.; Glomb, M. A. Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reactions with Glyoxal and Glycolaldehyde *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 3580-3585

Tagungsvorträge

Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Herstellung und Charakterisierung chemisch modifizierter Gelatinefolien 20. Arbeitstagung des Regionalverbands Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 25.-26.03.2010, Dresden (Abstract in: *Lebensmittelchemie* (in press))

Spanneberg, R.; Klöpfer, A.; Glomb, M. A. Neue Erkenntnisse zur Bildung von Methylglyoxal-Arginin-Modifikationen 19. Arbeitstagung der Regionalverbände Nord, Nordost und Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 02.-03.04.2009 (Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2009**, *63* (6), 154)

Posterbeiträge

Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Glomb, M. A. Modifizierung von Gelatine zur landwirtschaftlichen Nutzung 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2010, Stuttgart-Hohenheim (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2011**, *65* (3), 52)

Spanneberg, R.; Salzwedel, G.; Glomb, M. A. Korrelation chemischer Parameter mit der Käsereifung 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2010, Stuttgart-Hohenheim (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2011**, *65* (3), 51)

Osswald, F.; **Spanneberg, R.**; Glomb, M. A. Modifizierung von Biopolymeren und deren Anwendung in der Landwirtschaft 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2010**, 64 (4), 85)

Hoyer, Y.; **Spanneberg, R.**; Glomb, M. A. Fermentative Veränderungen von Nahrungsmittelproteinen 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2010**, 64 (2), 39)

Feyer, J.; **Spanneberg, R.**; Glomb, M. A. Entwicklung einer Methode zur Charakterisierung modifizierter Proteine 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 08.-10.09.2008, Kaiserslautern (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (4), 101)

Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Untersuchungen zur Reaktivität von N^{β} -endozyklischem Hydroimidazolinon – Eine Schlüsselverbindung bei der Reaktion von L-Arginin mit Methylglyoxal 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 08.-10.09.2008, Kaiserslautern (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (4), 101)

Spanneberg, R.; Klöpfer, A.; Glomb, M. A. Formation of methylglyoxal-arginine-modifications 9th International Symposium on the Maillard Reaction, 01.-05.09.2007, München

Spanneberg, R.; Klöpfer, A.; Glomb, M. A. Mechanistische Untersuchungen zur Bildung von Methylglyoxal-Arginin-Modifikationen 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 18.–20.09.2006, Dresden (Abstract in *Lebensmittelchemie* **2007**, 61 (4), 77)

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Mechanistische und anwendungsbezogene Untersuchungen zur Proteinmodifizierung durch α -Dicarbonylverbindungen“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

.....

Datum, Unterschrift