Auswirkung der enzymatischen Modifizierung der Phospholipide auf die techno-funktionellen Eigenschaften von Eigelb

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur
Waldemar Buxmann

aus Tscheljabinsk

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.- Ing. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dr. Agr. Iryna Smetanska

1. Berichter: Prof. Dr. Dipl.-Ing. Dietrich Knorr

2. Berichter: Dr.-Ing. Volker Heinz

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.11.2009

Berlin 2009

D-83

meinen Eltern

„Das Glück Deines Lebens wird bestimmt von der Beschaffenheit Deiner Gedanken.“

Marc Aurel (121-180)

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2007 bis Oktober 2009 am Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik (DIL) e.V. in Quakenbrück angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietrich Knorr für die Überlassung des interessanten Themas und für die Übernahme des Hauptreferats.

Dem Leiter des Deutschen Instituts für Lebensmitteltechnik Herrn Dr. Volker Heinz danke ich für die Möglichkeit, am DIL meine Arbeit anfertigen zu dürfen, für die Übernahme des Korreferats und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Smetanska für die Übernahme des Vorsitzes im Promotionsausschuss.

Insbesondere möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Knut Franke und Frau Dr. Ute Bindrich bedanken, die durch die hervorragende und umfassende Betreuung und die stets entgegengebrachte Unterstützung im hohen Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Frau Sabine Franke bedanke ich mich für die intensive und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. Ulf Strijowski danke ich für die zahlreichen Auskünfte zu chemischen und EDV-technischen Fragestellungen und für die wertvolle Hilfe bei der Auswertung von CD-Messungen. Auch Herrn Prof. Dr. Stefan Töpfl möchte ich für die sachkundigen Ratschläge bezüglich der Gestaltung der Dissertationsschrift danken. Den Mitarbeitern der Abteilungen Physik und Forschungsanalytik danke ich herzlich für ihren unermüdlichen Einsatz und stetige Hilfsbereitschaft. Meinen Bürokollegen und allen Mitarbeitern des DIL danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Viktor und Elvira Buxmann, meinen Schwestern Olga und Veronika und meiner Freundin Maria für die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Waldemar Buxmann: „Auswirkung der enzymatischen Modifizierung der Phospholipide auf die techno-funktionellen Eigenschaften von Eigelb“

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hydrolysevorgänge und Strukturänderungen während der *In-situ*-Inkubation des Eigelbs mit Phospholipasen A_2 aus Schweinepankreas (PLA_2) und D aus *Streptomyces chromofuscus* (PLD) charakterisiert. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen dieser Behandlung sowie eines Zusatzes von aus PLA_2-behandeltem Eigelb isolierten Lyso-Phospholipiden auf die Emulgiereigenschaften des Eigelbs untersucht. Besondere Berücksichtigung fand dabei die Hitzestabilität der daraus hergestellten O/W-Emulsionen. Die Untersuchungen richteten sich primär auf die Zusammensetzung, die Struktur, die Ladung und die Stabilität des Grenzflächenfilms dieser Emulsionen, so dass anschließend Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen gezogen werden konnten.

Die enzymatische Hydrolyse der Phospholipide im Eigelb mit PLA_2, bei der Lyso-Phospholipide und freie Fettsäuren gebildet werden, bewirkt eine partielle Auflösung der Granulapartikel und somit eine Strukturänderung der Eigelbmatrix. Die Untersuchung eigelbstabilisierter Emulsionen zeigte, dass die Belegung der Emulsionsgrenzfläche sowohl durch Phospholipid-Aggregate als auch durch Protein-Phospholipid-Komplexe erfolgen kann. Der Einsatz eines PLA_2-modifizierten Eigelbs führt dazu, dass die Grenzfläche ausschließlich durch die Protein-Lyso-Phospholipid-Komplexe stabilisiert wird. Der Grenzflächenfilm in diesen Emulsionen ist dabei deutlich homogener und dichter als der entsprechende Grenzflächenfilm in Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb. Die Protein-Lyso-Phospholipid-Komplexe an der Grenzfläche zeigen eine beträchtliche Stabilität gegenüber höheren Temperaturen (75 °C und 85 °C) und tragen damit zur Erhöhung der Hitzestabilität der Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb bei. Die hitzestabilisierende Wirkung der PLA_2-Behandlung kann damit sowohl auf die Strukturveränderungen des Grenzflächenfilms als auch auf die veränderten Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden im Grenzflächenfilm während der Erhitzung zurückgeführt werden. Der Zusatz von Lyso-Phospholipiden führt zur Erhöhung der Grenzflächenaktivität des Eigelbs und hat einen positiven Einfluss auf die Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen. Außerdem wurde erstmals nachgewiesen, dass die freien Fettsäuren bei diesen Stabilisierungsmechanismen keine Rolle spielen, wie es z.B. für die *In-situ*-Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 diskutiert wird. Es wurde demonstriert, dass sich Eigelb als Substrat für die *In-situ*-Inkubation mit PLD eignet. Das Enzym spaltet die Esterbindung an der Phosphat-Gruppe des Phospholipidmoleküls, wobei Phosphatidsäure (PA) und ein Alkohol gebildet werden. Die Behandlung mit PLD bewirkt ebenfalls eine Strukturänderung der Eigelbmatrix, die zur Viskositätszunahme des Eigelbs führt. Durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD wird die Sekundärstruktur der Eigelbproteine beeinflusst, wobei der Anteil an α-Helix-Strukturen im Eigelb deutlich zunimmt. Im Grenzflächenfilm, der die Emulsionsgrenzfläche der aus PLD-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen stabilisiert, sind sowohl Protein-Phospholipid-Komplexe als auch einzelne PA-Aggregate zu finden. Der Grenzflächenfilm selber ist in diesen Emulsionen deutlich homogener und stabiler, verglichen mit den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb. Neben der höheren Grenzflächenaktivität des PLD-behandelten Eigelbs weisen die daraus hergestellten Emulsionen auch eine höhere Stabilität bei Temperaturen von 75 °C und 85 °C auf. Die Hitzestabilität ist dabei vergleichbar mit den Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb. Dafür sind einerseits die veränderten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und PA, die im neutralen pH-Bereich anionisch ist, verantwortlich. Andererseits wird durch die Anwesenheit von PA die negative Ladung der Grenzfläche erhöht. Die damit verbundene stärkere Abstoßung der Öltropfen untereinander trägt ebenfalls zur höheren Hitzestabilität der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb bei.

Waldemar Buxmann: "Impact of enzymatic modification of phospholipids on techno-functional properties of egg yolk"

Hydrolysis processes and structure modification during *in situ* incubation of egg yolk with phospholipase A_2 derived from pork pancreas (PLA_2) and phospholipase D (PLD) from *Streptomyces chromofuscus* were investigated in the present work. Impact of this treatment as well as of addition of lyso-phospholipids, which had been previously derived from PLA_2-treated egg yolk, on emulsifying properties of egg yolk was described. Especially, heat stability of o/w-emulsions prepared with modified egg yolk was investigated in detail. Investigations mainly focused on composition, structure, charge and stability of the oil droplet surfaces to enable understanding and explaining the underlying mechanisms.

The enzymatic hydrolysis of egg yolk phospholipids resulting in formation of lyso-phospholipids and free fatty acids caused a partial disruption of granule particles. This effect modifies the structure of egg yolk matrix. Droplet surface layers of egg yolk stabilised emulsions consist of protein-phospholipid-complexes as well as of phospholipid aggregates. However, surface layers of emulsions prepared with PLA_2-treated egg yolk are stabilised by protein-lyso-phospholipid-complexes. Surface covering in these emulsions is more homogeneous and tighter compared to emulsions prepared with untreated egg yolk. The protein-lyso-phospholipid-complexes exhibit a considerable stability during thermal treatment at 75 °C and 85 °C and thus contribute to an increased heat stability of emulsions prepared with PLA_2-treated egg yolk. Modified structures of surface layers as well as modified interactions between proteins and lyso-phospholipids due to heat treatment are assumed to be mainly responsible for improved heat stability of emulsions prepared with PLA_2-treated egg yolk. Emulsifying activity of egg yolk increases after addition of lyso-phospholipids. Emulsions prepared with this egg yolk show improved heat stability. For the first time, it could be shown that free fatty acids do not contribute to these mechanisms as it was discussed for the *in situ* incubation of egg yolk with PLA_2. Egg yolk has been shown to be a suitable substrate for *in situ* incubation with PLD which catalyses a cleavage of the phospholipid head group resulting in a formation of phosphatidic acid (PA) and an alcohol. A structure modification causing a considerable increase of egg yolk viscosity was observed during incubation. PLD treatment influences the secondary structure of egg yolk proteins, especially higher portion of α-helix structures could be detected. Droplet surfaces of emulsions stabilised by PLD-treated egg yolk are covered by protein-phospholipid-complexes as well as by PA aggregates. An improved homogeneity and increased tightness of surface covering layers can be observed in emulsions prepared with PLD-treated egg yolk compared to emulsions prepared with untreated egg yolk. Emulsifying activity of egg yolk as well as stability of emulsions after heat treatment at 75 °C and 85 °C significantly increase after incubation with PLD. The latter effects are comparable to those of egg yolk incubated with PLA_2. Improved emulsifying properties of egg yolk treated with PLD are predominantly related to the modified interactions of proteins and PA. Moreover, presence of negatively charged PA influences oil droplet interfaces in the emulsion leading to a higher negative charge of droplet surfaces. This change in the electrostatic properties contributes to higher repulsion forces between droplets and thus to increased heat stability of emulsions prepared with PLD-treated egg yolk.

Vorwort ..... **I**

I Abkürzungs- und Symbolverzeichnis ..... **IX**

1 Einleitung und Aufgabenstellung **1**

2 Theoretische Grundlagen **3**

2.1 Grundlagen der Öl-in-Wasser-Emulsionssysteme **3**

2.1.1 Eigenschaften 3

2.1.2 Destabilisierungsmechanismen 6

2.1.3 Grenzflächenaktive Substanzen im Lebensmittelbereich 8

2.1.3.1 Emulgatoren 8

2.1.3.2 Emulgiereigenschaften von Proteinen 11

2.1.4 Stabilisierungsmechanismen einer O/W-Emulsion 13

2.1.5 Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Emulgatoren an der Grenzfläche 14

2.1.5.1 Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ionischen Emulgatoren 15

2.1.5.2 Verhalten an der Grenzfläche 16

2.2 Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften von Eigelb **19**

2.2.1 Struktur und Zusammensetzung des Eigelbs 19

2.2.2 Proteine des Eigelbs 20

2.2.2.1 Proteine des Plasmas 20

2.2.2.2 Proteine der Granulafraktion 22

2.2.3 Lipide des Eigelbs 24

2.2.3.1 Acylglyceride und Fettsäuren 24

2.2.3.2 Phospholipide 25

2.2.4 Emulgiereigenschaften des Eigelbs 27

2.2.4.1 Emulgiereigenschaften von Eigelbfraktionen 28

2.2.4.2 Konkurrierende Adsorption von Eigelbfraktionen 29

2.2.5 Thermisches Verhalten der Eigelbproteine 31

2.2.6 Thermische Behandlung eigelbstabilisierter O/W-Emulsionen 32

2.3 Enzymatische Modifizierung der Eigelbphospholipide durch Phospholipasen **34**

2.3.1 Phospholipasen 34

2.3.1.1 Phospholipase A_2 35
2.3.1.2 Phospholipasen D....37
2.3.2 Industrielle Anwendung von Phospholipasen....41
2.3.2.1 PLA_2 in der Lebensmittelindustrie....41
2.3.2.2 Beeinflussung der Eigenschaften des Eigelbs durch Phospholipase A_2 41
2.3.2.3 Industrielle Nutzung der Phospholipase D....43

3 Material und Methoden 44

3.1 Materialien 44
3.1.1 Chemikalien....44
3.1.2 Standards 45
3.1.3 Weitere Materialien....45
3.1.4 Geräte und Hilfsmittel 46

3.2 Charakterisierung der Inkubation des Eigelbs mit Phospholipasen 47
3.2.1 Inkubation des Eigelbs mit Phospholipasen 47
3.2.2 Messung des Hydrolysegrades mittels dünnschichtchromatographischer Quantifizierung der Phospholipide und Lysophospholipide....48
3.2.2.1 Extraktion der Phospholipide aus der Eigelbmatrix 48
3.2.2.2 Dünnschichtchromatographie....49

3.3 Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Eigelbs 50
3.3.1 Fraktionierung des Eigelbs 50
3.3.1.1 Trennung von Granula und Plasma....50
3.3.1.2 Auftrennung der Granulafraktion 51
3.3.1.3 Auftrennung der Plasmafraktion 51
3.3.1.4 Dialyse....52
3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....53
3.3.2.1 Entfettung der Proben....53
3.3.2.2 SDS-PAGE 53
3.3.2.3 Identifizierung einzelner Eigelbproteine....55

3.4 Methoden zur Charakterisierung des Eigelbs....57
3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie 57
3.4.2 Circulardichroismus 57
3.4.3 Rheologische Charakterisierung des Eigelbs....58
3.4.4 Bestimmung der dynamischen Grenzflächenspannung 59

3.5 Charakterisierung der aus Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen 60
3.5.1 Herstellung der Emulsionen 60
3.5.1.1 Emulsionen aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb 60
3.5.1.2 Emulsionen aus Eigelb nach Zusatz von Lyso-Phospholipiden 60
3.5.1.3 Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb 61
3.5.2 Bestimmung der spezifischen Grenzfläche 61
3.5.3 Wärmebeanspruchung der Modellemulsion 61
3.5.4 Untersuchung der Grenzflächenbelegung 62
3.5.4.1 Auftrennung der kontinuierlichen und der dispersen Phasen 62
3.5.4.2 Grenzflächenbelegung der Emulsionen 63
3.5.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes der dispersen Phase 63
3.5.4.4 Bestimmung des Phospholipidgehalts der dispersen Phase 64
3.5.5 Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren in der dispersen Phase 64
3.5.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) 68
3.5.7 Rheologische Charakterisierung der Emulsionen 69
3.5.8 Bestimmung der Oberflächenladung der Emulsionstropfen (Zetapotential) 69
3.5.9 Bestimmung des extrahiebaren Fettanteils in Emulsionen 70

4 Ergebnisse und Diskussion 71

4.1 Auswirkungen der enzymatischen Behandlung des Eigelbs mit Phospholipase A_2 auf dessen Eigenschaften 71
4.1.1 Einfluss auf die Zusammensetzung des Eigelbs 71
4.1.2 Einfluss auf Strukturelemente des Eigelbs 72
4.1.3 Einfluss auf die Proteinstruktur des Eigelbs 75
4.1.4 Einfluss auf die Grenzflächeneigenschaften 78
4.1.5 Einfluss auf die Funktionalität in Emulsionen 80
4.1.5.1 Festlegung der Parameter der hitzeinduzierten Destabilisierung von Emulsionen 80
4.1.5.2 Spezifische Grenzfläche der O/W-Emulsionen 82
4.1.6 Einfluss auf die Zusammensetzung und Struktur der Emulsionsgrenzfläche 85
4.1.6.1 Proteingrenzflächenbelegung 85
4.1.6.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung 91
4.1.6.3 Belegung der Grenzfläche mit freien Fettsäuren 93

4.1.6.4 Struktur der Emulsionsgrenzfläche 96
4.1.6.5 Ladung der Emulsionsgrenzfläche 98
4.1.6.6 Stabilität des Grenzflächenfilms 99
4.1.7 Diskussion der Mechanismen bezüglich der verbesserten Hitzestabilität der mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierten O/W-Emulsionen 101

4.2 Auswirkungen des Zusatzes von Lyso-Phospholipiden auf die Emulgiereigenschaften des Eigelbs 104
4.2.1 Auswirkungen auf die Emulgiereigenschaften 104
4.2.2 Auswirkungen auf die Grenzflächenbelegung 107
4.2.2.1 Proteingrenzflächenbelegung 107
4.2.2.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung 109
4.2.2.3 Belegung der Grenzfläche mit freien Fettsäuren 112
4.2.3 Struktur der Grenzfläche 113
4.2.4 Diskussion der Hitzestabilität eigelbstabilisierter Emulsionen durch Zusatz von Lyso-Phospholipiden 114

4.3 Beeinflussung der Eigenschaften des Eigelbs durch die Behandlung mit Phospholipase D 116
4.3.1 Einfluss auf die Zusammensetzung der Phospholipide 116
4.3.2 Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften und die Struktur des Eigelbs 117
4.3.3 Einfluss der Behandlung mit Phospholipase D auf die Proteinstruktur des Eigelbs 120
4.3.4 Einfluss auf die Grenzflächeneigenschaften 122
4.3.5 Einfluss auf die Funktionalität in Emulsionen 122
4.3.6 Rheologische Eigenschaften 128
4.3.7 Zusammensetzung und Struktur der Emulsionsgrenzfläche 129
4.3.7.1 Proteingrenzflächenbelegung 129
4.3.7.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung 134
4.3.7.3 Ladung der Emulsionsgrenzfläche 137
4.3.7.4 Stabilität des Grenzflächenfilms 138
4.3.7.5 Struktur der Emulsionsgrenzfläche 140
4.3.8 Diskussion möglicher Mechanismen, die zur Verbesserung der Emulgiereigenschaften des Eigelbs durch *In-situ*-Behandlung mit PLD führen 142

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen 145

6 Anhang..... 150

Lebenslauf..... 154

Publikationsliste 155

Eidesstattliche Erklärung..... 157

Bilderverzeichnis 158

Tabellenverzeichnis..... 164

Literaturverzeichnis..... 165

I Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

Zeichen	Bedeutung
CLSM	Konfocale Laserscanning- Mikroskopie
CMC	Critical mecellzation concentration
DC	Dünnschichtchromatographie
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FFE	Freifettanteil
FFS	Freie Fettsäuren
GC	Gaschromatographie
HDL	High Density-Lipoproteine
HLB	Hydrolphilic Lipophilic Balance
HPTLC	High Perfomance Thin Lyaer Chromatography
ICP/OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ISTD	Interner Standard
kDa	Kilo-Dalton
LDL	Low Density-Lipoproteine
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPE	Lyso-Phosphatidylethanolamin
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular Wight (Molekülmasse)
NaCl	Natriumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O/W	Öl-in-Wasser
PA	Phosphatidsäure
PC	Posphatidylcholin
PE	Posphatidylethanolamin
pH	pH-Wert
PI	Phosphatidylinositol
PI	isoelektrischer Punkt
PLA_1	Phospholipase A_1
PLA_2	Phospholipase A_2
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C

PLD	Phospholipase D
REM	Rasterelektronen Mikroskopie
SDS	SDS sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPE	Solid phase extraction
STD	Standard
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UHT	Ultrahocherhitzung
VLDL	Very-Low-Density Lipoproteine
W/O	Wasser-in-Öl

Symbole

Zeichen	Bedeutung	Einheit
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit	[s^{-1}]
γ	Grenzflächenspannung	[kg/s^2]
τ	Scherspannung	[Pa]
η_k	Viskosität der kontinuierlichen Phase	[Pa s]
ρ_H	Dichte der wässrigen Phase	[kg/m^3]
$\dot{\gamma}_0$	konstante Schergeschwindigkeit	[s^{-1}]
μ_i	Chemisches Poteintial der Systemkomponente i	
A	Phasengrenzfläche	[m^2]
$A_{0,sp}$	Spezifische Grenzfläche	[m^2/g]
$A_{FFS\text{-}Methyl}$	Fläche des FFS-Methylesters in der Eigelbprobe	
$A_{ISTD\text{-}Methyl}$	Fläche des FFS-Methylesters des internen Standards	
a_w	Wasseraktivität	
c	Konzentration	[mg/g]
c_F	Gesamtfettgehalt der Emulsion	[%]
d_{32}	Sauterduchmesser	[m]
dA	Änderung der Grenzfläche	[m^2]
dF	Änderung der freien Energie	[$kg \cdot m^2/s^2$]
d_j	Tropfendurchmesser	[m]
e_F	Konzentration des jeweiligen Stoffes	[mg/g]
E_{Probe}	Einwaage der Eigelbprobe	[g]
FFE	Freifettanteil	[%]
g	Erdbeschleunigung	[m/s^2]
g	Gramm	

G_{ISTD}	Gehalt des internen Standards in der Eigelbprobe	[g]
h	Stunde	
K	Konsistenzfaktor	[Pa]
K	Kelvin	
kg	Kilogramm	
M	Molmasse	[g/mol]
m_E	Einwaage Emulsion	[g]
m_F	Masse extrahiertes Fett nach Trocknung	[g]
min	Minute	
n	Fließindex	
n_i	Stoffmenge der Systemkomponente i	[M]
N_j	Tropfenzahl	-
p	Druck	[Pa]
pKs	Negativer Logarithmus der Säurekonstante Ks	
r	Tropfenradius	[m]
R	Responsefaktor	
R_f	Relate to front	
s	Sekunde	
S	Entropie	$[kg \cdot m^2K)/s^2]$
s_n	Stereochemical numbering	
T	Temperatur	[K]
U	Umdrehungen pro Minute	min^{-1}
V	Volumen	$[m^3]$
v	Aufrahmgeschwindigkeit	[m/s]
v/v	(Volumen/Volumen)	
V_p	Volumen der dispersen Phase	$[m^3]$
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)	
$x_{10,3}$; $x_{50,3}$; $x_{90,3}$	Parameter der Öltropfenverteilung	[µm]
Γ	Grenzflächenbelegung	$[mg/m^2]$
λ	Wellenlänge	[nm]
ρ	Dichte der dispersen Phase	$[kg/m^3]$
ρ_d	Dichte der dispersen Phase	$[kg/m^3]$
ρ_k	Dichte der kontinuierlichen Phase	$[kg/m^3]$

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Eigelb gehört zu den vielseitigsten Lebensmittelkomponenten. Es enthält hochwertige Nährstoffe in konzentrierter, leicht resorbierbarer Form und spielt damit eine wichtige Rolle in der Ernährung des Menschen. Insbesondere ist es aber in der Lebensmittelindustrie universell einsetzbar. Die vielfältige Verwendung des Eigelbs in der Lebensmittelindustrie basiert im Wesentlichen auf drei Eigenschaften: dem Gelbildungs- und dem Schaumbildungsvermögen und vor allem der Wirkung als Emulgator. So zählt Eigelb zu den wichtigsten natürlichen Emulgatoren und findet Anwendung bei der Herstellung von Lebensmittelemulsionen, wie z.B. Mayonnaise oder Sauce Hollandaise. Die techno-funktionellen Eigenschaften des Eigelbs werden einerseits durch seine spezifische Zusammensetzung, u.a. Proteine und Phospholipide, und andererseits durch die Strukturelemente im Eigelb, z.B. granuläre Partikel und Low-Density-Lipoprotein- (LDL-) Mizellen, bestimmt (Belitz *et al*., 2005; Ternes, 2008).

Die Einschränkungen beim Einsatz des Eigelbs ergeben sich durch die Hitzeempfindlichkeit der daraus hergestellten Emulsionen. Erhitzt man eine eigelbstabilisierte Emulsion auf über 75 °C, so bricht diese, was eine industrielle Haltbarmachung, z.B. mittels UHT, unmöglich macht. Bereits 1974 wurde von Unilever eine Methode patentiert, die die Herstellung hitzestabiler eigelbstabilisierter Emulsionen nach der Behandlung des Eigelbs mit Phospholipase A_2 (PLA_2) beschreibt (Van Dam, 1974). PLA_2 katalysiert die Abspaltung der Fettsäure an der sn_2-Position des Glyceringerüsts des Phospholipidmoleküls, so dass die entsprechenden Lyso-Phospholipide erhalten werden, die veränderte Wechselwirkungen mit den Proteinen des Eigelbs aufweisen (Mine, 2002). Trotz einer weitreichenden Anwendung der enzymatischen Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 zur Herstellung von hitzestabilen Emulsionen sind die entsprechenden Mechanismen bisher noch nicht ausreichend beschrieben. Zwar gibt es in der Literatur einige Ansätze, die darauf hindeuten, dass dafür die Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden während der Erhitzung verantwortlich ist, doch beschränken sich die entsprechenden Untersuchungen auf die Analyse von LDL-Mizellen des Eigelbs (Mine, 1997). Dabei ist die exakte Kenntnis dieser Mechanismen im Gesamteigelb für eine gezielte Einflussnahme auf die Endproduktqualität unabdingbar, so dass an dieser Stelle ein entsprechender Forschungsbedarf besteht.

Auf der anderen Seite können die beim Hydrolysevorgang freigesetzten Fettsäuren die sensorische Qualität der Produkte durch einen bitteren Beigeschmack beeinträchtigen. Außerdem wird die zurzeit eingesetzte PLA_2 überwiegend aus Schweinepankreas gewonnen, so dass Produkte mit derartig behandeltem Eigelb nicht mehr als „koscher“ bzw. „halal“ gelten, was den Absatz, beispielsweise im asiatischen Raum, einschränkt (Markert, 2004). Hinzu kommt, dass Konsumenten, die sich ausschließlich vegetarisch ernähren, solche Produkte aufgrund der tierischen Herkunft des Enzyms nicht akzeptieren. Daher wird seitens der Lebensmittelhersteller nach einem adäquaten Ersatz gesucht. Phospholipase D (PLD), die die Hydrolyse bzw. Umesterung des Kopfgruppenalkohols des Phospholipidmoleküls katalysiert, könnte solch eine Alternative darstellen. Die aus Mikroorganismen gewonnene PLD nimmt zurzeit vor allem in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie immer mehr an Bedeutung zu, wobei vorwiegend isolierte Phospholipide als Substrat für die Inkubation mit dem Enzym eingesetzt werden. Zur direkten Umsetzung der Phospholipide in einer natürlichen Lebensmittelmatrix, wie z.B. Eigelb, lagen bisher keine Ergebnisse vor.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, einerseits einen Beitrag zum besseren Verständnis der Mechanismen, die zur Erhöhung der Hitzestabilität der aus PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen führen, zu leisten. Andererseits soll der Einsatz von PLD aus *Streptomyces chromofuscus* zur Modifizierung des Eigelbs hinsichtlich dessen Emulgiereigenschaften untersucht werden. Dazu sollen zunächst die Hydrolysevorgänge anhand der Änderung der Zusammensetzung und der Struktur des Eigelbs während der Behandlung mit beiden Enzymen charakterisiert werden. Die Untersuchung des Einflusses der enzymatischen Modifizierung des Eigelbs auf dessen Emulgiereigenschaften, insbesondere bezüglich der Hitzestabilität, wird an O/W-Emulsionen durchgeführt. Das besondere Augenmerk soll dabei auf der Untersuchung der Zusammensetzung, der Struktur, der Ladung und der Stabilität des Grenzflächenfilms dieser Emulsionen liegen. Zusätzlich sollen die Auswirkungen des Zusatzes von aus PLA_2-behandeltem Eigelb isolierten Lyso-Phospholipiden auf die Emulgiereigenschaften des Eigelbs untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Öl-in-Wasser-Emulsionssysteme

2.1.1 Eigenschaften

Emulsionen stellen flüssige Dispersionen dar, in denen die Tröpfchen der inneren, dispersen Phase in der äußeren, kontinuierlichen Phase (Dispersionsmittel) verteilt sind. Dabei ist die disperse Phase im Dispersionsmittel nicht oder nur begrenzt löslich (Tscheuschner, 1996; Ternes, 2008). Zwischen der kontinuierlichen und der dispersen Phase bestehen Phasengrenzflächen. Emulsionen haben im Bereich der Lebensmittel eine herausragende Stellung, da in sehr vielen Lebensmitteln wie Mayonnaise, Salatdressings oder Sauce Hollandaise eine wässrige Phase und eine ölige Phase nebeneinander vorliegen. Bildet dabei Wasser die äußere Phase und Öl die innere, so liegt eine Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion, z.B. Salatdressing bzw. Sauce Hollandaise) vor. Im umgekehrten Fall handelt es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion, z.B. Butter) (Belitz *et al*., 2005). Werden O/W- bzw. W/O-Emulsionen erneut emulgiert, entstehen Doppelemulsionen der Typen O/WO bzw. W/OW, die auch als multiple Emulsionssysteme bezeichnet werden (Tscheuschner, 1996). Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich O/W-Emulsionen behandelt werden, wird im Folgenden auf diesen Emulsionstyp verstärkt eingegangen.

Volumenanteil

Ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Emulsionseigenschaften ist der Volumenanteil Φ der dispersen Phase, der dem Ölanteil in einer O/W-Emulsion entspricht. Der Volumenanteil Φ bestimmt u.a. die Konsistenz der Emulsion (Tesch, 2002). Besitzen alle Tropfen denselben Durchmesser, so liegt eine monodisperse Verteilung vor. Sind in der Emulsion dagegen unterschiedliche Tropfengrößen zu finden, wird sie als ein polydisperses System bezeichnet. Dabei ist eine größere Packungsdichte als 74 % möglich, ohne dass eine Verformung der Tropfen eintritt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die kleineren Öltropfen in die Zwischenräume der größeren einlagern können (Bade, 2005).

Öltropfengröße

Die Qualität einer Emulsion wird unter anderem über die Öltropfengröße und deren Verteilung definiert. So wird das optische Erscheinungsbild einer Emulsion, wie die Farbe und Glanz, auch durch die Öltropfengröße bestimmt (Friberg, 1997). Emulsionen mit einer Tropfengröße von 0,1 µm und größer erscheinen milchig weiß und zählen zu den Makroemulsionen (Bade, 2005). Transparente Emulsionssysteme, deren Tropfengröße im Bereich von 0,01 bis 0,1 µm liegt, werden als Nanoemulsionen bezeichnet (Kunz, 1993). Lebensmittelemulsionen stellen meistens polydisperse Systeme dar, wobei es mehrere Wege gibt, die Tropfengröße zu beschreiben. Üblicherweise werden dazu die Parameter $x_{10,3}$, $x_{50,3}$, $x_{90,3}$ herangezogen, die wie folgt definiert sind:

$x_{10,3}$: 10 % des Volumens der dispersen Phase wird von Tropfen mit $x \leq x_{10,3}$ eingenommen
$x_{50,3}$: 50 % des Volumens der dispersen Phase wird von Tropfen mit $x \leq x_{50,3}$ eingenommen
$x_{90,3}$: 90 % des Volumens der dispersen Phase wird von Tropfen mit $x \leq x_{90,3}$ eingenommen

Allerdings sind $x_{10,3}$-, $x_{50,3}$-, $x_{90,3}$-Werte nur dann für die Beschreibung der Tropfengrößen einer Emulsion repräsentativ, wenn die Tropfen einer monomodalen Verteilungsfunktion (Normalverteilung) unterliegen. Liegt dagegen eine bi- oder polymodale Verteilungsart der Tropfen in einer Emulsion vor, so ist es zweckmäßig, den Sauterdurchmesser x_{32}, der das gewichtete Mittel der Oberflächendichteverteilung angibt (2.1), heranzuziehen.

$$x_{32} = \frac{\sum N_j \cdot x_j^3}{\sum N_j \cdot x_j^2} \tag{2.1}$$

N_j: Tropfenzahl; x_j: Tropfendurchmesser

Zusätzlich kann bei bekannten Dichten der kontinuierlichen und der dispersen Phasen die spezifische Grenzfläche ($A_{0,sp}$) der dispersen Phase ermittelt werden (2.2).

$$A_{0,sp} = \frac{\sum A_{0,Ges}}{\rho \cdot \sum V_P} \tag{2.2}$$

$A_{0,Ges}$: gesamte Emulsionsgrenzfläche; ρ: Dichte der dispersen Phase; V_p: Volumen der dispersen Phase

Der Sauterdurchmesser und die spezifische Grenzfläche geben den Dispersitätszustand der Emulsion unabhängig von der Verteilungsart der Tropfen an.

Grenzflächenspannung

Der Bereich am Übergang zweier Phasen wird als Grenzfläche bezeichnet. An der Phasengrenze ändern sich die thermodynamischen Eigenschaften des Systems sprunghaft (Pohl, 2005). Aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen entsteht an der Phasengrenze eine resultierende Kraft, die in das Innere der Flüssigkeit gerichtet ist. Diese bewirkt eine Grenzflächenspannung (Bade, 2005). Bei einer Vergrößerung der Phasengrenzfläche tritt ein Zustand ein, in dem sich mehr Moleküle der dispersen Phase in einem energetisch ungünstigen Zustand befinden. Aus diesem Grund ist das System bestrebt, die Ausdehnung der Grenzfläche zu minimieren (Pohl, 2005). Das bedeutet, dass zur Vergrößerung der Phasengrenzfläche in einem Mehrphasensystem Arbeit geleistet werden muss. Derartige Zustandsänderungen können thermodynamisch in Form der freien Energie *F* beschrieben werden. Wie man Gleichung (2.3) entnehmen kann, ändert sich die freie Energie um *dF* beim Vergrößern der Phasengrenzfläche um *dA* (Bade, 2005)

$$dF = -S \cdot dT - p \cdot dV + \sum_i \mu_i \cdot dn_i + \left(\frac{\partial F}{\partial A}\right)_{T,V,n_i} \cdot dA \qquad (2.3)$$

S: Entropie; *T*: Temperatur; *p*: Druck; V: Volumen; μ_i: chemisches Potential der Systemkomponente i; n_i: Stoffmenge der Systemkomponente i

Die partielle Ableitung der freien Energie des Systems nach der Größe der Phasengrenzfläche ergibt die thermodynamisch exakte Definition der Grenzflächenspannung γ (2.4) (Bade, 2005).

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A}\right)_{T,V,n_i} \qquad (2.4)$$

Viskosität

Die Viskosität η einer Emulsion hängt im Wesentlichen neben Volumenanteil und Tropfengröße von der Viskosität der kontinuierlichen Phase ab. Damit ist es möglich, durch die Auswahl der in der kontinuierlichen Phase gelösten Stoffe, wie Emulgatoren oder Stabilisatoren, sowie durch die Einstellung der Tropfengrößenverteilung die Viskosität der Emulsion zu beeinflussen (Gerhards, 2005). Außerdem kann die kontinuierliche Phase durch Wechselwirkungen mit den Substanzen des Grenzflächenfilms an der Tropfenoberfläche immobilisiert werden. Dies kann zur Viskositätszunahme der Emulsion führen.

2.1.2 Destabilisierungsmechanismen

Makroemulsionen sind ihrer Natur nach thermodynamisch instabil und tendieren dazu, die Grenzfläche zwischen den lipophilen (Öl) und hydrophilen (Wasser) Phasen durch Zusammenfließen von Tropfen, das als Koaleszenz bezeichnet wird, zu verringern. Dabei kann es zu einer Phasentrennung kommen, d.h. die Emulsion bricht. Im Bild 2.1 sind unterschiedliche Mechanismen, die eine Destabilisierung von Emulsionen hervorrufen können, dargestellt.

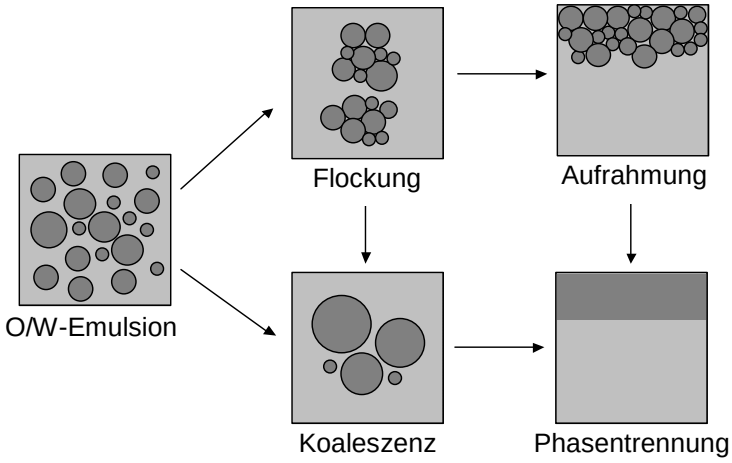


Bild 2.1: Destabilisierungsmechanismen von O/W-Emulsionen (modifiziert nach Danner, 2005).

Aufrahmung

Der Grund für die Aufrahmung ist der Dichteunterschied zwischen kontinuierlicher und disperser Phase. Im Falle einer O/W-Emulsion steigt die leichtere disperse Phase (Öl) nach oben. Dabei bleibt die ursprüngliche Verteilung der Öltropfengrößen in der Regel erhalten, was bedeutet, dass der Vorgang der Aufrahmung durch Zuführen von Energie, z.B. in Form von Schütteln oder Rühren, rückgängig gemacht werden kann. In diesem Fall spricht man von einer reversiblen Phasentrennung. Die Aufrahmung lässt sich mit Hilfe der Stokes'schen Sedimentationsgleichung beschreiben (2.5).

$$v = \frac{r^2(\rho_d - \rho_k)g}{18\eta_k} \qquad (2.5)$$

v: Aufrahmgeschwindigkeit; *r:* Tropfenradius; ρ_d: Dichte der dispersen Phase; ρ_k: Dichte der kontinuierlichen Phase; *g*: Erdbeschleunigung; η_k: Viskosität der kontinuierlichen Phase

Entsprechend dem Stokes'schen Gesetz wird die Aufrahmung beschleunigt wenn:

- die Größe der Öltropfen zunimmt (Flockung oder Koaleszenz),
- die Viskosität der kontinuierlichen Phase abnimmt,
- die Schwerkraft zunimmt (z.B. durch Zentrifugation).

Obwohl das Stokes'sche Gesetz nur für einzeln vorliegende Tropfen gilt und daher nur bedingt auf reale Emulsionssysteme übertragbar ist, ermöglicht es z.B. den Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Destabilisierungsmechanismen der Emulsion und der Aufrahmung herzustellen. So wird die Aufrahmung in den Emulsionen beschleunigt, wenn z.B. mehrere Öltropfen in aggregierter Form vorliegen und sich dabei wie ein einzelner Öltropfen mit entsprechend großem Durchmesser verhalten. Dieser Destabilisierungsmechanismus wird auch als Flockung der Öltropfen bezeichnet (Friberg, 1997; Timmermann, 2005).

Flockung

Flockung beschreibt die Aggregation von mehreren Öltropfen, ohne dass dabei die Stabilität des Grenzflächenfilms beeinträchtigt wird. In O/W-Emulsionen beruht die Flockung auf einer Überlagerung der Anziehungs- und Abstoßungskräfte der Oberflächen benachbarter Öltropfen, wobei die Anziehungskräfte überwiegen (siehe auch Kapitel 2.1.4). In einer Emulsion unterliegen die Öltropfen der Brown'schen Bewegung, der Schwerkraft sowie den Kräften, die durch den mechanischen Energieeintrag während der Emulsionsherstellung entstehen. Diese Bewegung führt zur Kollision zwischen den Öltropfen. Dabei treten zwischen den kollidierenden Öltropfen unterschiedliche Wechselwirkungen auf. Sind die Anziehungskräfte dabei groß genug, um die Bewegungsvorgänge zu überwinden, bleiben die Öltropfen in aggregierter Form. Auch energetische Wechselwirkungen zwischen den an der Öltopfenoberfläche adsorbierten Substanzen können die Flockung der Tropfen verursachen. Zwar führt die Flockung zu keiner Zunahme der tatsächlichen Größe der dispergierten Tropfen, doch tritt durch das Aneinanderhaften mehrerer Tropfen eine Änderung der Öltropfengrößenverteilung auf. Die Flockung ist ebenso wie die Aufrahmung ein reversibler Destabilisierungsmechanismus und kann durch mechanischen Energieeintrag rückgängig gemacht werden.

In einer stabilen Emulsion wird die Flockung der Öltropfen entweder durch elektrostatische Abstoßung (durch geladene Grenzflächen) oder durch sterische Hinderung des

Grenzflächenfilms bzw. durch Kombination beider Effekte verhindert (siehe auch Kapitel 2.1.4) (Dickinson und Stansby, 1988).

Koaleszenz

Unter Koaleszenz versteht man das Zusammenfließen von dispersen Öltropfen zu größeren Tropfen, wobei die Phasengrenzfläche reduziert wird. Voraussetzung für die Tropfenkoaleszenz ist das gegenseitige Annähern und Flocken zweier Tropfen (Danner, 2005). Sind dabei die Grenzflächen nicht ausreichend stabilisiert, reißen sie und die Tropfen fließen zusammen. Die Koaleszenz kann dabei bei einer kurzzeitigen Kollision zweier Tropfen oder nach einer längeren Kontaktzeit erfolgen. Bei der Koaleszenz läuft eine reale Änderung der Tropfengrößenverteilung ab, wobei dieser Prozess irreversibel ist und zur Phasentrennung und somit zum Bruch der Emulsion führen kann.

Die Destabilisierungsmechanismen treten in einer Emulsion meistens als Kombination auf. In vielen Fällen initiiert oder verstärkt sogar ein Effekt den anderen. So beschleunigt die Flockung bzw. die Koaleszenz die Aufrahmung, wobei auf der anderen Seite die Annäherung der Öltropfen durch Aufrahmung die Flockung und die Koaleszenz beschleunigen kann (Anbarci, 1987).

2.1.3 Grenzflächenaktive Substanzen im Lebensmittelbereich

2.1.3.1 Emulgatoren

Damit die Struktur der Emulsion erhalten bleibt und die dispergierten Öltröpfchen nicht koaleszieren, müssen die Emulsionsgrenzflächen durch grenzflächenaktive Substanzen stabilisiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen höhermolekularen und niedermolekularen grenzflächenaktiven Substanzen. Emulgatoren, die zu der Gruppe der niedermolekularen grenzflächenaktiven Verbindungen zählen, sind amphiphile Moleküle, die an den Grenzflächen zwischen hydrophiler und lipophiler Phase adsorbieren und einen Grenzflächenfilm aufbauen (Schuchmann und Schuchmann, 2005). In einer O/W-Emulsion liegen die Emulgatoren so an der Grenzfläche vor, dass der hydrophile Teil zur wässrigen Phase und der hydrophobe zur Ölphase gerichtet ist (Bild 2.2). Dadurch wird eine mechanische bzw. elektrostatische Barriere an der Phasengrenzfläche aufgebaut, die die gegenseitige Annäherung der Tropfen verhindern soll (Schubert, 2005a).

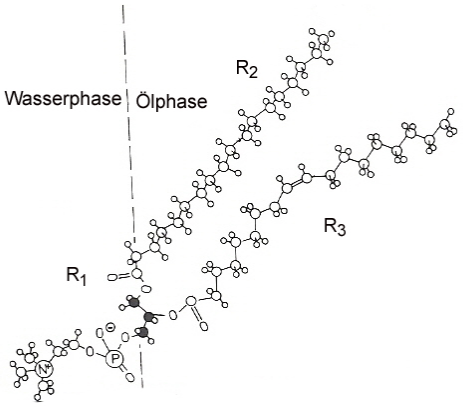


Bild 2.2: Schematische Darstellung der räumlichen Orientierung von Phosphatidylcholin an dem Grenzflächenbereich Öl/Wasser. R_1: Glycerophosphatidylcholin-Rest; R_2: Stearin-, R_3: Ölsäure-Rest (modifiziert nach Ternes, 2008).

Die Klassifizierung von Emulgatoren kann nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen. Timmermann (2005) schlägt folgende Systematisierung vor:

- Ladung der hydrophilen Gruppen
- Verhältnis hydrophiler zu lipophiler Gruppen (HLB-Wert)
- lipophile Gruppen
- Löslichkeit in verschiedenen Stoffen
- Kristallformen
- Anordnung der Emulgatormoleküle bei der Wechselwirkung mit Wasser

Da für die vorliegende Arbeit insbesondere die Ladung der hydrophilen Gruppen und der HLB-Wert von Interesse sind, soll auf diese im Folgenden näher eingegangen werden.

Ladung der hydrophilen Gruppen des Emulgators

Emulgatoren können ionischen und nichtionischen Charakter aufweisen. Bei der ionischen Emulgatorklasse unterscheidet man weiterhin zwischen anionischen, kationischen und amphoterischen Emulgatoren. Anionische Emulgatoren sind grenzflächenaktive Substanzen, die in Lösungen eine negative Ladung besitzen. Ein typisches Beispiel eines anionischen Emulgators ist Natriumdodecylsulfat (SDS). Im Lebensmittelbereich spielen veresterte Monoglyceride mit Zitronensäure oder Diacetylweinsäure wie auch Natriumstearoyllactylat eine größere Rolle (Timmermann, 2005). Amphotere Emulgatoren besitzen als Zwitterionen sowohl anionaktive als auch kationaktive Gruppen und können daher je nach pH-Wert als anionisches oder kationisches Tensid vorliegen (Stang, 1998). Phospholipide sind die in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie am häufigsten eingesetzten natürlichen Emulgatoren mit amphoteren Eigenschaften. Es existieren auch ionische Phospholipide, wie z.B. Phosphatidsäure (PA) oder Phosphatidylinositol (PI).

Kationische Emulgatoren, die in wässrigen Lösungen positive Ladung besitzen, sind für den Lebensmittelbereich dagegen nicht zugelassen (Friberg *et al*., 2004). Unter dem Begriff der nichtionischen Emulgatoren lassen sich grenzflächenaktive Substanzen, die in wässrigen Lösungen keine Ionen bilden, zusammenfassen (Timmermann, 2005). So gehören beispielsweise Polysorbate zu dieser Emulgatorgruppe.

HLB-Wert

Zur Klassifizierung von Emulgatoren wird weiterhin der HLB-Wert (*hydrophilic-lipophilic balance*) hinzugezogen (Friberg, 1997). Der HLB-Wert beschreibt das molekulare Massenverhältnis zwischen den hydrophilen und den lipophilen Gruppen eines Tensids. Auf der Basis experimenteller Gruppenzahlen kann der HLB-Wert mit der Formel (2.6) berechnet werden (Belitz *et al*., 2005).

$$HLB = \sum (\text{Hydrophile Gruppenzahl}) - \sum (\text{Hydrophobe Gruppenzahl}) + 7 \qquad (2.6)$$

Aus dem HLB-Wert ergeben sich Hinweise, ob ein Tensid mehr öl- oder mehr wasserlöslich ist und sich damit als Emulgator zur Stabilisierung von W/O bzw. O/W–Emulsionen eignet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: HLB-Wert und technische Anwendung von Emulgatoren (Friberg, 1997; Belitz *et al*., 2005)

HLB-Bereich	Anwendungsbereich
1–3	Antischaummittel
3–6	W/O-Emulgator
7–9	Feuchtemittel
8–18	O/W-Emulgator
15–18	Waschmittel, Stabilisator

Aufgrund der relativ niedrigen Molekülmasse bilden Emulgatoren ziemlich dicht gepackte Grenzflächenfilme und können, sofern sie in ausreichender Menge in der Lösung vorliegen, bis zu 98 % der Grenzfläche belegen (Dickinson, 1992). Auf der anderen Seite bilden Emulgatoren relativ dünne Filme an der Grenzfläche aus. Ist die Phasengrenzfläche durch Emulgatoren vollständig belegt, so spricht man vom Erreichen des Sättigungspunktes. An dieser Stelle weist die Grenzflächenspannung ihr Minimum auf. Bei einer weiteren Erhöhung der Emulgatorkonzentration erfolgt eine Aggregation der nicht adsorbierten Emulgatormoleküle zu Mizellen. Diese Konzentration wird als kritische mizellare Konzentration CMC (*critical micellar concentration*) bezeichnet (Belitz *et al*., 2005; Bade, 2005).

2.1.3.2 Emulgiereigenschaften von Proteinen

Proteine gehören zu den höhermolekularen grenzflächenaktiven Substanzen. Die Grenzflächenaktivität der Proteine beruht auf deren Aufbau, der durch das Vorhandensein von hydrophilen und hydrophoben Bereichen gekennzeichnet ist. Dadurch können Proteine mit mehreren Molekülteilen an der Phasengrenzfläche adsorbiert werden und so die Grenzflächenspannung herabsetzen. Die wichtigsten Voraussetzungen für die Grenzflächenaktivität der Proteine sind:

- Hydrophobizität
- Löslichkeit
- Flexibilität der räumlichen Struktur des Moleküls (Ternes und Acker, 1994)

Diese Eigenschaften werden durch die physiologischen Merkmale wie Molekülgröße, Aminosäurensequenz, Konformation und Ladung beeinflusst. Hierbei ist die *Hydrophobizität* vom Anteil der hydrophoben Gruppen sowie von der sekundären und der tertiären Struktur des Proteins abhängig (Nakai *et al.*, 1986). Dabei spielt hier nicht die *Gesamt*-, sondern die *effektive Hydrophobizität* die Hauptrolle für die Funktion als Emulgator (Ternes und Acker, 1994); denn bei den meisten Proteinen befinden sich die hydrophoben Gruppen vorwiegend im Inneren des Moleküls und nur wenige an der Oberfläche, die somit direkt zugänglich sind. Da im Verlauf der Denaturierung, also im Zuge des Entfaltens der Peptidkette, zusätzlich hydrophobe Gruppen an die Oberfläche treten, verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der hydrophoben Gruppen und die Grenzflächenaktivität nimmt zu (Ternes und Acker, 1994; Guilmineau und Kulozik, 2006a, 2006b; 2007).

Die *Löslichkeit* der Proteine wird neben der Molekülmasse durch Ladungshäufigkeit und Hydrophobizität kontrolliert. Je höher die Ladung der Proteinseitenketten und je niedriger die Hydrophobizität, desto höher ist die Löslichkeit (Ternes und Acker, 1994). Da Proteine sowohl positive als auch negative Ladung besitzen, sind sie Zwitterionen. Allerdings hängt ihre Ladung von den Milieubedingungen ab, in denen sich die Proteine befinden, wie die Ionenstärke oder der pH-Wert. So weisen Proteine unterhalb des isoelektrischen Punktes (IP) kationische und oberhalb anionische Eigenschaften auf. Im Bereich des IP liegen sie als Zwitterionen vor und sind weniger grenzflächenaktiv (Nylander, 2004).

Unter *Flexibilität* versteht man die Fähigkeit des Moleküls, sich der Tröpfchenoberfläche anzupassen und so einen möglichst großen Bereich der Oberfläche zu bedecken. Dabei werden die hydrophoben Seitenketten beim Adsorptionsvorgang freigelegt und damit mehr Kontaktfläche zur Ölphase pro Molekül erzeugt. Die Belegung der Grenzfläche durch flexible Proteine kann durch das „*trains-loops-tails*"-Modell beschrieben werden, das allgemein für alle grenzflächenaktive Polymere gilt (Bild 2.3) (Myers, 1991; Friberg, 1997).

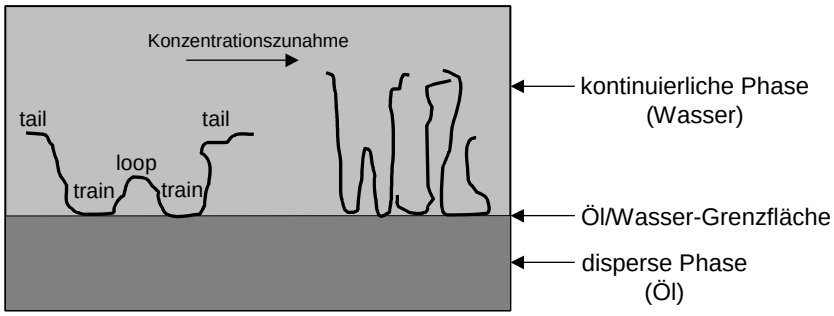


Bild 2.3: Schematische Darstellung der Adsorption flexibler Proteine an der Öl/Wasser-Grenzfläche (Friberg, 1988; Myers, 1991).

Dabei richten sich die hydrophoben Molekülteile an der Grenzfläche in Form von *„trains*" aus. Hydrophile Segmente orientieren sich dagegen zur wässrigen Phase und bilden einerseits innerhalb des Proteinmoleküls Schleifen („*loops*") und an den Enden („*tails*"), die in die wässrige Phase ragen. Gleichzeitig mit dem Auffalten des Proteins wird dessen Tertiärstruktur verändert (Dickinson und Stainsby, 1988). Dieser Effekt wird als Grenzflächendenaturierung bezeichnet, die durch die Umgebungsbedingungen, wie pH-Wert, Ionenkonzentration und Temperatur, beeinflusst wird (Walstra und de Roos, 1993). Die Belegung der Grenzfläche mit Proteinen wird wesentlich von deren Konzentration in der Emulsion beeinflusst. Bleibt die Konzentration niedrig, so bilden Proteine einen relativ flachen Grenzflächenfilm aus, in dem sie die Grenzfläche in mehr oder weniger gestreckter Form belegen. Bei einer Konzentrationserhöhung nimmt die Dichte und die Dicke des Grenzflächenfilms zu (Bild 2.3, rechts, Myers, 1991). Im Gegensatz zu den niedermolekularen Emulgatoren belegt nur ein Teil des Proteinmoleküls die Grenzfläche. Dabei zeigen Proteine aber eine höhere Adsorptionseffizienz. Das bedeutet, dass weniger Protein- als Emulgatormoleküle notwendig sind, um dieselbe Grenzfläche zu belegen (Stang, 1998). Generell weisen die mit Proteinen stabilisierten Emulsionsgrenzflächen eine höhere Viskoelastizität und damit eine höhere Stabilität gegenüber einer mechanischen Beanspruchung auf (Nylander, 2004). Da Proteine Makromoleküle sind, können

sie zusätzlich die Viskosität der kontinuierlichen Phase erhöhen und somit auch als Stabilisator wirken (Friberg, 2005).

2.1.4 Stabilisierungsmechanismen einer O/W-Emulsion

Wie bereits im Kapitel 2.1.2 beschrieben, können Emulsionen auf unterschiedliche Art destabilisiert werden. Grenzflächenaktive Substanzen, wie Emulgatoren oder Proteine, sind in der Lage, die Destabilisierungsvorgänge zu reduzieren oder gar zu verhindern und damit eine Langzeitstabilität der Emulsion zu gewährleisten. Die Stabilität der Emulsionen bezüglich Flockung, Aufrahmung und Koaleszenz wird durch unterschiedliche Mechanismen erreicht. Sie ist abhängig von den Substanzen sowohl an der Emulsionsgrenzfläche als auch in der kontinuierlichen Phase. Die Summe aller Wechselwirkungskräfte zwischen den Tropfen entscheidet, ob die Tropfen in unmittelbarer Nachbarschaft aggregieren, koaleszieren oder aber sich abstoßen (Schubert, 2005b).

Zum einen tritt zwischen den an der Grenzfläche adsorbierten Molekülen der Effekt der **sterischen Hinderung** auf. So können die in die wässrige Phase ragenden Seitenketten ein gegenseitiges Durchdringen der die Tropfen umgebenden Filmschichten inhibieren (Timmermann, 2005). Ein Beispiel dafür sind Proteine, die mehrere hydrophobe Bereiche aufweisen und deswegen an der Grenzfläche mehrfach adsorbieren können (Bild 2.3). Die in die wässrige Phase ragenden Molekülteile bilden eine räumliche Barriere und können so eine Annäherung von zwei Öltropfen und die daraus resultierende Destabilisierung der Grenzfläche verhindern (Timmermann, 2005). Dies geschieht zum einen durch die Erhöhung des osmotischen Drucks durch die lokale Konzentrationszunahme der überlappenden Proteinsegmente (Dickinson und McClements, 1995). Somit spielt das Verhältnis zwischen den „*trains*“- und „*loops*“- des adsorbierten Proteins eine entscheidende Rolle bezüglich der Koaleszenzstabilität der Emulsion (Cardenas-Valera, 1995). Gleichzeitig nimmt durch die Kompression der adsorbierten Moleküle die Entropie ab (Tscheuschner, 1996). Die sterische Hinderung wirkt proportional zur Konzentration der adsorbierten Polymere, ist aber vom pH-Wert und von der Ionenstärke des Systems relativ unabhängig (Dickinson und McClements, 1995). Werden zur Stabilisierung der Emulsionen ionische Emulgatoren oder Polymere verwendet, so findet durch die gleichsinnige Aufladung der Grenzflächen eine **elektrostatische Abstoßung** der Tropfen statt. Dabei verhindern die Abstoßungspotentiale, dass sich die Tropfen nähern und die Grenzflächen in Wechselwirkungen miteinander treten. Zur Beschreibung des elektrostatischen bzw. elektrokinetischen Potentials wird das ζ-Potential (Zetapotential)

hinzugezogen. Friberg (1997) gibt an, dass die Stabilität einer O/W-Emulsion erst ab einem ζ-Potential von etwa 20 bis 25 mV gewährleistet ist. Emulgatoren und Proteine können sowohl sterische Hinderung als auch elektrostatische Abstoßungskräfte bewirken, die die Tropfen in der Emulsion auch für längere Zeit gegen Flockung oder Koaleszenz stabilisieren können (Stang, 1998). Daneben existieren **van-der-Waals-Wechselwirkungen**, die zu einer Anziehung der Tropfen führen. Da die Ursache für diese Anziehung die fluktuierenden Dipole während der Bewegung der Elektronen um den Atomkern ist, sind die van-der-Waals-Kräfte immer vorhanden (Tscheuschner, 2005). Mit Hilfe der von Derjagun und Landau sowie Vervey und Overbeek entwickelten **DLVO-Theorie** kann der Zusammenhang zwischen der elektrostatischen Abstoßung der Tropfen, die zur Stabilität der Emulsion beiträgt, und den destabilisierenden van-der-Waals-Wechselwirkungen beschrieben werden. Dabei findet eine Überlagerung der Abstoßungs- *(V_R)* und Anziehungsenergie *(V_A)* zur gesamten Wechselwirkungsenergie (V_r) statt. Der Teilchenabstand ist dabei der entscheidende Faktor. Da die van-der-Waals-Wechselwirkungen erst bei kurzen Abständen wirksam werden, muss zunächst die durch elektrostatische Abstoßung hervorgerufene Energiebarriere überwunden werden. Erst wenn diese Energiebarriere überwunden ist, kann es zur irreversiblen Koaleszenz der Tropfen kommen (Tscheuschner, 2005; Schubert, 2005a). Ein weiterer Mechanismus zur Stabilisierung von Emulsionen besteht in der Herabsetzung der Beweglichkeit der Tropfen. Dies kann durch die Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase erreicht werden. So kann die Viskosität der kontinuierlichen Phase von O/W-Emulsionen durch Zugabe von Polysacchariden, die dabei als Stabilisatoren wirken, deutlich erhöht werden (Gerhards, 2005). Auch Proteine können, wie bereits erwähnt (Kapitel 2.1.3.2), zur Viskositätserhöhung von O/W-Emulsionen eingesetzt werden.

2.1.5 Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Emulgatoren an der Grenzfläche

Zur Stabilisierung von Lebensmittelemulsionen werden meistens nicht einzelne Emulgatoren, sondern mehrere grenzflächenaktive Substanzen gleichzeitig eingesetzt. Dabei ist man in der Regel bestrebt, die Eigenschaften der Emulgatorsysteme so zu kombinieren, dass sich die Stabilisierungseffekte verstärken. Am häufigsten werden Emulgatoren und Proteine miteinander kombiniert. Aber auch natürliche Rohstoffe, die zur Herstellung von Emulsionen eingesetzt werden, beinhalten häufig mehrere grenzflächenaktive Substanzen. So stellt Eigelb eine Mischung aus grenzflächenaktiven Proteinen und Phospholipiden dar. Im Folgenden wird erläutert, worauf die Wechselwirkungen

zwischen Proteinen und Emulgatoren beruhen und wie die Grenzflächeneigenschaften dieser Substanzen bei gleichzeitiger Anwesenheit in einem Emulsionssystem beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zwischen ionischen, wie z.B. SDS bzw. zwitterionischen (Phosphatidylcholin) und nichtionischen (Mono-, Diacylglyceride) Emulgatoren zu unterscheiden.

2.1.5.1 Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ionischen Emulgatoren

Während ionische Emulgatoren starke Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen können, ist die Affinität der nicht-ionischen Emulgatoren zu Proteinen relativ niedrig (Nylander und Ericsson, 1997). Da, wie bereits beschrieben, kationische Emulgatoren in der Lebensmittelindustrie keine Rolle spielen, wird in diesem Abschnitt ausschließlich auf anionische und zwitterionische Emulgatoren eingegangen. Bei niedrigen Emulgatorkonzentrationen, meistens unter der kritischen Mizellenkonzentration (CMC), treten zwischen ionischen Emulgatoren und Proteinen spezifische, relativ starke elektrostatische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen auf (Dickinson, 1992; Goddard und Ananthapadmanabhan, 1993). Im Bereich nahe oder über der CMC werden die Wechselwirkungen dagegen als weniger spezifisch beschrieben und führen zumeist zur Destabilisierung der nativen Proteinkonformation (Nylander, 2004). Das Ausmaß der Wechselwirkungen und die darauf zurückzuführende Konformationsänderung der Proteine hängt hauptsächlich von der Natur der hydrophilen Gruppe des Emulgators, der Ionenstärke, dem pH-Wert und vor allem vom Aufbau des Proteins selbst ab (Friberg, 2004).

Generell führen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anionischen Emulgatoren wie SDS zur Erhöhung des Anteils an α-Helix-Strukturen von Proteinen (Nylander und Ericsson, 1997; Montserret, 2000). Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und SDS treten hauptsächlich durch Ausrichtung hydrophober Seitenketten zum unpolaren Bereich des Emulgators auf. Dabei findet eine Auffaltung des Proteinmoleküls statt, die durch elektrostatische Abstoßung der Seitenketten hervorgerufen wird, wobei noch mehr hydrophobe Seitenketten freigelegt werden, an die weitere SDS-Moleküle gebunden werden können. Dadurch wird die α-helikale Faltung des Proteins stabilisiert (Nylander und Ericsson, 1997). Aber auch zwitterionische Emulgatoren sind in der Lage, die Proteinkonformation zu beeinflussen. Dabei wird ebenfalls der Anteil an α-Helix-Strukturen erhöht, wie am Beispiel von Ovalbumin und Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) gezeigt werden konnte (Mine *et al*., 1993). Die Erhöhung der Ionenstärke in einer wässrigen Lösung

verstärkt die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ionischen Emulgatoren durch Herabsetzung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den geladenen Bereichen der Emulgatoren und Aminosäureresten mit gleichnamiger Ladung (Nylander, 2004).
Den Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden und Proteinen kommt im Lebensmittelbereich eine besondere Bedeutung zu. So untersuchte Brown (1984) sehr detailliert das Bindungsverhalten von Phosphatidylcholin und β-Lactoglobulin. Es wurde angenommen, dass die Alkylgruppe des Phospholipidmoleküls mit der hydrophoben Innenseite des α-Helix-Bereichs im Proteinmolekül in Wechselwirkungen tritt, während die polare Kopfgruppe mit den hydrophilen Außenbereichen des Proteins wechselwirkt. Der auf diese Weise gebildete Phospholipid-Protein-Komplex verfügt, verglichen mit den Einzelkomponenten, über verbesserte Emulgiereigenschaften. Über eine andere Eigenschaft von Phospholipid-Protein-Komplexen berichteten Kurihara und Katsuragi (1993). Sie konnten zeigen, dass durch die Komplexbildung zwischen β-Lactoglobulin und Phosphatidsäure (PA) die bittere Geschmacksnote in Lebensmitteln maskiert werden kann. Darüber hinaus konnte dadurch auch die Hitzestabilität des Proteins deutlich erhöht werden. Da andere Phospholipide wie PC oder PE dazu nicht in der Lage sind, werden dafür die spezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Kopfgruppe von PA und β-Lactoglobulin verantwortlich gemacht. Anionische Emulgatoren wie PA können deutlich stärkere Wechselwirkungen mit Proteinen ausbauen, verglichen mit kationischen oder ungeladenen Emulgatoren (Nylander, 2004). Auch Malmsten (1995) betonte die entscheidende Rolle der elektrostatischen Wechselwirkungen für die Stabilität der Protein-Phospholipid-Komplexe.

2.1.5.2 Verhalten an der Grenzfläche

Das jeweilige Adsorptionsverhalten von Proteinen und Emulgatoren an der Emulsionsgrenzfläche wurde im Kapitel 2.1.3 ausführlich diskutiert. Werden beide Substanzen allerdings gemeinsam eingesetzt, so führen die bereits beschriebenen Wechselwirkungen untereinander zur Veränderung des Adsorptionsverhaltens. Dabei spielt es auch eine Rolle, ob beide grenzflächenaktiven Substanzen nacheinander oder gleichzeitig in die Emulsionen gegeben werden (Friberg, 2004). So kann das zugesetzte Protein einerseits zur Viskositätserhöhung der kontinuierlichen Phase führen, andererseits können Proteine mit bereits an der Grenzfläche vorhandenen Emulgatoren in Wechselwirkungen treten und an der Tropfenoberfläche stabile Filme ausbilden. Nylander und Ericsson

(2004) fassten die möglichen Effekte, die durch Wechselwirkungen von Proteinen und Emulgatoren an der Emulsionsgrenzfläche auftreten, wie folgt zusammen:

- konkurrierende Adsorption (*competitive adsorption*)
- Verdrängung von der Grenzfläche (*displacement*)
- Erhöhung der Grenzflächenaktivität durch Protein-Emulgator-Komplex
- Reduzierung der Grenzflächenaktivität durch Protein-Emulgator-Komplex

Es existiert eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der Problematik der *konkurrierenden Adsorption* zwischen Proteinen und niedermolekularen Emulgatoren sowie mit deren gegenseitiger Verdrängung von der Grenzfläche auseinandersetzten (Dickinson *et al*., 1993; Fang und Dalgleish, 1996; Sünder *et al*., 2001; Scherze und Muschiolik, 2001). Zwei unterschiedliche Methoden sind dabei zur Untersuchung gebräuchlich. Zum einen wird die Veränderung der Grenzflächenspannung zwischen der Ölphase und der wässrigen Phase, in der Mischungen aus grenzflächenaktiven Proteinen und niedermolekularen Emulgatoren gelöst sind, gemessen. Dabei wird die Konzentration einer Substanz konstant gehalten und der Gehalt der zweiten grenzflächenaktiven Komponente kontinuierlich erhöht (Friberg *et al*., 2004). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Grenzfläche mit einer grenzflächenaktiven Substanz, meistens Proteine, zu belegen und anschließend eine weitere Komponente, in der Regel ein Emulgator, dem System zuzugeben. Durch die Verfolgung der Änderung der Grenzflächenspannung bzw. – belegung in Abhängigkeit von der Zeit wird dabei untersucht, ob eine Komponente durch die andere von der Grenzfläche verdrängt werden kann (Dickinson, 1997).

Der Effekt der konkurrierenden Adsorption zwischen ionischen Emulgatoren und Proteinen ist signifikant abhängig von der Konzentration des Emulgators im Emulsionssystem. Es gilt, dass grenzflächenaktive Substanzen mit der höheren Grenzflächenaktivität (Emulgatoren) die weniger grenzflächenaktiven Moleküle, wie Proteine, bei einer höheren Emulgatorkonzentration von der Grenzfläche verdrängen können (Nylander, 2004). Dabei adsorbieren Emulgatoren zunächst an den Grenzflächenabschnitten, die frei von Proteinen sind. Durch Akkumulation des Emulgators an dieser Stelle wird der Proteinfilm zusammengedrückt, so dass dessen Packungsdichte und die Dicke der Grenzfläche zunehmen und damit die Kontaktfläche zwischen den adsorbierten Proteinen und der Grenzfläche erheblich reduziert wird. Bei einer weiteren Erhöhung der Emulgatorkonzentration kommt es schließlich entweder zur partiellen oder auch zur vollständigen Desorption der Proteine von der Grenzfläche (Dickinson, 1999; Mackie *et al*., 1999, 2001).

Allerdings kann ein Teil der zugesetzten Emulgatoren mit den adsorbierten Proteinen in Wechselwirkungen treten, wodurch die Verdrängungsprozesse zeitlich verzögert werden. Die Konzentration, die tatsächlich zur Verdrängung der Proteine von der Grenzfläche führt, liegt bei ionischen Emulgatoren deutlich höher als bei nichtionischen, da die ionischen Emulgatoren eher als die nichtionischen Emulgatoren mit Proteinen wechselwirken (Courthaudon *et al.*, 1991; Dickinson und Iveson,1993). Die *Konkurrenz* bzw. *Verdrängung* von der Grenzfläche erfolgt meistens, wenn Emulgatoren und Proteine der gleichen Phase zugesetzt werden. Gibt man allerdings die beiden Substanzen zu unterschiedlichen Phasen zu, können diese miteinander sogar synergistisch wirken. Yamamoto und Araki (1997) zeigten, dass die Grenzflächenspannung einer mit β-Lactoglobulin und Lecithin stabilisierten O/W-Emulsion reduziert werden konnte, wenn Lecithin der Ölphase zugesetzt wurde. Auch die Stabilität dieser Emulsion konnte im Vergleich zur Stabilisierung durch die einzelnen Komponenten erheblich verbessert werden.

Insgesamt weisen die durch Proteine und Emulgatoren gebildeten Komplexe gegenüber den Einzelsubstanzen ein deutlich verbessertes Grenzflächenverhalten auf. Mine *et al.* (1992) konnten beispielsweise zeigen, dass das Adsorptionsverhalten von Ovalbumin durch Komplexbildung mit Lyso-Phospholipiden deutlich verbessert wird. Zum einen kann die Flexibilität von Proteinen durch Wechselwirkungen mit anionischen Emulgatoren erhöht werden, wodurch die Ausbreitung des Proteins an der Grenzfläche deutlich effektiver erfolgt (Nylander, 2004). Zum anderen führen elektrostatische Wechselwirkungen z.B. zwischen SDS und Ovalbumin oder Lysozym dazu, dass im Proteinmolekül mehr hydrophobe Gruppen exponieren, wodurch die Affinität der Proteine zur Öl/Wasser-Grenzfläche und damit auch dessen Grenzflächenaktivität deutlich erhöht wird (Green *et al.*, 2000; Nylander, 2004). Green *et al.* (2000) stellten ferner fest, dass das molekulare Verhältnis zwischen SDS und Lysozym an der Grenzfläche auch bei einem Überschuss des Emulgators konstant blieb. Das verdeutlichte, dass der adsorbierte Lysozym-SDS-Komplex eine exakt definierte stöchiometrische Zusammensetzung besitzt. Wurde allerdings die SDS-Konzentration noch weiter erhöht, so wurde der Komplex teilweise durch die SDS-Monolayer ersetzt. Der Ladung der Emulgatoren wird an dieser Stelle eine entscheidende Bedeutung beigemessen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit nichtionischen Emulgatoren sinkt die Affinität der Proteine zur Ölphase und dadurch auch die Grenzflächenaktivität (Miller *et al*., 2000).

2.2 Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften von Eigelb

2.2.1 Struktur und Zusammensetzung des Eigelbs

Der Anteil des Eigelbs am Vollei beträgt etwa 36 %. Das Eigelb besteht aus 49-53 % Wasser, 16 % Eiweiß und 32–36 % Lipiden (Yamamoto *et al*., 1996). Kohlenhydrate haben einen Anteil von 1 %, davon ist ein Fünftel an Protein gebunden. Der Gehalt an Mineralstoffen beträgt 1 % (Wakamatu *et al.*, 1982). Die Lipidfraktion enthält durchschnittlich 66 % Triacylglyceride, 28% Phospholipide und 5 % Cholesterin. Die Lipide sind zum größten Teil an Protein gebunden und liegen damit in Form von Lipoproteinen vor (Acker und Ternes, 1994). Diese können in Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL) unterteilt werden. Außerdem sind im Eigelb mit den löslichen Livetinen und Phosvitin noch weitere Proteine zu finden (Ternes, 1989). Die technologischen Eigenschaften des Eigelbs werden im Wesentlichen durch die Proteine bzw. Lipoproteine beeinflusst.

Neben der chemischen Zusammensetzung kann das Eigelb auch bezüglich seiner Strukturelemente beschrieben werden (Bild 2.4).

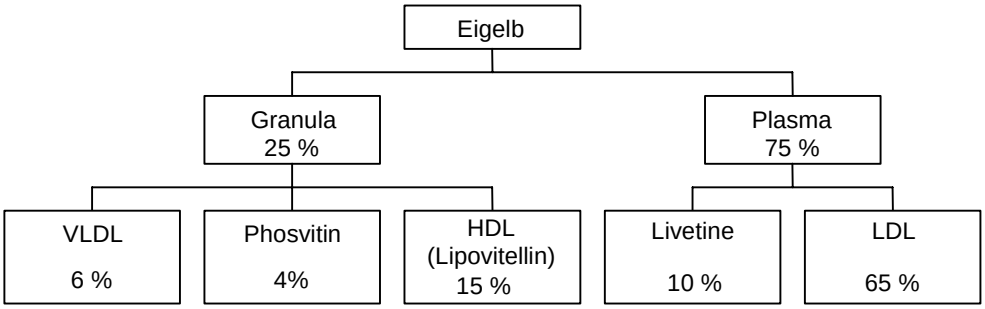


Bild 2.4: Zusammensetzung des Eigelbs (alle Angaben bezogen auf die Eigelbtrockenmasse). LDL: Low-Density-Lipoprotein; LDLG: Low-Density-Lipoprotein der Granulafraktion; HDL: High-Density-Lipoprotein (Acker und Ternes *et al.,* 1994).

So stellt das Eigelb ein komplexes System von Partikeln unterschiedlicher Größe und Form dar. Diese sind in einer Lösung wasserlöslicher Proteine (Livetine) suspendiert (Ternes *et al.*, 1989). Nach Verdünnen mit einer NaCl-Lösung kann das Eigelb durch Zentrifugation in zwei Fraktionen, in das unlösliche Sediment, das vorwiegend aus Granulapartikel besteht (Granula), und den löslichen Überstand (Plasma) getrennt werden (Mc Bee und Cotterill, 1979). Die Granulapartikel, die eine unregelmäßige, polyedrische Form besitzen, haben einen Durchmesser von 1,0–1,3 µm (Chang *et al.,* 1977). Ihr

Anteil, bezogen auf die Eigelbtrockenmasse, liegt bei 25 %. Sie bestehen zu 64 % aus Proteinen und 30 % Lipiden, davon sind 54 % Phospholipide und 3,8 % Cholesterin (Anton, und Gandemer, 1997; Acker und Ternes, 1994). Außerdem sind in den Granula 6 % Mineralstoffe nachweisbar, wobei 0,5 % auf zweiwertige Kationen, wie Ca^{2+}, entfallen (Anton *et al.,* 2000a). In den Granula sind im Wesentlichen HDL (70 %) und Phosvitin (16 %) enthalten. Sie sind durch Calciumbrücken zu einem stabilen Komplex miteinander verbunden, der bei physiologischer Ionenstärke (0,16 M NaCl) und pH-Wert (6,5–7) des Eigelbs unlöslich ist (Burley und Cook, 1961, Causeret *et al.,* 1991). Darüber hinaus konnten in den Granula 12 % VLDL (Very-Low-Density-Lipoprotein) nachgewiesen werden. Nach Erhöhung der Ionenstärke mit NaCl-Lösung (> 0,34 M) werden die divalenten CaIciumionen durch monovalente Natriumionen ersetzt, wodurch die Calciumbrücken aufgebrochen werden und das Phosvitin teilweise abgespalten wird. Dies führt zur Erhöhung der Löslichkeit der Granulaproteine. Bei einer Ionenstärke von über 1,7 M NaCl liegt die Granulastruktur vollständig aufgelöst vor (Cook und Martin, 1969; Anton, und Gandemer, 1997). Des Weiteren zeigten Chang *et al.* (1983), dass sich im Plasma noch kleinere Partikel von meist ringförmiger Struktur mit einem Durchmesser von ca. 20–60 nm befinden. Diese werden als LDL-Mizellen des Plasmas bezeichnet. Weiterhin sind im Plasma die wasserlöslichen Livetine zu finden.

2.2.2 Proteine des Eigelbs

Wie bereits beschrieben, liegen die meisten Proteine und Lipide des Eigelbs nicht frei vor, sondern sind in Form von Lipoproteinen miteinander verbunden. Als Lipoproteine werden Komplexe aus Proteinen, polaren Lipiden und Triacylglyceriden bezeichnet, die in erster Linie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen der unpolaren Peptidketten und den Alkylresten der Lipide stabilisiert werden. Darüber hinaus tragen Ionenbindungen zwischen geladenen Aminosäureseitenketten und geladenen Gruppen bei Phosphatiden zur Stabilität der Lipoproteine bei (Belitz, 1963; Belitz *et al.*, 2005; Ternes, 2008).

2.2.2.1 Proteine des Plasmas

Low-Density-Lipoproteine (LDL)

LDL sind durch einen hohen Lipidanteil gekennzeichnet, der bei 84–90 % liegt. Dies erklärt die relativ niedrige Dichte von 0,98 g/m^3. Damit sind etwa 2/3 der Gesamtlipide im Eigelb in den LDL lokalisiert (Anton, 2007a; Ternes, 2008). Die Lipidfraktion setzt sich

aus etwa 62 % Triacylglyceriden, 22 % Phospholipiden und 3 % Cholesterin zusammen (Powrie und Nakai, 1986; Anton *et al.*, 2003). LDL werden als kugelförmige Partikel (auch LDL-Mizellen genannt) mit einem Durchmesser von 20–60 nm beschrieben (Bild 2.5) (Anton *et al*., 2003).

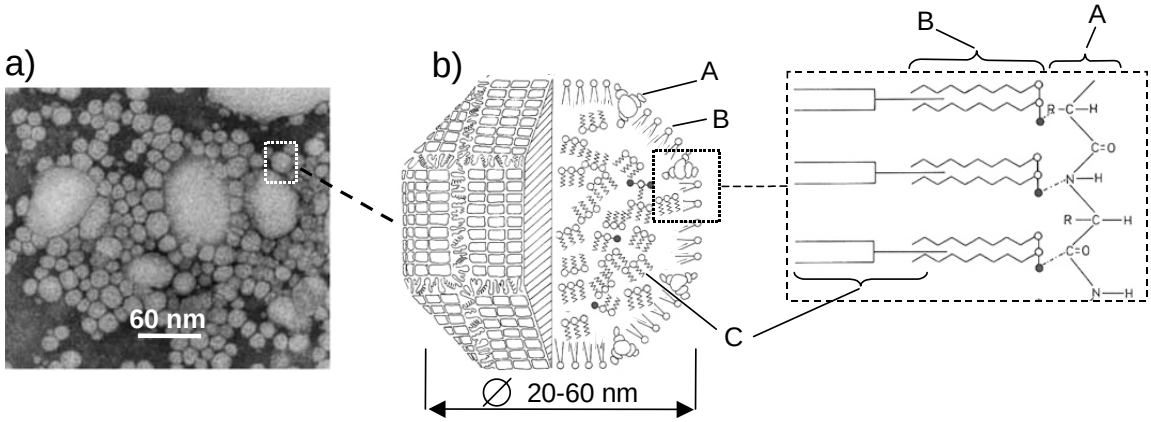


Bild 2.5: Struktur und Zusammensetzung einer LDL-Mizelle im Eigelb. a) Aufnahme mit Transmissionselektronenmikroskopie; b) schematischer Aufbau (A: Apo-LDL; B: Phospholipide; C: Triacylglyceride) (modifiziert nach Kamat *et al.*,1972 ; Anton *et al*., 2003; Ternes, 2008).

Die LDL-Mizelle besteht aus einem Kern hauptsächlich aus Triacylglyceriden und Cholesterinestern, die von einer Membranhülle umgeben sind (Cook und Martin, 1969; Evans *et al.*, 1973). Die Membranhülle ist aus einer Monomembran aus Phospholipiden aufgebaut, in die Apo-Lipoproteine eingebettet sind (Anton, 2007). Während in früheren Arbeiten die gesamte Fraktion als Lipovitellenin bezeichnet wurde (u.a. Mc Bee, und Coterill, 1979), wird dieser Begriff in aktuellen Veröffentlichungen verwendet, um lediglich den Proteinteil (Apo-Lipoproteine) von LDL zu kennzeichnen (Guilmineau *et al*., 2005; Daimer und Kulozik, 2009). Inzwischen hat sich der Begriff LDL für das gesamte Lipoprotein des Plasmas und Apo-LDL für dessen Proteinteil, d.h. ohne Lipide, durchgesetzt (Mine, 1997; Jolivet *et al.*, 2006; Anton, 2007). In der vorliegenden Arbeit werden die zuletzt genannten Bezeichnungen verwendet. LDL ist unabhängig von pH-Wert oder Ionenstärke nahezu vollständig wasserlöslich (Anton, 2007). Da die Assoziation der LDL-Mizelle hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt, besitzen Phospholipide eine essentielle Bedeutung für deren Stabilität (Burley und Vadehra, 1989). Kamat *et al*. (1975) fanden heraus, dass die polare Kopfgruppe am Lecithinmolekül in ihrer molekularen Beweglichkeit in der äußeren LDL-Membran beschränkt ist. Dieser Effekt wurde auf die Wechselwirkungen mit Apo-LDL (Bild 2.5) zurückgeführt.

Apo-Lipoproteine der LDL (Apo-LDL)

Zu Anzahl und Molekülmassen der Apo-LDL gibt es in der Literatur mehrere voneinander abweichende Angaben, die auf unterschiedliche Isolierungs- und Trennmethoden zurückzuführen sind. Bei der Auftrennung der LDL-Fraktion mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), die teilweise auch eine Entfettung der Lipoproteine beinhaltete, konnten neun (Guilmineau *et al.,* 2005) bzw. sechs (Jolivet *et al*., 2006) Apo-LDL im Bereich von 8–221 kDa bestimmt werden. Das mit 70 % mengenmäßig wichtigste Apo-LDL hat nach Guilmineau *et al.* (2005) eine Molekülmasse von 203 kDa bzw. nach Jolivet *et al*. (2006) 130 kDa. Der Anteil des zweitwichtigsten Apo-LDL mit der Molekülmasse von 17 kDa (Guilmineau *et al.,* 2005) bzw. 15 kDa (Jolivet *et al*., 2006) lag bei etwa 20 %. Die Apo-Proteine sind offensichtlich Glykoproteine und ihre isoelektrischen Punkte liegen im Bereich von pH 6,5 bis etwa 7,3 (Kojima und Nakamura, 1985). Über 40 % der Aminosäuren der Apo-LDL besitzen einen hydrophoben Charakter (Tsutsui und Obara, 1982). Anton *et al.* (2003) konnten mittels Circulardichroismus (CD) zeigen, dass die Mischung aus den wichtigsten (siehe oben) LDL Apo-Proteinen einen beträchtlichen Anteil an α-Helix-Strukturen aufweist. Konsequenterweise sind diese Apo-Proteine hydrophobe und flexible Moleküle.

Livetine

Bei den Livetinen handelt es sich um wasserlösliche globuläre Proteine, die zu 5,5 % im Eigelb enthalten sind (Powrie und Nakai, 1986). Diese lassen sich elektrophoretisch in drei Untereinheiten trennen: α-, β- und γ-Livetine mit 55–70 kDa, 33–36 kDa und etwa 203 kDa (Guilmineau *et al*., 2005). Die isoelektrischen Punkte liegen im Bereich von 4,3 bis etwa 7 (Ternes, 1989). Mittels der zweidimensionalen PAGE konnten fünf Untereinheiten nachgewiesen werden, die eine Molekülmasse von 35 bis 80 kDa aufweisen, wobei die isolelektrischen Punkte bei 5,5 bis 7 liegen (Nilsson *et al*., 2006)

2.2.2.2 Proteine der Granulafraktion

High-Density-Lipoproteine (HDL)

Ein weiteres wichtiges Lipoprotein des Eigelbs ist das Granulaprotein Lipovitellin. Dabei handelt es sich um Lipoproteine hoher Dichte, weswegen diese auch als HDL des Eigelbs bezeichnet werden (Acker und Ternes, 1994). Die HDL des Eigelbs sind durch einen hohen Proteingehalt von 76 % gekennzeichnet, wodurch sie sich vom Aufbau typischer Lipoproteine wesentlich unterscheiden (Anton, 2007b). Dementsprechend liegt der

Lipidanteil bei 22 % (davon 62 % Phospholipide). Aufgrund des niedrigen Lipidgehaltes liegt die Dichte von HDL mit 1,12 g/ml im Bereich der Dichte von Proteinen (Anton, 2007b). HDL liegen in Form von Homodimeren vor, die sich aus Monomeren von jeweils 200 kDa zusammensetzen. Jedes der Monomere ist ein globuläres Protein mit einem Hohlraum in Form eines Trichters und besteht hauptsächlich aus β-Faltblatt-Strukturen, die im Wesentlichen aus hydrophoben Aminosäuren gebildet werden (Anderson *et al.*, 1998). Im Hohlraum sind etwa 35 Phospholipidmoleküle fixiert, die als Monolayer vorliegen und mit hydrophoben Aminosäuren in Wechselwirkungen treten. Darüber hinaus können in diesem hydrophoben Hohlraum Triacylglyceride durch hydrophobe Interaktionen mit Phospholipiden eingebettet werden (Anton, 2007b). Die auf diese Weise eingebundenen und durch die HDL-Struktur geschützten Phospholipide können beispielsweise durch Phospholipasen nur bedingt erreicht werden (Anton, 2007b). Vier weitere Domänen, davon drei β-Faltblätter und eine α-Helix, bilden den Rest des Polypeptids. Die gesamte Struktur wird durch fünf Disulfidbrücken zusammengehalten. Allerdings existieren zwischen den unterschiedlichen HDL-Domänen auch Ionenbindungen (Anderson *et al.*, 1998).

Mehrere Autoren konnten mittels der präparativen SDS-PAGE unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol fünf HDL-Proteine im Bereich von 35 bis 110 kDa isolieren (Anton *et al.*, 2000a; Guilmineau *et al.*, 2005; Anton, 2007b). Allgemein erhöht sich die Anzahl der Untereinheiten in Gegenwart von Mercaptoethanol im SDS-Puffer, was auf partielle Verknüpfung dieser Einheiten über Disulfidbrücken schließen lässt. Die isoelektrischen Punkte (IP) liegen im Bereich von pH 8 bis 9 (Nilsson *et al.*, 2007).

Phosvitin

Das wasserlösliche Phosvitin ist ein Glykophosphoprotein mit einem relativ hohen Anteil an seringebundenen Phosphaten (jede zweite Aminosäure ist phosphoryliert). Das Phosvitin besitzt daher eine höhere Hydrophilität als HDL (Belitz *et al.*, 2005). Dabei sind die Phosphatgruppen nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentrieren sich in bestimmten Bereichen des Moleküls. Phosvitin verhält sich in wässriger Lösung wie ein Polyelektrolyt, wobei seine Konformation ungeordnet und flexibel ist (Acker und Ternes, 1994). Das CD-Spektrum zeigt, dass das Phosvitin im neutralen pH-Bereich in einer ungefalteten Struktur vorliegt und dass auch durch eine Abspaltung von Phosphatgruppen die räumliche Struktur des Proteins kaum verändert wird. Im sauren Milieu (pH < 4) dominieren β-Faltblatt-Strukturen, deren Anteil bis zu 67 % betragen kann (Taborsky,

1974). Mit einem Phosphoranteil von 10 % enthält Phosvitin fast 80 % des gesamten Phosphorgehaltes im Eigelb. Aufgrund seiner sehr hohen Phosphatkonzentration ist Phosvitin in der Lage, stabile Bindungen zu mehrwertigen Kationen, wie Fe^{2+}, Ca^{2+} und Mg^{2+} auszubilden. So sind 95 % des im nativen Eigelb vorkommenden Eisens an Phosvitin gebunden (Anton, 2003c). Neben der Art des Metalls hat auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Stabilität der Bindung (Lu und Baker, 1987). Eisen ist beispielsweise so fest an das Phosvitin gebunden, dass es für die menschliche Ernährung praktisch nicht zur Verfügung steht (Acker und Ternes, 1994). Insgesamt besitzt das Phosvitin mit –179 mV bei pH 7 eine relativ hohe negative Ladung (Anton, 2007c). Bei der SDS-PAGE erhält man mehrere Untereinheiten von Phosvitin, die im Bereich von 45–30 kDa liegen. Dabei scheint die Fraktion mit der Molekülmasse von 30–35 kDa die bedeutendste zu sein (Hegenauer *et al.*, 1977; Abe *et al.*, 1982; Aluko und Mine, 1998; Guilmineua *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2007). Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Phosvitinfraktionen liegen bei pH 1,9 bis 4,4 (Ternes, 1989).

Very-Low- Density-Lipoproteine (VLDL) der Granula

VLDL, die bis zu 89 % Lipide enthalten, kommen auch in den Granula vor. Der Anteil liegt dabei bei ca. 10 % (Causeret *et al.*, 1991). VLDL besitzen ein ähnliches Apoprotein wie das LDL des Plasmas, wobei auch alle anderen Eigenschaften weitgehend denen des Plasma-LDL entsprechen (Acker und Ternes, 1994).

2.2.3 Lipide des Eigelbs

2.2.3.1 Acylglyceride und Fettsäuren

Die Triacylglyceride bilden mit 66 % die Hauptkomponente der Lipide. Mono- und Diacylglyceride sind in Konzentrationen von 1,5–2,2 % in der Lipidfraktion zu finden. Während sich die Triacylglyceride vorwiegend in der LDL-Fraktion aufhalten, befinden sich die Mono- und Diglyceride in der HDL-Fraktion (Ternes, 2008).

Durch Hydrolyse (chemisch oder enzymatisch) können aus Alkylglyceriden oder Phospholipiden Fettsäuren freigesetzt werden. Diese werden nach der Länge der Alkylkette, Anzahl, Position und Konfiguration (*cis* bzw. *trans*) der Doppelbindungen, sowie nach ihrem Verzweigungsgrad klassifiziert. Man unterscheidet zwischen gesättigten (keine Doppelbindungen), einfach und mehrfach ungesättigten (eine bzw. mehrere Doppelbindungen) Fettsäuren (Bild 2.6) (Oberle, 1999; Belitz *et al.*, 2005).

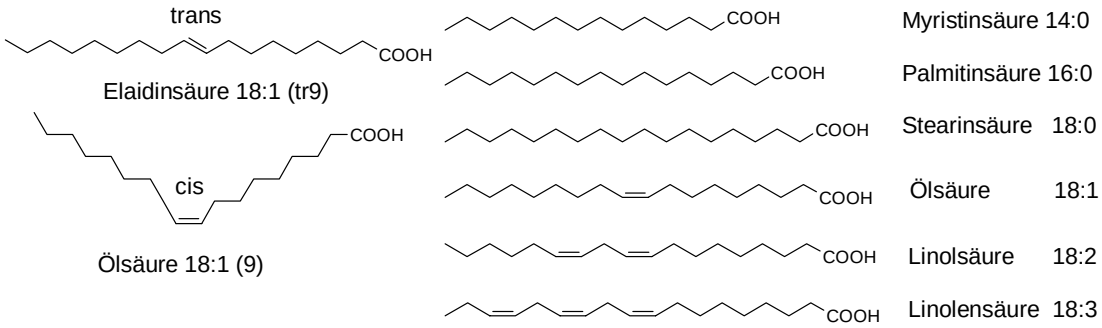


Bild 2.6: Strukturen und Konformationen von wichtigen Fettsäuren des Eigelbs (modifiziert nach Belitz *et al.*, 2005).

Der Säurecharakter der Carboxylgruppe beruht auf der Dissoziation des Protons und der Bildung eines resonanzstabilisierten Carboxylat-Anions. Der pK_s-Wert der Carbonsäuren C_2–C_9 liegt im Bereich 4,75–4,95. Davon stark abweichend wurde für Linolsäure ein pK_s-Wert von 7,9 gefunden (Belitz *et al.*, 2005). Die ungesättigten Fettsäuren haben wegen der fehlenden Drehbarkeit um die Doppelbindungen einen oder mehrere starre Knicke. So verursacht die *cis*-Konfiguration eine Krümmung des Ölsäuremoleküls von etwa 40°. Die Struktur bei der *trans*-Konfiguration der Elaidinsäure ähnelt dagegen noch der gestreckten Form der Stearinsäure (Belitz *et al*., 2005). Obwohl die *trans*-Isomerisierung chemisch und sterisch bevorzugt wird, kommen in der Natur häufiger *cis*-Isomere vor (Yilmaz, 2005). Allgemein sind Fettsäuren amphiphile Moleküle und haben Bereiche mit hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften. Der HLB-Wert der freien Fettsäuren liegt bei 1 (Ölsäure), was einem W/O-Emulgator entspricht. Die Sättigung der Alkylkette spielt für den HLB-Wert keine Rolle. Freie ungesättigte Fettsäuren schmecken in einer wässrigen Umgebung bitter. Es können somit Geschmacksveränderungen auftreten, wenn z.B. durch enzymatische Hydrolyse der Lipide Fettsäuren freigesetzt werden (Belitz *et al.*, 2005; Jaekel und Ternes, 2009).

2.2.3.2 Phospholipide

Die Klasse der Phospholipide gliedert sich in Sphingophospholipide (Derivate des Aminoalkohols Sphingosin) und Glycerophospholipide (Derivate des Glycerins) (Ternes, 2008). Tabelle 2.2 gibt Auskunft über die Zusammensetzung der Glycerophospholipide im Eigelb.

Tabelle 2.2: Phospholipide des Eigelbs (Ternes, 2008)

Phospholipide	Anteil an Phospholipiden (%)
Phosphatidylcholin (PC)	73,0
Phosphatidylethanolamin (PE)	15,5
Lyso-Phosphatidylcholin (LPC)	5,8
Sphingomyeline (SPH)	2,5
Lyso-Phosphatidylethanolamin (LPE)	2,1
Plasmalogene	0,9
Phosphatidylinosit (PI)	0,6

Phospholipide sind amphiphile Moleküle, deren Glycerid-Grundgerüst an der sn_3-Position mit einer polaren Kopfgruppe (Phosphorsäureester oder Phosphorsäure)-, sowie an der sn_1- und sn_2-Postition mit zwei langkettigen, unpolaren (hydrophoben) Fettsäuren verestert ist (Bild 2.7) (Belitz *et al.*, 2005; Yilmaz, 2005).

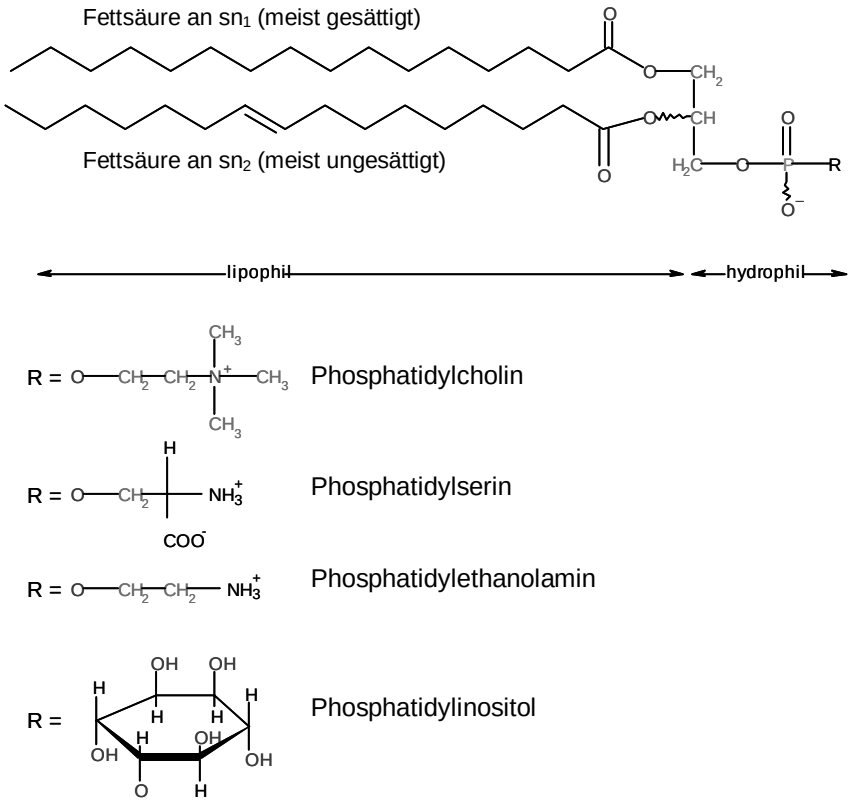


Bild 2.7: Zusammensetzung der Glycerophospholipide (modifiziert nach Yilmaz, 2005).

Die Phosphorsäure kann mit einem Aminoalkohol wie Cholin, Ethanolamin oder Serin bzw. einem Alkohol wie Inosit verestert sein (Pisch-Heberle, 2000). Als Fettsäuren dominieren die Palmitin- (16:0) mit 35 %, Stearin- (18:0) mit 16,2 % und die Ölsäure (18:1) mit 33–37 %, wobei an der Hydroxylgruppe in sn_1-Position überwiegend gesättigte Fettsäuren verestert sind. Die ungesättigten Fettsäuren befinden sich an der sn_2-Position

(Helmerich, 2004). Die Fettsäurezusammensetzung der wichtigsten Eigelbphospholipide, Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE), unterscheidet sich erheblich. Beim PE ist die Konzentration der Stearinsäure (18:0) und der ungesättigten Arachidon- (20:4) und Eicosapentaensäure (20:5) wesentlich höher. Im Gegensatz dazu sind die Palmitin- (16:0), die Öl- (18:1) und die Linolsäure (18:2) mehr in der PC-Fraktion vertreten (Acker und Ternes, 1994). Allerdings kann die Zusammensetzung der Fettsäuren auch maßgebend durch die Fettsäurenzusammensetzung im Futter beeinflusst werden (Acker und Ternes, 1994).

Grundsätzlich sind Phospholipide in Ölen, Fetten und einigen polaren Lösungsmitteln (z.B. Methanol) löslich. In unpolaren Lösungsmitteln wie Aceton sind Phospholipide dagegen nicht löslich. Im wässrigen Medium neigen Phospholipide dazu, Mizellen auszubilden. Unter neutralen Bedingungen (pH 7) liegen PC und PE zwitterionisch vor. Durch die Beeinflussung von Temperatur und pH-Wert oder z.B. durch Rühren lassen sich die Phospholipide auch in wässrigen Lösungen dispergieren.

2.2.4 Emulgiereigenschaften des Eigelbs

Durch das Vorhandensein von Protein-Phospholipid-Komplexen (LDL und HDL) besitzt Eigelb hervorragende Emulgiereigenschaften. Daher wird es als ein natürlicher Emulgator insbesondere für die Herstellung von Lebensmittelemulsionen wie Mayonnaise oder Salatdressing, die zu O/W-Emulsionen gehören, verwendet (Ford *et al*., 2004). Neben der stofflichen Zusammensetzung des Eigelbs spielen auch die Strukturen (Granulapartikel, LDL-Mizellen) bezüglich dessen technologischer Eigenschaften eine wichtige Rolle. In mehreren Arbeiten wurden die Emulgiereigenschaften des Eigelbs mit denen der Einzelfraktionen (Plasma und Granula) verglichen. Untersucht wurden dabei die Emulgieraktivität einzelner Bestandteile des Plasmas (LDL und Livetine) und der Granula (HDL und Phosvitin) sowie deren Beitrag zur Belegung und Zusammensetzung der Emulsionsgrenzfläche (u.a. Kiosseoglou und Sherman, 1983; Anton und Gandemer, 1997; Aluko und Mine, 1998; Le Denmat *et al*., 2004; Nilsson *et al*., 2007). Alle Eigelbbestandteile sind in der Lage, an der Emulsionsgrenzfläche zu adsorbieren und stabile Filme um die Öltropfen zu bilden. Dabei konkurrieren sie bei Überschuss um den Platz an der Grenzfläche (Aluko und Mine, 1998; Nilsson *et al.*, 2006). Im Folgenden soll der Beitrag bzw. die Rolle einzelner Eigelbkomponenten für die Emulgiereigenschaften des Eigelbs näher erläutert werden.

2.2.4.1 Emulgiereigenschaften von Eigelbfraktionen

Es wurde festgestellt, dass die Emulgiereigenschaften des Plasmas im Gegensatz zur Granulafraktion mit denen des Eigelbs vergleichbar waren (Le Denmat *et al.*, 2000). Daraus schloss man, dass die Plasmaproteine den größten Beitrag zum Emulgierverhalten des Eigelbs leisten. Dabei spielen die LDL des Plasmas eine dominierende Rolle (Anton *et al*., 2003). Kiosseoglou und Sherman (1983) schlugen einen Mechanismus, der die Adsorption von LDL während des Emulgierprozesses beschreibt, vor. Demnach findet während der Adsorption an der O/W-Grenzfläche zunächst eine Auflösung der LDL-Mizelle statt. Die dabei freigesetzten Apo-LDL und Phospholipide breiten sich an der Emulsionsgrenzfläche aus, während die neutralen Lipide in die Ölphase diffundieren. Der vorgeschlagene Mechanismus wurde bei späteren Untersuchungen durch Mine (1998) sowie Martinet *et al.* (2003) bestätigt. Die Rolle der Phospholipide bei der Adsorption von LDL ist noch nicht vollständig geklärt. Die Phospholipide können entweder im Verbund mit den Apo-LDL oder eigenständig an der Grenzfläche adsorbiert werden und konkurrieren dabei mit den Apo-LDL um die Adsorption. Es wurde gezeigt, dass nur ein unwesentlicher Teil der Phospholipide an der Grenzfläche adsorbiert wird (Anton *et al.*, 2003). Allerdings wurde festgestellt, dass die Grenzflächenaktivität der Apo-LDL-Phospholipid-Komplexe deutlich höher als die der reinen Phospholipide, aber vergleichbar mit den Emulgiereigenschaften der Apo-LDL ist (Mizutani und Nakamura, 1987).

Apo-LDL zeigen aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophobizität und flexiblen Struktur (Anton *et al*., 2003) eine höhere Bereitschaft zur Adsorption an der Grenzfläche als andere lösliche Proteine (Le Denmat *et al*., 2000) (siehe auch 2.2.2.1). Es ist anzumerken, dass die LDL unabhängig von Milieubedingungen (pH, Ionenstärke) immer eine nahezu 100%-ige kolloidale Löslichkeit aufweisen (Anton *et al*., 2003; Anton, 2007). Wegen der hohen Affinität zur Emulsionsgrenzfläche, die damit zusammenhängt, dass der Hauptteil der hydrophoben Gruppen der Apo-LDL nach außen gerichtet ist, neigt das Apo-Lipoprotein dazu, andere Proteine von der Grenzfläche zu verdrängen und sich auszubreiten (Anton *et al*., 2003). So werden BSA, Caseine oder ß-Lactoglobulin, die ebenfalls eine relativ hohe Grenzflächenaktivität besitzen, bei Zugabe von Apo-LDL oder auch LDL sehr rasch und nahezu komplett von der Grenzfläche verdrängt (Mizutani und Nakamura, 1984; Aluko *et al*., 1997; Aluko *et al*., 1998; Mine und Keeratiurai, 2000). Die Emulgieraktivität der Livetine erwies sich dagegen als etwas niedriger. Diese können sowohl durch die LDL als auch durch Caseine von der Grenzfläche verdrängt werden (Shenton, 1979).

Die Granula zeigen aufgrund der aggregierten Struktur und einer sehr niedrigen Löslichkeit im natürlichen Milieu des Eigelbs (pH 6,5–7 und Ionenstärke < 0,3 M NaCl) schwache Emulgieraktivität. Erst durch die Erhöhung der Ionenstärke auf > 0,3 M NaCl bzw. des pH-Wertes auf > 7 und des damit verbundenen Aufbrechens der Calciumbrücken sowie Freisetzung von HDL und Phosvitin, steigt die Löslichkeit der Granula (Causeret *et al.*, 1992) (siehe Kapitel 2.2.2.2). Dadurch ergeben sich auch bessere Emulgiereigenschaften. Dabei werden vor allem die Apo-HDL an der Grenzfläche adsorbiert (Anton und Gandemer, 1997; Aluko und Mine, 1998; Le Denmat *et al*., 2000). Das isolierte Phosvitin gilt aufgrund der flexiblen Struktur auch als ein guter Emulgator. So besitzt das Phosvitin im Vergleich zu BSA bessere Emulgiereigenschaften bezüglich Aufrahmung und Koaleszenz (Chung und Ferrier, 1992). Allerdings zeigt Phosvitin mehr Affinität zum Wasser und wird relativ leicht durch andere Proteine, wie Caseine oder Molkenproteine, von der Grenzfläche verdrängt (Dickinson *et al*., 1991; Aluko und Mine, 1997).

2.2.4.2 Konkurrierende Adsorption von Eigelbfraktionen

Bei der Untersuchung der Adsorptionskinetik des Eigelbs an einer Öl-Wasser-Grenzfläche und der Viskoelastizität des gebildeten Grenzflächenfilms konnte Mel'nikov (2002) feststellen, dass es zum einen relativ lange dauerte, bis bei der Messung der Grenzflächenspannung der Gleichgewichtszustand erreicht wird. Zum anderen berichtete er, dass die Adsorption der Eigelbbestandteile an der Grenzfläche schrittweise erfolgte. Diese Beobachtungen wurden damit erklärt, dass die Eigelbbestandteile und vor allem die Proteine des Eigelbs um die Adsorption an der Grenzfläche während des Emulgierens konkurrieren (Mel'nikov 2002; Kiosseoglou, 2003).

Das Adsorptionsverhalten einzelner Eigelbproteine an der Grenzfläche einer eigelbstabilisierten Emulsion kann anhand der Proteinzusammensetzung an dieser Grenzfläche beschrieben werden. So wurde auch dabei über eine dominante Rolle der LDL berichtet (Martinet *et al.*, 2002; Martinet *et al*., 2003). Die mengenmäßig bedeutendste Proteinfraktion an der Emulsionsgrenzfläche stellen aber die Granulaproteine HDL und Phosvitin dar (Anton und Gandemer, 1997; Mine, 1998a). Allerdings ist das Adsorptionsverhalten der Granulaproteine von den Milieubedingungen, wie pH oder Ionenstärke, abhängig (Anton *et al*., 2000a). Wie bereits beschrieben, liegen die Granulapartikel bei natürlichen pH-Wert und Ionenstärke des Eigelbs in aggregierter Form vor. So können die bei diesen Bedingungen intakten Granulapartikel aufgrund von konvektiven Effekten, die bei Turbulenzen während des Emulgierens herrschen, deutlich schneller als alle anderen

Eigelbkomponenten die Grenzfläche erreichen (Nilsson *et al*., 2007). Allerdings bedecken sie wegen ihrer aggregierten und unflexiblen Struktur nur einen relativ geringen Teil der Öltröpfchenoberfläche und haben daher, verglichen mit LDL, deutlich weniger Einfluss auf das Emulgierverhalten des Eigelbs (Le Denmat *et al*., 2000). Darüber hinaus können die in dieser aggregierten Form adsorbierten Granulapartikel durch die so genannte „*bridging focculation*" zur Flockung der Öltropfen und damit zur Destabilisierung der Emulsion führen (Kiosseoglou, 2004). Bei Erhöhung der Ionenstärke auf > 0,3 M NaCl oder des pH-Wertes auf über 8 kommt es zum Aufbruch der granulären Strukturen, wobei die Grenzflächenaktivität von HDL deutlich zunimmt (Le Denmat *et al*., 2000). Auch das Adsorptionsverhalten von Phosvitin in einer eigelbstabilisierten Emulsion wird erheblich durch den pH-Wert beeinflusst. Während bei pH 6 kein Phosvitin an der Grenzfläche adsorbiert wird, gehört es bei pH 3 zu den mengenmäßig wichtigsten adsorbierten Proteinen (Damodaran und Xu, 1996; Mine, 1998a; Anton und Gandemer, 1999). Zum einen ist dafür die Tatsache verantwortlich, dass das Phosvitin in Verbund mit HDL in Form von bei niedrigen pH-Werten intakten und damit aggregierten Granulapartikel an der Grenzfläche adsorbiert wird (Anton und Gandemer, 1999). Zum anderen spielt auch die Reduzierung der negativen Ladung bei Phosvitin im Bereich des IP (pH 1,9 bis 4,4) des Proteins eine entscheidende Rolle. Ferner zeigte Shenton (1979), dass in einer eigelbstabilisierten Emulsion nur 20 % der vorhandenen Livetine an der Grenzfläche adsorbiert werden, was auf deren eher untergeordnete Rolle für die Stabilisierung einer eigelbstabilisierten Emulsion hindeutet.

Darüber hinaus kommt es auch zwischen den Untereinheiten der einzelnen Eigelbfraktionen zur konkurrierenden Adsorption an der Emulsionsgrenzfläche. Mine (1998b) untersuchte das Adsorptionsverhalten von LDL und stellte fest, dass mit Ausnahme der drei niedermolekularen Apo-LDL mit Molekülmassen von 64, 43 und 19 kDa alle anderen Apo-LDL an der O/W-Grenzfläche adsorbiert werden. Darüber hinaus zeigte er, dass die Grenzflächenbelegung der Phospholipide von der LDL-Konzentration an der Grenzfläche abhängig war. So nahm mit steigendem LDL-Gehalt auch die Phospholipidkonzentration zu. Dieses Ergebnis veranschaulichte die Rolle von Protein-Phospholid-Wechselwirkungen für die Eigenschaften des Lipoproteinfilms an der Öltropfenoberfläche. Nilsson *et al*. (2006) konnten zeigen, dass auch die isolierten Livetine in der Lage sind, durch Ausbildung von Monolayer am Öltropfen eine O/W-Emulsionen zu stabilisieren. Dabei wurde bei niedrigen Proteinkonzentrationen nahezu die gesamte Livetinfraktion an der Grenzfläche adsorbiert, womit bestätigt werden konnte, dass Livetine ebenfalls über

grenzflächenaktive Eigenschaften verfügen. Wurde der Gehalt der Proteine bis hin zur Sättigungskonzentration der Grenzfläche erhöht, so konnte auch zwischen den Livetin-Untereinheiten der Effekt der konkurrierenden Adsorption beobachtet werden. Dabei wurden die Untereinheiten mit 65 und 35 kDa, die über einen besonders langen hydrophoben Bereich in der Polypeptidkette verfügen, bevorzugt an der O/W-Grenzfläche adsorbiert (Nilsson *et al*., 2006). Der Vergleich zwischen HDL und Phosvitin zeigte, dass das Lipoprotein eine deutlich höhere Grenzflächenaktivität aufweist und somit in der Lage ist, das Phosvitin von der O/W-Grenzfläche zu verdrängen (Aluko und Mine, 1998). Allerdings erfolgte die Verdrängung im neutralen pH-Bereich deutlich effektiver als bei pH 4, was mit der höheren negativen Ladung des Phosvitins und damit einer niedrigeren Affinität zur Ölphase bei höheren pH-Werten zusammenhängt.

2.2.5 Thermisches Verhalten der Eigelbproteine

Bereits früh wurde berichtet, dass eine Erhitzung des Eigelbs auf 65 °C bis 70 °C zur Viskositätserhöhung führt, die durch hitzeinduziertes Gelieren hervorgerufen wird (Franzen *et al*., 1970). Die thermoinduzierte Gelierung des Eigelbs tritt hauptsächlich durch Ausbildung eines Netzwerkes zwischen den Partikeln (LDL-Mizellen und Granula) bei der thermischen Denaturierung der Proteine an der Partikeloberfläche auf (Franzen *et al*., 1970; Le Denmat *et al*., 1999; Kiosseoglou, 2004, 2003). Dabei leisten offensichtlich die LDL-Mizellen den Hauptbeitrag dazu (Nakamura, *et al*., 1982; Kojima und Nakamura, 1985, Le Denmat *et al*., 1999).

Die LDL-Mizellen zeigen bis zu einer Temperatureinwirkung von 60 °C über 10 min keine Veränderungen. Bei Temperaturen oberhalb von 65 °C findet eine Auffaltung der Proteine statt, die dann unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken, ionischen Bindungen oder hydrophober Wechselwirkungen untereinander aggregieren und somit Gelstrukturen ausbilden (Tsutsui, 1988; Le Denmat *et al*., 1999). Ab einer Temperatur von 75 °C bilden wässrige LDL-Dispersionen feste, kohäsive Gele (Nakamura *et al*., 1982; Kojima und Nakamura, 1985). Auch Guilmineau *et al.* (2005) konnten mittels SDS-PAGE zeigen, dass die niedermolekularen Apo-LDL (68 bis 17 kDa) bei einer Erhitzung des Eigelbs bei 74 °C nur teilweise beeinträchtigt werden, während die höhermolekularen Apo-LDL (221, 203, 122 und 93 kDa) nach der Hitzebehandlung völlig unlöslich sind. Gegenüber Temperatureinflüssen scheinen auch die Livetine besonders anfällig zu sein. Le Denmat *et al*. (1999) zeigten, dass γ- und α-Livetine nur bis 62 bzw. 72 °C stabil sind. Eine

Ausnahme bildet dagegen das β-Livetin, welches auch während der Erhitzung auf 76 °C unverändert blieb. Ähnliches thermisches Verhalten der Livetine konnte bereits von Dixon und Cotterill (1981) gezeigt werden. Auch das HDL wurde von mehreren Autoren noch bei 76 °C als relativ hitzestabil beschrieben (Le Denmat *et al.*, 1999; Guilmineau *et al.*, 2005). Anton *et al.* (2000b) stellten fest, dass durch die native Granulastruktur, in der HDL und Phosvitin in assoziierter Form vorliegen, die Proteindenaturierung zwar nicht vermindert, aber die Aggregation der einzelnen Granulapartikel teilweise verhindert wird. Allerdings zeigten niedermolekulare Apo-HDL auch hitzeempfindliche Eigenschaften (Le Denmat *et al.*, 1999). Phosvitin ist hitzestabil, so dass selbst bei 10-minütigem Erhitzen bei 110 °C keine Veränderungen festzustellen sind (Ito *et al.*, 1983).

2.2.6 Thermische Behandlung eigelbstabilisierter O/W-Emulsionen

Während der Wärmebehandlung proteinstabilisierter Emulsionen kann es zur Destabilisierung des Emulsionssystems kommen (Kiosseoglou, 2003). Dabei können Effekte, wie Flockung oder Koaleszenz der Öltropfen auftreten, wobei Letztere zum irreversiblen Bruch der Emulsion führt (siehe auch Kapitel 2.1.2). Ab ca. 70 °C bis 75 °C beginnen die Proteine aufzufalten und es kommt zum Verlust der Tertiärstruktur der Eigelbproteine (Anton et al., 2001). Bei Apo-LDL erhöht sich dabei die Anzahl der nach außen gerichteten hydrophoben Seitenketten (Mine, 1997). Durch energetische Wechselwirkungen, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen mit den ebenfalls aufgefalteten Proteinseitenketten der an der Oberfläche benachbarter Öltropfen adsorbierten Proteine, kommt es zur Ausbildung dreidimensionaler Proteinnetzwerke zwischen den Öltropfen. Diese Netzwerke werden durch Wechselwirkungen mit den nicht adsorbierten Proteinen in der kontinuierlichen Phase der Emulsion verstärkt. Diese können auch untereinander thermoinduzierte Proteinnetzwerke ausbilden. Durch eine Erhöhung des Proteingehaltes in der Emulsion und der daraus resultierenden Zunahme der Konzentration der nicht adsorbierten Proteine wird die Ausbildung der Proteinnetzwerke in der kontinuierlichen Phase intensiviert, was zum einen zur Flockung der Öltropfen und zum anderen zur Viskositätserhöhung thermisch behandelter proteinstabilisierter Emulsionen führt (Anton *et al.*, 2001; Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Bei einem weiteren Temperaturanstieg nimmt der Anteil an α-Helix-Strukturen der Proteine ab und der Anteil an β-Faltblatt steigt. Im Temperaturbereich von 80–100 °C erfolgt dann die Bildung von Disulfidbrücken, was schließlich zur Aggregatbildung zwischen den Proteinmolekülen an der O/W-Grenzfläche führt. Der Verlust der flexiblen Struktur der Proteine und damit der Fähigkeit,

sich der Öltropfenform anzupassen und diese effizient zu belegen, bewirkt eine signifikante Reduzierung ihrer Grenzflächenaktivität. Zusätzlich tritt eine Minderung der Viskoelastizität des tropfenumgebenden Films auf, was schließlich die Koaleszenz der Öltropfen und das Brechen der Emulsion als Folge hat (Anton *et al*., 2001).

Die thermisch induzierte Destabilisierung proteinstabilisierter Emulsionen kann u.a. durch Zusatz von niedermolekularen Emulgatoren verhindert werden (Magdassi *et al*., 1996; McCrae, 1999; Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). McCrae (1999) beschrieb zwei mögliche Mechanismen, die zur Erhöhung der Hitzebeständigkeit von Milchemulsionen durch Zugabe von Lecithin führen, wobei diese Effekte auch für andere Emulgatoren in proteinstabilisierten Emulsionen Gültigkeit besitzen. Zum einen kann die thermische Stabilität der Emulsionen durch eine Verdrängung der Proteine von der Grenzfläche oder auch durch Wechselwirkungen mit Emulgatoren unmittelbar an der Grenzfläche erreicht werden. Zum anderen können Emulgatoren mit den nicht adsorbierten Proteinen in der kontinuierlichen Phase wechselwirken und dadurch verhindern, dass diese mit den adsorbierten Proteinen in Wechselwirkungen treten und so eine Destabilisierung des Emulsionssystems verursachen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Art der Wechselwirkungen, die wiederum, wie bereits im Kapitel 2.1.5 ausführlich beschrieben, im Wesentlichen vom Aufbau und von der Konzentration der Emulgatoren (ionisch oder nichtionisch) und der Proteine abhängig ist. So kann die Hitzestabilität von β-Lactoglobulin durch Komplexbildung mit ionischen Emulgatoren wie SDS oder Phosphatidsäure deutlich erhöht werden (Kurihara und Katsuragi, 1993; Magdassi *et al*., 1996). Allerdings bewirkt eine weitere Erhöhung der Konzentration von SDS auf ein Mol pro Mol β-Lactoglobulin sogar eine Verschlechterung der Hitzestabilität des Proteins. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch die Bildung eines Komplexes zwischen Ovalbumin und Lyso-Phosphatidylcholin die thermisch induzierte Abnahme des Anteils an α-Helix-Strukturen reduziert werden konnte (Mine, 1993). Auch nichtionische Emulgatoren wie Polysorbate (Tween®) sind in der Lage, die Hitzestabilität von β-Lactoglobulin- bzw. eigelbstabilisierten Emulsionen zu verbessern (McClements, 2004; Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Dabei verdrängt das Polysorbat 40 die adsorbierten Proteine von der Grenzfläche und verhindert gleichzeitig durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Proteinabschnitten deren hitzeinduzierte Aggregation an der Oberfläche der Öltropfen (Parkinson und Dickinson, 2004). Bei der thermischen Behandlung einer eigelbstabilisierten Emulsion werden dabei etwa 20 % der adsorbierten Proteine, die eher schwach an der äußeren Schicht des Grenzflächenfilms anhaften, verdrängt. Die exponierten hydro-

phoben Gruppen der an der äußeren Schicht des Grenzflächenfilms verbliebenen Proteine werden zusätzlich durch die Polysorbat-Moleküle abgeschirmt. Darüber hinaus erfolgt eine Abschirmung der exponierten Seitenketten der nicht adsorbierten Proteine durch den Emulgator. Dadurch werden die Aggregation der Öltropfen und damit die hitzeinduzierte Destabilisierung der Emulsion verhindert (Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Zudem kann die Hitzestabilität eigelbstabilisierter Emulsionen durch die Hydrolyse der Eigelbphospholipide bei einer *In-situ*-Behandlung des Eigelbs mit Phospholipase A_2 verbessert werden. Darauf wird im Kapitel 2.3.2 ausführlich eingegangen.

2.3 Enzymatische Modifizierung der Eigelbphospholipide durch Phospholipasen

2.3.1 Phospholipasen

Phospholipasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die spezifisch die Esterbindungen der Phospholipide durch Hydrolyse spalten und daher zur Klasse der Hydrolasen gehören. Hinsichtlich des Angriffsortes am Phospholipdmolekül werden Phospholipasen in vier Gruppen unterteilt (Bild 2.8). Phospholipase A_1 (EC 3.1.1.32) und Phospholipase A_2 (EC 3.1.1.4) spalten spezifisch jeweils sn_1- bzw. sn_2-Esterbindungen der Fettsäuren und gehören damit zur Gruppe der Alkylhydrolasen. Auch die Phospholipase B (EC 3.1.1.5), die sowohl die sn_1- als auch die sn_2-Fettsäure abspaltet, gehört zu dieser Gruppe. Phospholipase C (PLC) (EC 3.1.4.10) und Phospholipase D (PLD) (3.1.4.4) hingegen gehören zur Gruppe der Phosphodiesterasen. PLC hydrolysiert Phospholipide zu 1,2-Diacylcholin und PLD katalysiert die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung und spaltet so ein Alkohol ab (Markert, 2004).

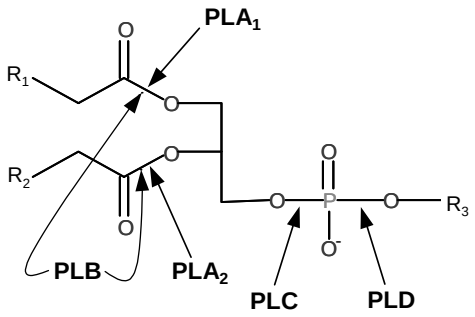


Bild 2.8: Spaltstellen von Phospholipasen am Phospholipidmolekül. PLA_1: Phospholipase A_1; PLA_2: Phospholipase A_2; PLB: Phospholipase B; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; R_1 und R_2: Alkylreste; R_3: Alkohol (modifiziert nach Belitz *et al*., 2005).

Ein gemeinsames Merkmal aller Phospholipasen besteht darin, dass diese ausschließlich an Grenzflächen aktiv werden. Zusätzlich muss dabei das Substrat in aggregierter Form, d.h. als Mizelle vorliegen. Da Phospholipide erst beim Erreichen der CMC Mizellstrukturen ausbilden, ist die Konzentration des Substrats für die Hydrolyseaktivität der Phospholipasen von Bedeutung (Guo *et al*., 2005). Bei Säugetieren sind Phospholipasen als Verdauungsenzyme vorhanden und an Signalwandlungssystemen beteiligt. Darüber hinaus finden Phospholipasen auch als Biokatalysatoren speziell bei Generierung von Phospholipiden mit gezielt modifizierten Eigenschaften Anwendung (Schäffner, 2001).

2.3.1.1 Phospholipase A_2

Die Superfamilie der PLA_2, die spezifisch die sn_2-Esterbindung der Phospholipide spalten, besteht aus einer Vielzahl von Enzymen, die sich hauptsächlich hinsichtlich ihrer Herkunft unterscheiden (Plückthun und Dennis 1981; Six und Dennis, 2000). Die Hydrolyseprodukte sind freie Fettsäuren und Lyso-Phospholipide (Plückthun und Dennis 1981). PLA_2 wurde als erste der Phospholipasen entdeckt und aus Gift von Kobras isoliert (De Maria *et al*., 2007). Später wurden weitere PLA_2 in großen Mengen in verschiedenen Pankreassäften gefunden (Markert, 2000). Für die Klassifizierung der PLA_2 schlugen Six und Dennis (2000) eine Unterteilung in drei Gruppen vor. Zur ersten Gruppe gehören extrazelluläre, sekretorische PLA_2, zu denen z.B. PLA_2 aus Schweinepankreas zählt. Die als zytosolische PLA_2 bezeichneten Enzyme sind im Zytosol von unterschiedlichen Zelltypen zu finden und unterscheiden sich strukturell von den sekretorischen PLA_2. Während diese beiden Phospholipasen Calcium als Cofaktor für die Aktivierung benötigen, existiert noch eine dritte Gruppe von PLA_2, die keine Calciumionen brauchen und sich auch strukturell von den sekretorischen und zytosolischen PLA_2 abgrenzen (Six und Dennis, 2000). Ingesamt geben Guo *et al*. (2005), sowie De Maria *et al*. (2007) eine sehr detaillierte Übersicht über die zurzeit bekannten Phospholipasen sowie deren Klassifizierung.

Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas

Die Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas ist ein monomeres, relativ kleines (14–15 kDa) Enzym (Plückthun und Dennis, 1981). Dieses wird vom Pankreas in den Bauchspeicheldrüsen des Schweins als Proenzym sekretiert, welches erst durch proteolytische Abspaltung eines N-terminalen Heptapeptids zu Phospholipase A_2 aktiviert wird. Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas besteht aus 124 Aminosäuren. Die gefaltete Struktur wird durch 7 Disulfidbrücken stabilisiert (De Maria, 2007). Der isoelektrische

Punkt liegt im Bereich von pH 6,7 bis 7,5. Das pH-Optimum für die Hydrolysereaktion wird mit 8 bis 9 angegeben (Valentin et al., 1999). Zwar liegt das pH-Optimum im basischen Bereich, doch ist das Enzym im Gegensatz zu den Enzymen mikrobiellen Ursprungs sowohl im basischen als auch im neutralen Bereich aktiv (Egger *et al*., 1997). Die für die Hydrolyse benötigte Menge an Calciumionen liegt im millimolaren Bereich (Guo *et al*., 2005). Von daher ist z.B. die natürliche Ca^{2+}-Konzentration des Eigelbs ausreichend, um eine optimale Enzymaktivität zu gewährleisten. Beim Enzym konnte keine Kopfgruppenspezifität beobachtet werden, d.h., es akzeptiert PC und PE gleichermaßen als Substrat (Mustranta *et al*. 1995). Nach der Abspaltung des Acylrestes am sn_2-Atom kann der Effekt der „Acylmigration" auftreten, wobei der sn_1-Acylrest zur sn_2-Postion des Phospholipidmoleküls wandert (Plückthun und Dennis, 1981). Im alkalischen pH-Bereich stellt sich nach der Hydrolyse von PC ein Gleichgewicht zwischen 1-Acylisomeren und 2-Acylisomeren des LPC mit einem Verhältnis von 9:1 ein (Adlercreutz *et al*., 2002). Im Gegensatz zu anderen Phospholipasen A_2, die bevorzugt Phospholipide in aggregierter Form hydrolysieren, greift das aus Schweinepankreas gewonnene Enzym monomere und mizellare Substrate gleichermaßen gut an. Das Enzym braucht aber unbedingt Wasser für die Hydrolyse, wobei die Hydrolyseaktivität mit der Erhöhung des a_w-Wertes steigt (Egger *et al*., 1997). PLA_2 aus Schweinepankreas besitzt eine hohe Resistenz gegenüber denaturierenden Einflüssen und weist eine beträchtliche thermische Stabilität auf. Das pH-abhängige Temperaturoptimum liegt im alkalischen pH-Bereich (pH 8–10) bei etwa 50 °C bis 60 °C. In den neutralen bzw. sauren (pH 4) pH-Bereichen kann man noch bei 70 °C bzw. 93 °C keinen nennenswerten Aktivitätsverlust nachweisen (Mustranta *et al*., 1995; Novozymes A/S, 2002). Diese hohe thermische Stabilität wird hauptsächlich auf die große Anzahl an vorhandenen Disulfidbrücken im Enzym zurückgeführt (Janssen *et al.,* 1999). Ferner zeichnet sich die Pankreas-PLA_2 durch eine nahezu vollständige Freiheit von Nebenaktivitäten, wie z.B. Lysophospholipase-, Lipase- oder Esteraseaktivität, aus (Mustranta *et al.*, 1995).

PLA_2 aus Schweinepankreas wird an der Phospholipid-Wasser-Grenzfläche aktiviert und zeigt dadurch ein für alle Phospholipasen charakteristisches Verhalten. Bei Präsenz von negativ geladenen Emulgatoren, den so genannten „*activators*" oder freien Fettsäuren, kann das Enzym zusätzlich aktiviert werden (Plückthun und Dennis, 1985). Allerdings scheint die Bindung an anionische Emulgatoren, wie Phospholipide, nicht ausschließlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen, wie am Beispiel von PLA_2 aus Bienengift gezeigt wurde (Ghomashchi *et al*., 1998). Der Hydrolysemechanismus der PLA_2

ist sehr komplex und beinhaltet insgesamt drei Schritte, die in vereinfachter Form wie folgt dargestellt werden können. Im ersten Schritt der PLA_2-katalysierten Hydrolyse findet eine Bindung des Phospholipidmoleküls an das aktive Zentrum der PLA_2 statt, d.h. es entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex (Intermediat), wobei die hydrophoben Fettsäurereste vom hydrophoben Kanal des Zentrums aufgenommen werden. Durch das Calciumion werden mit der Carbonylgruppe der zu spaltenden Esterbindung am sn_2 elektrostatische Wechselwirkungen ausgebildet, die durch Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten des Enzyms stabilisiert werden. Im zweiten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des Wassers auf die Carbonylgruppe des Substrates, der zur Spaltung der Esterbindung führt. Anschließend dissoziieren die entstandenen Produkte (Lyso-Phospholipide und freie Fettsäuren), dabei findet auch eine Regenerierung des Enzyms statt (Scott und Sigler, 1994a,b; Pisch-Heberle, 2000; Kölbel, 2006).

2.3.1.2 Phospholipasen D

Phosphatidylcholin-phosphatidohydrolase (PLD) ist ein ubiquitäres Enzym und kommt in Pflanzen (u.a. Karotte, Weißkohl), Säugetieren (u.a. Ratte, Maus, Rind, Mensch), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Pilzen sowie in mehreren Bakterienarten (u.a. *Streptomyces*-Arten, Arcano-, Corynebakterien) vor (De Maria, 2005; Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005). Insgesamt sind zurzeit mehr als 500 PLD, die sich hinsichtlich Molekülmasse, pH- und Temperaturoptimum oder Calciumabhängigkeit unterscheiden, bekannt. So erstreckt sich der Molekülmassenbereich der PLD-Superfamilie von 16 kDa (*Streptomyces hachijoensis*) bis hin zu 120 kDa (*Homo sapiens*). Insgesamt ist zur Aktivierung von PLD pflanzlicher Herkunft eine deutlich höhere Calciumkonzentration im Vergleich zu den aus Säugetieren oder Mikroorganismen stammenden PLD erforderlich. Das pH-Optimum des Enzyms liegt im Bereich von 4,6 bis 7,5 und die optimale Reaktionstemperatur zwischen 20 °C und 60 °C (Guo *et al*., 2005). Bisher ist lediglich von PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF die tertiäre Struktur bekannt (Leiros *et al*., 2000; Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005). Nahezu alle Vertreter der PLD-Superfamilie enthalten vier konservierte Sequenzbereiche. Allerdings bestehen neben diesen Sequenzbereichen keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen den PLD aus Pflanzen, Säugetieren und Bakterien (Haufe, 2006).

PLD katalysiert als Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse der Phosphodiesterbindung in Glycerophospholipiden, die von Bildung einer Phosphatidsäure und dem Alkohol der

polaren Gruppe begleitet wird, zusätzlich den Austausch der polaren Kopfgruppe. Bei der so genannten Transphosphatidylierung wird bei Vorhandensein eines Akzeptoralkohols in der Substratlösung dieser anstelle eines Wassermoleküls auf den Phosphatidylrest übertragen (Bild 2.9) (Lerchner, 2005).

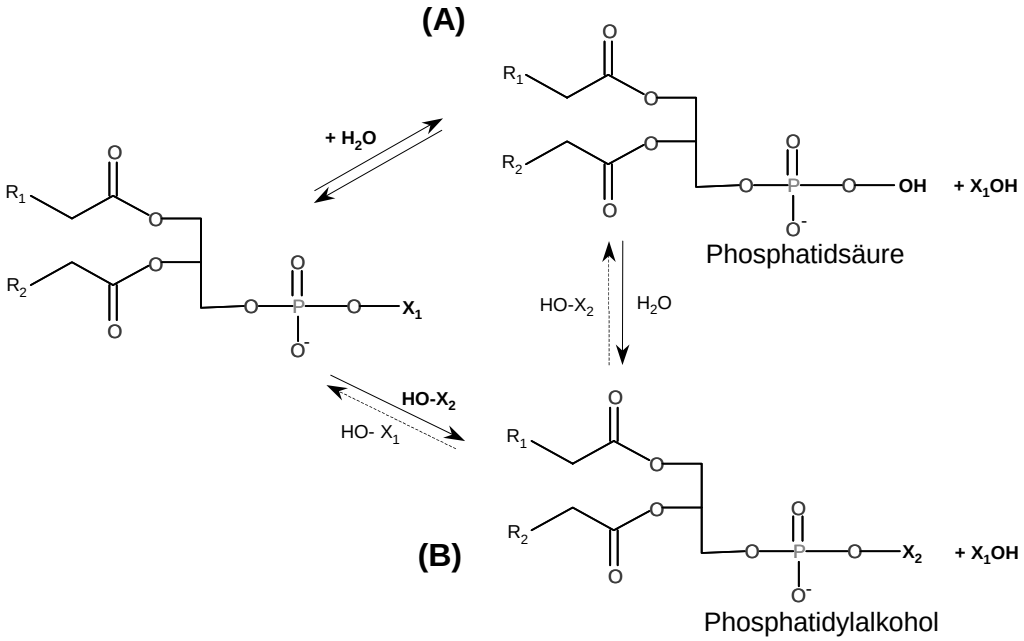


Bild 2.9: PLD-katalysierte Hydrolyse (A) und Transphosphatidylierung (B) von Phospholipiden. R_1 und R_2: gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste; X_1OH und X_2OH: Kopfgruppen- bzw. Substratalkohol (modifiziert nach Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005; Haufe, 2006).

Dadurch unterscheidet sich die PLD von anderen Phospholipasen, die in der Regel nur die Hydrolysereaktion katalysieren (Haufe, 2006). Während PLD aus den meisten *Streptomyces*-Stämmen vorwiegend die Transphosphatidylierung katalysieren, ist die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* hauptsächlich für die Hydrolysereaktion prädestiniert (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 2000). Bei den Enzymen, die sowohl die Hydrolyse als auch die Transphosphatidylierung gleichermaßen katalysieren, wie z.B. die PLD aus Weißkohl, kann das Reaktionsgleichgewicht durch Erhöhung der Alkoholkonzentration in der Substratlösung in Richtung Kopfgruppenaustauschreaktion verlagert werden. Auf der anderen Seite kann eine zu hohe Alkoholkonzentration die Enzymaktivität herabsetzen (D'Arrigo und Servi, 1997). Beiden Rektionen liegt die Bildung eines kovalenten Phosphatidyl-Enzym-Intermediats, d.h. eines Übergangskomplexes, zugrunde. Die enzymatische Umsetzung kann durch den so genannten Pingpong-Mechanismus beschrieben werden, in dem die Bindung des Substrates und die Freisetzung des Produktes abwechselnd erfolgen (Leiros *et al*., 2004). Anhand von Untersuchungen von PLD aus

Streptomyces chromofuscus konnte gezeigt werden, dass bei der Katalysereaktion die P-O-Bindung und nicht, wie zunächst vermutet, die O-C-Bindung (im Bild 2.8 als O-R_3 dargestellt) gespalten wird (Holbrook *et al.*, 1991).

Die PLD wird in ähnlicher Form wie die bereits beschriebenen PLA_2 an Grenzflächen aktiviert. Das bedeutet, dass die PLD eine höhere Aktivität zeigt, wenn die Substratmoleküle in aggregierter Form vorliegen. Gegenüber den monomolekular vorliegenden Phospholipiden weist die PLD eine wesentlich niedrigere Aktivität auf. Die Enzymreaktion erfolgt entweder in wässrigen Lösungen oder an der Grenzfläche zwischen einer wässrigen Lösung und einem unpolaren Lösungsmittel. Hirche und Ulbrich-Hofmann (2000) konnten einen Zusammenhang zwischen der Grenzflächenspannung und der Packungsdichte der Aggregate aus PC in biphasischen Systemen nachweisen. Insgesamt besitzen PLD eine ausgeprägte Substratspezifität. Insbesondere eignen sich PC, PE, PS und noch wenige weitere Phospholipide als Substrat. Zusätzlich wurde ein PLD-katalysierter Kopfgruppenaustausch für LPC beschrieben (Virto *et al.*, 2000). Als Akzeptoralkohol für die Transphosphatidylierung eignen sich insbesondere primäre Alkohole. Die Reaktion mit sekundären Alkoholen verläuft dagegen deutlich langsamer und eine Transphosphatidylierung mit tertiären Alkoholen ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden (De Maria *et al.*, 2007).

Phospholipase D aus Streptomyces chromofuscus

PLD aus *Streptomyces chromofuscus* gehört zu den ersten Enzymen mit einer PLD-Aktivität, die in reiner Form isoliert und biochemisch beschrieben worden sind (Ulbrich-Hofmann *et al.*, 2005). Das Enzym wurde erstmalig mittels Affinitätschromatographie an einer Palmitoyl-Cellulose-Säule isoliert (Imamura und Horiuti, 1979). Eine Analyse des isolierten Enzymproteins mittels SDS-PAGE ergab ein Peptid mit einer Molekülmasse von etwa 57 kDa (Hiroaki *et al.*, 1998). Die mittels Gelfiltration aufgetrennte Proteinfraktion wies eine Molekülmasse von etwa 50 kDa auf (Imamura und Horiuti, 1979; Sato *et al.*, 1998). Der isolektrische Punkt des Enzyms liegt bei pH 5,1.

Die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* zeigt eine hohe Hydrolyseaktivität in Bezug auf Phospholipide (PC, LPC, PE und Sphingomyelin), wobei die Aktivität bezüglich der Lyso-Phospholipide sogar noch etwas höher ist (Imamura und Horiuti, 1979; Martin *et al.*, 2000). Der für die enzymatische Reaktion optimale pH-Wert liegt bei 8. Zusätzlich konnte die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe von 3,8 mmol Deoxycholat und 1 bis

20 mmol Calcium deutlich erhöht werden (Imamura und Horiuti, 1979; Yamamoto *et al*., 1995). Dagegen führte der Zusatz von SDS und EDTA zur Inhibierung der Enzymaktivität. Darüber hinaus können zu hohe Konzentrationen an LPC oder Lyso-Phosphatidsäure (LPA) die Aktivität ebenfalls herabsetzen (Imamura und Horiuti, 1979). Die bei der Hydrolysereaktion von PLD und Phospholipiden gebildete PA führt im Gegensatz dazu zu einer Erhöhung der Enzymaktivität und demzufolge zur Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit (Stieglitz *et al*., 2001; El Kirat *et al*., 2008). Die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* ist deutlich thermolabiler als die PLA_2. Zwar führt eine 90-minütige Behandlung des Enzyms bei 37 °C bei pH 10 und pH 6 nur zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust, doch wird die Enzymaktivität von PLD bei 70 °C (15 min) um die Hälfte reduziert. Eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C bei gleicher Einwirkungszeit bewirkt sogar einen vollständigen Aktivitätsverlust (Imamura und Horiuti, 1979).

Unter den bisher bekannten Phospholipasen des Typs D nimmt die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* eine gesonderte Stellung ein (Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005). So konnten in der ermittelten Aminosäurensequenz signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Sequenzen der Proteine aus der PLD-Superfamilie nachgewiesen werden (Yang und Roberts, 2002). Im Gegensatz dazu wurden Homologien zwischen der Sequenz der *Streptomyces-chromofuscus*-PLD und mehreren Phosphatasen festgestellt (Ulbrich-Hofmann, 2005). Darüber hinaus zeigt die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* eine erheblich niedrigere spezifische Aktivität, verglichen mit den PLD aus anderen *Streptomyces*-Arten (Shimbo *et al*., 1993). Außerdem weist das Enzym keine für die PLD- oder PLA_2-Arten typische Grenzflächenaktivierung (Geng *et al*., 1998) auf. Schließlich wird durch das Enzym die Hydrolysereaktion favorisiert, während andere PLD und vor allem die PLD aus anderen *Streptomyces*-Arten bevorzugt die Transphosphatidylierungsreaktion katalysieren (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 2000). Folglich wird in letzter Zeit davon ausgegangen, dass die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* nicht zur PLD-Superfamilie gehört (Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005). Nichtsdestotrotz ist die PLD aus *Streptomyces chromofuscus* eine der wenigen Phospholipasen D, die zurzeit kommerziell erhältlich ist (Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005) und deswegen relativ oft als „Modell-Enzym“ für Studien bezüglich der Grenzflächenregulierung hinzugezogen wird (u.a. Yamamoto *et al*., 1995; Wagner und Brezesinski, 2007; El Kirat *et al*. ,2008).

2.3.2 Industrielle Anwendung von Phospholipasen

2.3.2.1 PLA_2 in der Lebensmittelindustrie

Das Applikationsspektrum der PLA_2 in der Lebensmittelindustrie ist relativ breit gefächert. Zum einen dient die PLA_2 zur Generierung von Lyso-Phospholipiden, die im Vergleich zu Phospholipiden verbesserte Eigenschaften wie z.B. Emulgieraktivität aufweisen (De Maria *et al*., 2007). Die durch die enzymatische Behandlung der Phospholipide entstandenen Lyso-Phospholipide müssen durch die Lebensmittelhersteller nicht extra als Zusatzstoffe deklariert werden und finden daher oft Anwendung als Ersatz für synthetische Emulgatoren, z.B. im Backwarenbereich. Darüber hinaus wird PLA_2 häufig in Lebensmitteln eingesetzt, die Phospholipide enthalten, wobei die Eigenschaften dieser Produkte durch eine *In-situ*-Modifizierung der Phospholipide durch das Enzym verändert werden können (De Maria *et al*., 2007). So ist die Applikation der PLA_2 zur Verbesserung der Entschleimung von pflanzlichen Ölen während des Raffinationsprozesses bekannt. Dabei können Lyso-Phospholipide aufgrund der höheren Polarität leichter als nicht modifizierte Phospholipide mit Wasser entfernt werden (Clausen, 2001). Auch über den Einsatz von Lyso-Phospholipiden im Mehl zur Verbesserung der Gashalte- bzw. Emulgiereigenschaften von Teigen oder über die enzymatische Modifizierung der Milchprodukte durch PLA_2, z.B. zur Steigerung der Käseausbeute, wurde berichtet (De Maria *et al*., 2007; Nielsen, 2000). Ferner können durch die Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs mit PLA_2 die technologischen Eigenschaften von Eigelb gezielt eingestellt werden.

2.3.2.2 Beeinflussung der Eigenschaften des Eigelbs durch Phospholipase A_2

Bei der enzymatischen Modifizierung der Phospholipide im Eigelb durch die PLA_2 können folgende Effekte erzielt werden: Erhöhung der Emulgieraktivität des Eigelbs (Mel'nikov, 2002; Daimer und Kulozik, 2009), Verbesserung der Hitzestabilität eigelbstabilisierter Emulsionen (Van Dam, 1974) und Erhöhung der Festigkeit der Emulsionen, wie z.B. Mayonnaise (Dutilh und Groger, 1981). Zwar wird PLA_2 bereits seit einigen Jahren in der Feinkostindustrie zur Verbesserung der Eigelbfunktionalität eingesetzt, doch ist zu den Ursachen und Mechanismen, die vor allem zur Hitzestabilität der aus PLA_2-modifizierem Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen führen, zurzeit relativ wenig bekannt.

Die Abspaltung der sn_2-Fettsäure des Phospholipids bewirkt eine Veränderung des Verhältnisses zwischen dem polaren und dem unpolaren Bereich des Moleküls. Die aus der enzymatischen Hydrolyse hervorgegangenen Lyso-Phospholipide haben eine deutlich

höhere Hydrophilität. So bewirkt z.B. die Hydrolyse bei Sojalecithin einen Anstieg des HLB-Wertes von 3 auf etwa 7 (Stephan, 1999). Das bedeutet, dass aus einem W/O- ein O/W-Emulgator entsteht. Auf der anderen Seite zeigte sich, dass das mittels PLA_2 modifizierte Eigelb eine deutlich veränderte Struktur aufweist, obwohl „nur“ die Phospholipide hydrolysiert wurden. So wiesen Daimer und Kulozik (2008) auf einen partiellen Aufbruch der Granulapartikel nach der enzymatischen Modifikation der Granulafraktion mittels PLA_2 hin, wodurch auch die Löslichkeit der Granulaproteine zunahm. Außerdem wurde festgestellt, dass dabei die Emulgierkapazität der Granula erhöht wird. Allerdings konnte die Hitzestabilität der aus Granula hergestellten O/W-Emulsionen durch die enzymatische Behandlung dieser Eigelbfraktion mit PLA_2 nicht verbessert werden (Buxmann ***et al***., 2008). Im Gegensatz dazu werden durch die PLA_2-Behandlung des Plasmas weder dessen Löslichkeit noch die Emulgieraktivität beeinflusst (Daimer und Kulozik, 2008). Auf der anderen Seite konnte Mine (1997) eine deutliche Verbesserung der Hitzestabilität der aus LDL hergestellten Emulsionen nach der enzymatischen Modifizierung mit PLA_2 zeigen. Bei Raumtemperatur konnte keine Strukturänderung der Apo-LDL durch PLA_2-Behandlung von LDL nachgewiesen werden. Allerdings wurde festgestellt, dass die Erhitzung der modifizierten LDL nur zu einem unwesentlichen Verlust der α-Helix-Konformation im Vergleich zu unbehandelten LDL führt. Es wurde angenommen, dass die exponierten Seitenketten von Apo-LDL Komplexe mit Lyso-Phospholipiden sowie freien Fettsäuen bilden. Diese Komplexe können demzufolge zur Erhöhung der thermischen Stabilität der Proteine und dadurch zur Hitzestabilität der LDL-stabilisierten Emulsion beitragen (Mine, 1997). Diese Annahmen wurden aber bisher noch nicht verifiziert. Darüber hinaus kann durch die Zugabe von PLA_2 die Gelbildung im Eigelb teilweise verhindert werden (Daimer und Kulozik, 2008). Van Dam (1974) behandelte die aus Eigelb und Milch isolierten Lipoproteine mittels PLA_2 aus Schweinepankreas, um daraus hitzestabile Emulsionen herzustellen. Dieser Effekt war nur dann zu erreichen, wenn Phospholipide und Proteine als Komplex vorlagen. Der Komplex blieb auch nach der Hydrolyse intakt. Die Zugabe von weiteren Lyso-Phospholipiden zum enzymbehandelten Protein-Phospholipid-Komplex führte dagegen zur Abnahme der Hitzestabilität (Van Dam, 1974). Zur Gewährleistung der Hitzestabilität der eigelbstabilisierten Emulsionen reichen bereits niedrige Hydrolysegrade von 10–15 %, wobei als Optimum ein Hydrolysegrad von 50–80 % angegeben wurde (Van Dam, 1974). Nachteilig auf die Produktqualität kann sich dagegen der bittere Beigeschmack, hervorgerufen durch die enzymatische Freisetzung von Fettsäuren, auswirken (Jaekel und Ternes, 2008).

2.3.2.3 Industrielle Nutzung der Phospholipase D

Zurzeit ist PLD vorwiegend für die pharmazeutische und kosmetische Industrie von Bedeutung (Guo *et al*., 2005). Dabei steht die ausgeprägte Transphosphatidylierungsfunktion des Enzyms zur Modifizierung der polaren Kopfgruppe in Phospholipiden im Vordergrund. Auf diese Weise können Phospholipid-Derivate mit spezifisch je nach Applikation eingestellten Eigenschaften hergestellt werden. Es lassen sich beispielsweise in der Natur selten vorkommende Phospholipide, wie Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylglycerol synthetisieren. So wird u.a. PS zur Darstellung von Liposomen genutzt, welche dann als Träger für Pharmazeutika dienen (Pisch-Heberle, 2000). Ferner kann Dihydroxyaceton nach einer Phosphatidylierung mit PLD als kosmetisches Präparat zur Selbstbräunung verwendet werden (Pisch-Heberle, 2000).

Im Lebensmittelbereich wird zurzeit über die Nutzung von PLD im Bereich *Functional Food* diskutiert (De Maria *et al*, 2007). So konnten beispielsweise für PS positive Effekte auf die kognitive Kapazität nachgewiesen werden (Suzuki *et al*., 2001). Dabei werden bereits einige Produkte auf dem Markt angeboten, die mit aus Soja-PC mittels PLD synthetisiertem PS angereichert sind (De Maria *et al*, 2007). Darüber hinaus existiert ein Patent, das verbesserte Gelbildungseigenschaften von phospholipidenthaltenden Produkten, wie Eigelb, nach einer Behandlung mit PLD beschreibt (Saitou *et al*., 1992). Eine Anwendung des in der Patentschrift von Saitou *et al*. (1992) beschriebenen Verfahrens in der Lebensmittelindustrie ist allerdings bis jetzt nicht bekannt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

2,2,2-Trimethylpentan	Riedel
2-Mercaptoethanol	Sigma
Aceton R	Merck
Aluminiumnitrat	Sigma
BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol)	Merck
Chloroform, p.a., ISO	Merck
Coomassie-Blue Tablette PhastGel R-350	Sigma
Cyclohexan	Merck
Essigsäure wasserfrei R (Ph. Eur.) 159520	Merck
Ethanol	Merck
Ether	Merck
Ethylacetat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	Sigma-Aldrich
Glycerin (plant, 99,5 %)	Serva
Glycin	Fluka
Harnstoff (EP-MB grade)	Roche Diagnostics
Hexan, p.a., ACS	Merck
Imidazol	Fluka
Kaliumhydroxidplätzchen (iso-Octan)	Riedel
Kaliumhydroxid	Merck
Kupfer(II)sulfat	Fluka
Laemmli-Fertig-Puffer	Bio-Rad
Miglyol 812 N	Sasol
Natriumcarbonat	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck

Natriumkaliumtartrat	Fluka
Natriumsulfat	Sigma
Natriumthiosulfatpentahydrat	Merck
Natronlauge	Merck
N-Methyl-*N*-trimethylsilyltriflouroacetamid (MSTFA)	Fluka
1-Propanol	Merck
ortho-Phosphorsäure (85%)	Merck
Petroleumbenzin	Riedel
Salzsäure (HCl)	Merck
Schwefelsäure	Merck
Seesand	Fluka
t-Butylmethylether	Fluka
Tetrahydrofuran	Merck
Trimethylsulfoniumiodid	Fluka
Tris	Roth

3.1.2 Standards

FFS-Standards	Sigma
MW-Marker Wide Range (6,5-205 kDa) (SDS-PAGE)	Sigma
PA, PC, PE, LPC, LPE-Standards (DC)	Sigma
Phosvitin (Eigelb)	Sigma

3.1.3 Weitere Materialien

Flüssigeigelb, pasteurisiert	Ovobest, Neuenkirchen-Vörden
Phospholipase A_2, Lecitase 10 L® (Schweine-pankreas)	Novozymes A/S
Phospholipase D (*Streptomyces chromofuscus*)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 555	Fluka
FITC	Fluka
SDS-PAGE Criterion Precast Gel 4-20 % tris-HCl	Bio-Rad
HPTLC-Platte Kieselgel 60 F_{254}, 20x10cm	Merck

3.1.4 Geräte und Hilfsmittel

Amino-SPE-Phase (Chromabond NH_2, 3 ml)	Macherey & Nagel
CD Spektrometer, Jasco J-810	JASKO Inc.
Chromatographieplatten-Tauchvorrichtung III (DC)	Camag
Digitalkamera D70	Nikon
Doppeltrog Entwicklungskammer (DC)	Camag
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Eppendorfpipetten (100 und 1000 µL)	Eppendorf
Extraktionseinheit B-815	Büchi
Fettbestimmungsgerät B-820	Büchi
Gaschromatograph mit FID HP 5890	Hewlett Packard
Gefriertrockner, Lyovac GT 3	Sorvall
Hamilton-Spritze 100 µl	Hamilton
He/Ne- und Ar-Ion-Lasersystem (für CLSM)	Melles Griot
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (ECLIPSE C1)	Nikon
Laborwaage, Mettler PE 3600	Delata Range
Laserbeugungsspektrometer (Mastersizer X)	Malvern
Lichtmikroskop	Letz
Magnetrührer MR 3001 K	Omnilab
Membranfilter (0,45 µm) RC-55	Schleicher & Schüll
Partikelladungsmessgerät CAS	emtec
pH-Meter 765 Calimatic	Kniek
Photometerküvetten	Hellma
Präzisionswaage	ABS Kern
Rasterelektronenmikroskop	JEOL
Rheometer AR 2000	TA Instruments
Rotationsverdampfer 011	Büchi
Rotationsviskosimeter Rheo-Logic MC 10	Anton Paar
Rührwerk RW 20 DZM A/LP/51	IKA
SDS-PAGE-Trennkammer (Mini Protean 3)	Bio-Rad
Spannungsmesser E 802 (SDS-PAGE)	Causort
SPE-Silica Kartusche Si 60®, LiChrolut	Merck
Spectrophotometer 931	Uvikon
Titrationsautomat Metrohm DMS Titrino 716	Metrohm

TLC-Applicator Linomat 5 (DC)	Camag
TLC Plate Heater III (DC)	Camag
TLC-Scanner 3 (DC)	Camag
Trockenschrank	Memmert
Tropfenvolumen Tensiometer DVT 10	Krüss
Ultraschallbad 8200	Branson
Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Wasserbad M3	MGW Lauda
Zentrifuge RC-58 (SA 600 Rotor)	Sorvall
Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat (30 ml)	Thermo

3.2 Charakterisierung der Inkubation des Eigelbs mit Phospholipasen

3.2.1 Inkubation des Eigelbs mit Phospholipasen

Phospholipase A_2

Die Inkubation des Eigelbs mit PLA_2 erfolgte unter den in der Lebensmittelindustrie bei der Verarbeitung von Eiprodukten üblichen Bedingungen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Bedingungen bei der Inkubation des Eigelbs mit PLA_2

Enzym	PLA_2 aus Schweinepankreas (Lecitase 10L®)
Enzymdosierung	110 Units pro g Eigelb
Hydrolysetemperatur	35 °C
pH	6,0-6,5 (natürlicher Eigelb-pH-Wert)
Dauer der Hydrolyse	8 h
Probenahme	0; 10; 30; 60;180 240; 480 min

Das pasteurisierte Flüssigeigelb wurde in ein Becherglas eingewogen und unter Rühren (RW 20 DZM A/LP/51, IKA, Staufen) bei einer Drehzahl von 50 min^{-1} im Wasserbad auf 35 °C eingestellt. Anschließend wurde Eigelbmaterial als Nullprobe entnommen. Daraufhin erfolgte unter Rühren innerhalb einer Minute die tropfenweise Zugabe von 0,8 g des Enzympräparats und nach 10 min die Entnahme der ersten Probe. Im weiteren Verlauf wurden unter Einhaltung der gewählten Inkubationstemperatur und bei Fortsetzung des Rührvorgangs weitere Proben entnommen. Um die Inkubation sofort abzubrechen, wurden die entnommenen Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Phospholipase D

Die Bedingungen bei der Inkubation des Eigelbs mit PLD sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Bedingungen bei der Inkubation des Eigelbs mit PLD

Enzym	PLD aus *Streptomyces Chromofuscus*
Enzymdosierung	57,8 Units pro g Eigelb
Temperatur	50 °C
pH	natürlicher pH im Eigelb (6,0-6,5)
Dauer der Inkubation	6 h
Probenahme	0; 60; 120; 240; 360 min

Aufgrund der deutlichen Zunahme der Viskosität während der Inkubation mit PLD wurde das Eigelb vor der Enzymzugabe mit entmineralisiertem Wasser verdünnt (70 % v/v). Die zugegebene Enzymmenge richtet sich mit 57,8 Units/g Eigelbsuspension nach dem Phospholipidgehalt und beträgt demnach 750 Units pro g PC und PE. Der Vorgang der Probeentnahme entspricht dem Ablauf, der für die PLA_2-Inkubation beschrieben wurde.

3.2.2 Messung des Hydrolysegrades mittels dünnschichtchromatographischer Quantifizierung der Phospholipide und Lysophospholipide

3.2.2.1 Extraktion der Phospholipide aus der Eigelbmatrix

Die Extraktion der Phospholipide erfolgte in Anlehnung an die von Descalzo *et al.* (2003) beschriebene Methode. Zuerst wurden 1,5 g gefriergetrocknetes Eigelb mit 12,5 ml Chloroform/Methanol (2/1, v/v) (nach Folch *et al.,*1956) versetzt. Um Oxidationsreaktionen zu vermeiden, wurden dem Lösungsmittel 0,02% BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol) als Antioxidationsmittel zugesetzt. Diese Mischung wurde 10 min lang homogenisiert (Vortex) und anschließend über einen Rundfilter filtriert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Rückstand wurde verworfen. 1 ml der organischen Phase wurde anschließend in ein Vial überführt und ausgewogen. Danach wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt und der Lipidextrakt in 1 ml Chloroform aufgenommen. Der extrahierte Lipidextrakt wurde auf die Normalphase Silica Kartuschen (LiChrolut Si 60®, 500 mg; Merck) aufgebracht. Diese wurden vorher mit 20 ml Chloroform vorkonditioniert. Danach erfolgte die Elution der Neutrallipide mit 20 ml Chloroform und die Elution der Glycolipidfraktion mit 5 ml Aceton. Diese wurden nach dem Durchlaufen der Säule verworfen. Anschließend wurde die Phospholipidfraktion mit 20 ml Methanol eluiert. Die Methanolfraktion mit den darin enthaltenen Phospholipiden wurde unter Stickstoff bei

40 °C (Wasserbad) getrocknet und in 1 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wurde in einem Analytik-Vial bei –70 °C gelagert.

3.2.2.2 Dünnschichtchromatographie

Probenvorbereitung:

Die Phospholipidextrakte wurden zunächst 1:5 und 1:50 verdünnt. Anschließend wurde, ausgehend von den zu erwarteten Phospholipidgehalten externe Mischstandardlösungen (PC, PE, LPC, LPE und PA) in 6 verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 7,8 bis 250 µg/ml erstellt. Als Lösungsmittel diente in beiden Fällen das Chloroform/Methanol/Wasser-Gemisch (2/1/0,1, v/v/v). Das Fließmittel setzte sich in Anlehnung an die Methode von Helmerich und Köhler (2002) aus Ethylacetat/Chloroform/1-Propanol/Methanol/0,25 %ige wässrige Kaliumchloridlösung (25/25/25/12/9, v/v/v/v/v) zusammen. Es wurden ca. 48 ml Laufmittel mit den oben genannte Proportionen hergestellt und etwa 30 min vor der Entwicklung in die Doppeltrogkammer (Camag, Zürich) gegeben. Zur besseren Sättigung wurde die Vorderwand der Kammer mit Filterpapier ausgekleidet.

Trennung:

Je 5 µL der Probelösung bzw. Standardlösung wurden auf die zuvor etwa 30 min lang im Trockenschrank bei 50 °C getrocknete HPTLC-Platte (Kieselgel 60 F_{254}, 20x10cm, Merck) mit Hilfe des Linomat 5® (Camag, Schweiz) aufgetragen. Die Bandenbreite betrug 4 mm. Der Abstand zum Plattenrand betrug 15 mm. Der Abstand zwischen den Banden sowie das Auftragen der Probenlösungen wurde mit der Software winCATS® (Camag, Schweiz) am PC programmiert und gesteuert. Anschließend wurde die HPTLC-Platte in der Doppeltrogkammer über eine Trennstrecke von 9 cm linear aufsteigend einfach chromatographiert. Die Entwicklung dauerte ca. 35 min. Nach der Entwicklung wurde das Lösungsmittel 10 min lang unter dem Abzug und 5 min auf einer Heizplatte bei 180 °C abgedampft.

Detektion:

Zur Herstellung des Detektionsmittels wurden 25,8 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 400 ml Wasser gelöst, unter Rühren 80,4 g 85 %ige o-Phosphorsäure zugegeben und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Über eine Tauchvorrichtung (Camag, Schweiz) wurde das Detektionsmittel auf die HPTLC-Platten gebracht. Die Verweilzeit der Platte im Detektionsmittel betrug 3 s. Zur Entwicklung der Spots wurden die HPTLC-Platten etwa 15 min auf

einer Heizplatte bei 180 °C erhitzt, bis hell- bis dunkelbraune Flecken deutlich zu sehen waren.

Auswertung:

Zur Quantifizierung der Platten wurde der Camag-Scanner TLC 3 genutzt. Die Messung erfolgte mittels einer Wolfram-Lampe bei λ=400 nm. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen der einzelnen Substanzen, mit Hilfe der Software winCATS® (Camag). Aus den ermittelten Peakflächen der Standards wurde für jede Substanz eine Kalibrierkurve erstellt und daraus die jeweilige Konzentration der Probe (unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen) ermittelt. Die Identifizierung einzelner Phospholipidbanden in der Probe erfolgte durch den Vergleich der dazugehörenden R_f-Werte der Banden im Standard (Tabelle 3.3)

Tabelle 3.3: Rf-Werte von LPC, PC, LPE, PA und PE

Phospholipide	R_f-Werte
Lyso-Phosphatidylcholin (LPC)	0,07
Phosphatidylcholin (PC)	0,17
Lyso-Phosphatidylethanolamin (LPE)	0,26
Phosphatidsäure (PA)	0,43
Phosphatidylethanolamin (PE)	0,46

3.3 Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Eigelbs

3.3.1 Fraktionierung des Eigelbs

3.3.1.1 Trennung von Granula und Plasma

Um bei der Untersuchung der Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE die einzelnen aufgetrennten Proteinbanden identifizieren zu können, wurde zunächst eine Fraktionierung des Eigelbs in dessen Fraktionen Granula und Plasma vorgenommen. Die Fraktionierung des Eigelbs erfolgte in Anlehnung an Mc Bee und Coterill (1979). Anschließend wurden die primären Eigelbfraktionen Granula und Plasma noch weiter in deren Bestandteile aufgetrennt.

Durchführung:

Zunächst wurde Eigelb mit 0,17 M NaCl–Lösung (2:1 w/w) verdünnt und 1h bei 4 ˚C langsam gerührt. Danach wurde die Eigelbsuspension 45 min bei 10 ˚C mit 10000 min^{-1} zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Sorvall). Der erhaltene Überstand (Plasma) wurde abde-

kantiert und um das Plasma von Granulapartikeln vollständig zu trennen erneut 45 min bei 10 ˚C mit 10000 min^{-1} zentrifugiert. Das Präzipitat (Granula) wurde gesammelt, noch einmal mit der NaCl–Lösung (0,17 M) verdünnt und 1 h bei 4 ˚C gerührt. Anschließend wurde die gewaschene Granulafraktion mittels Zentrifugation (erneut 45 min bei 10 ˚C mit 10000 min^{-1}) vom Restplasma getrennt.

3.3.1.2 Auftrennung der Granulafraktion

In Anlehnung an die Methode von Guilmineau *et al.* (2005) wurde die gewaschene Granulafraktion in der 10-fachen Menge (volumenbezogen) NaCl–Lösung (0,8 M) gelöst und 1 h bei 20 °C leicht gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Dialyseschläuche (Porenweite 12-14 kDa) gefüllt und über Nacht unter leichtem Rühren gegen bi-dest. Wasser dialysiert (siehe auch 3.3.1.4). Nach der Dialyse wurde die entsalzte Suspension 30 min mit 10000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand, der Phosvitin enthielt, wurde abdekantiert und bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt. Das Präzipitat enthielt HDL der Granulafraktion. Es wurde ebenfalls bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.1.3 Auftrennung der Plasmafraktion

Die NaCl-Konzentration der Plasmafraktion (des Überstandes) wurde zunächst auf 1,7 M erhöht. Danach wurde die Lösung 3 h mit 70000 min^{-1} bei 10 °C zentrifugiert, wobei sich die Plasmafraktion in drei Schichten auftrennen ließ (Bild 3.1).

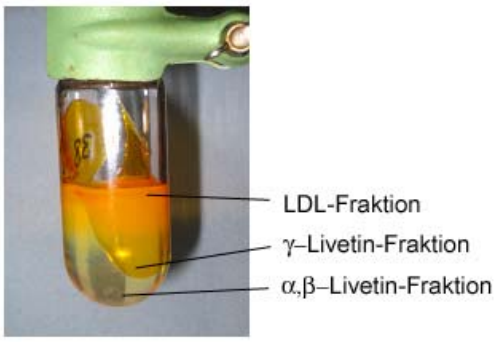


Bild 3.1: Fraktionen des Plasmas nach der Zentrifugation.

Die obere, flotierende Schicht (LDL-Fraktion) wurde in einer 1,7-molaren NaCl-Lösung suspendiert und noch einmal unter gleichen Bedingungen (3 h, 10 °C, 70000 min^{-1}) zentrifugiert. Es ergab sich eine Auftrennung wie im Bild 3.1 dargestellt ist. Die gewaschene LDL-Fraktion wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gegen bi-dest. Wasser

dialysiert. Die entsalzte LDL-Fraktion wurde bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt.

Die klebrige transparente Schicht (enthält γ-Livetine) wurde mit 1,7 M NaCl-Lösung versetzt und 3 h mit 70000 min^{-1} bei 10 °C ultrazentrifugiert, danach über Nacht bei 4 °C gegen bi-dest. Wasser dialysiert. Die entsalzte γ-Livetin-Fraktion wurde bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt.

Die LDL-freie, leicht gelbliche Fraktion (enthält α- und β-Livetine) wurde mit einer NaCl-Lösung (1,7 M) versetzt und bei gleichen Bedingungen (3 h mit 70000 min^{-1} bei 10 °C) zentrifugiert. Die so erhaltene klare untere Schicht wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gegen bi-dest. Wasser dialysiert. Die entsalzten α- und β-Livetin-Fraktionen wurden bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.1.4 Dialyse

Vorbereitung der Dialyseschläuche:

Die Dialyseschläuche sind getrocknet und enthalten Spuren von Schwermetallen. Vor der Benutzung müssen sie deshalb in einer EDTA-Lösung gekocht werden. Dazu wurden 1 l der EDTA-Lösung (0,5 M) auf einer Heizplatte zum Kochen gebracht. Die Dialyseschläuche wurden in etwa 7-10 cm lange Stücke geschnitten und in die kochende EDTA-Lösung gegeben. Die Schläuche wurden für 30 min unter ständigem Rühren gekocht. Anschließend wurde die EDTA-Lösung dekantiert und die Schläuche gut mit dest. Wasser durchspült.

Durchführung:

Die Dialyseschläuche wurden durch einen Knoten am unteren Ende verschlossen. Die zu dialysierenden Fraktionen wurden mit einer Pasteurpipette in die Schläuche gefüllt. Anschließend wurden die Schläuche ins bi-dest. Wasser überführt. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter leichtem Rühren.

3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.3.2.1 Entfettung der Proben

Aufgrund des hohen Lipidgehalts neigen das Eigelb sowie dessen Fraktionen Granula und Plasma dazu, während der gelelektrophoretischen Auftrennung zu „schmieren". Dadurch wird eine qualitative Auswertung der einzelnen Proteinbanden erheblich erschwert. Aus diesem Grund wurden das Eigelb und die Fraktionen vor der gelelektrophoretischen Auftrennung in Anlehnung an Guilmineau *et al.* (2005) entfettet.

Durchführung:

Zu den Eigelbproben bzw. deren Fraktionen wurde etwa die 10-fache Menge (volumenbezogen) Aceton hinzugegeben und 1h bei 4 °C langsam gerührt. Anschließend wurden die entfetteten Proteine mittels einer Vakuumpumpe durch einen Membranfilter (Schleicher & Schüll, Dassel) mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert. Das Restlösungsmittel wurde unter Stickstoffstorm entfernt. Die Trocknungszeit betrug etwa 30 min. Die entfetteten und getrockneten Proteinfraktionen wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C aufbewahrt.

3.3.2.2 SDS-PAGE

Prinzip:

Mittels SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Spannungsfeld getrennt. Die Auftrennung erfolgt anhand der Molekülmassen und der Ladung der Proteine. Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz. Dieses denaturiert und entfaltet teilweise Proteine. Dabei wird deren Eigenladung überlagert (maskiert). Die Anlagerung und damit auch die Anzahl der negativen Ladungen ist allein von der Größe des Proteins abhängig, so dass die Trennung nicht von Eigenladung und Tertiärstruktur abhängig ist. Zusätzlich kann eine vollständige Entfaltung und Spaltung von Disulfidbrücken durch ein Reduktionsmittel wie z.B. 2-Mercaptoethanol erreicht werden.

Probenvorbereitung:

Zur Herstellung des Probenpuffers wurden 150 µl 2-Mercaptoethanol in ein Vial gegeben und auf 3000 µl mit Laemmli-Fertig-Puffer (Bio-Rad, München) (enthält: 62,5 mM Tris–HCl; pH 6,8; 25 % Glycerol; 2 % SDS; 0.01 % Bromphenol blau) aufgefüllt. Für die SDS-

PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde auf das 2-Mercaptoethanol verzichtet. Als nächstes wurden in die Lösung 1,081 g Harnstoff gegeben. Das Vial wurde solange geschüttelt, bis sich der gesamte Harnstoff gelöst hatte. Schließlich wurden je 2 mg der jeweiligen entfetteten Proteinfraktion in e-cups eingewogen und mit 500 ml Probenpuffer verdünnt. Die verdünnten Proben wurden 5 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend in der Eppendorfzentrifuge bei 10000 min^{-1} 5 min zentrifugiert. Zum Auftragen auf das Gel wurde der Überstand verwendet.

Auftragen der Proben:

Zur Herstellung des Elektrodenpuffers wurden 12,1 g Tris, 7,5 g Glycin und 1 g SDS in einen Glasbehälter mit Schraubverschluss gegeben und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der Elektrodenpuffer muss bis zur Benutzung bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Trennkammer (Bio-Rad, München) wurde mit dem Elektrodenpuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Als nächstes wurde das Gradientengel 4-20 % tris-HCl (Bio-Rad, München) in die Trennkammer eingesetzt. Die Taschen des Gradientengels wurden mit Elektrodenpuffer unter Zuhilfenahme einer Einwegspritze durchgespült. Anschließend wurden 20 µl Probe in jede Tasche gegeben. Zur Bestimmung der Molekülmassen wurde in die erste Geltasche ein Molekularmarker (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einem MW-Bereich von 6,5 bis 205 kDa gegeben.

Auftrennung:

Die Auftrennung der entfetteten Proben erfolgte unter den in Tabelle 3.4 aufgeführten Bedingungen:

Tabelle 3.4: Laufbedingungen der SDS-PAGE

	Zeit / min	Spannung / V	Stromstärke / mA
Sammeln	10	200	100
Trennen	45	200	60

Gelfärbung/Entfärbung:

Nach dem Auftrennen wurde das Gel aus der Gelkassette entnommen und mit Coomassie-Blau-Färbelösung angefärbt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden die Coomassie-Blau-Stammlösung und die Entfärbelösung im Verhältnis 1:9, v/v miteinander gemischt. Zur Sichtbarmachung des Phosvitins, welches mit Coomassie-Blau nicht ohne weiteres angefärbt werden kann, wurde Al-Nitrat zur Färbelösung hinzugegeben und die Konzentration auf 0,1 M eingestellt. Die verwendeten Lösungen sind im einzelnen:

Stammlösung: 1 Tablette PhastGel Blue R-350 wurde in 80 ml Milli-Q gelöst und 10 min heftig gerührt. Danach wurden 120 ml Methanol zugegeben und gerührt bis die Tablette gelöst war. Anschließend wurde die Lösung filtriert.

Entfärbelösung: Methanol/Essigsäure/Milli-Q (30/10/60 v/v/v)

Färbelösung: Stammlösung/Entfärbelösung (1:9, v/v)

Das Gel wurde unter leichtem Schütteln in der Schütteltruhe (ca. 40 U/ min^{-1}) bei 35 °C 2 h gefärbt. Nach dem Färbevorgang wurde wieder über Nacht entfärbt, bis die Proteinspots sichtbar waren. Die Entfärbelösung wurde dabei unter Umständen mehrfach gewechselt.

Trocknung der Gele:

Um die entsprechenden Gele besser aufbewahren zu können, wurden diese in einer Lösung aus Methanol/Glycerin/Milli-Q (30/3/67 v/v/v) 10 min bei 35 °C in der Schütteltruhe leicht geschüttelt und anschließend auf einer Heizplatte mit eingebauter Vakuumpumpe 2 h getrocknet.

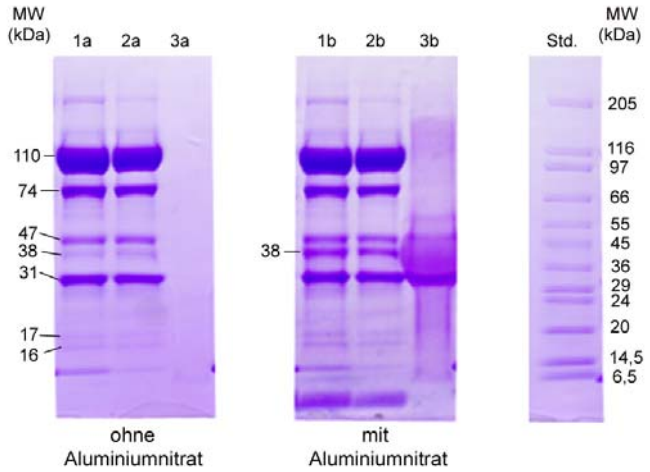
3.3.2.3 Identifizierung einzelner Eigelbproteine

Die einzelnen Eigelbproteine wurden anhand der Molekülmassen, die mit Hilfe des mitgelaufenen Molekularmarkers ermittelt wurden, und durch einen Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen, identifiziert.

Granulaproteine:

Diese Granula-Unterfraktionen wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen untersucht (nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol). Als besonders schwierig erwies sich die Identifizierung des Phosvitins. Dabei handelt es sich um ein Membranprotein mit einer hohen negativen Ladungsdichte, hervorgerufen durch eine beträchtliche Anzahl von Phosphoserinresten. Aus diesem Grund war eine Detektion mit der herkömmlichen Coomassie-Blau-Färbung nicht möglich, da diese nur zu basischen Aminosäuren eine Affinität zeigt. Durch die Zugabe von Al-Nitrat (s.o.) zur Coomassie-Blau-Färbelösung und die damit verbundene Überlagerung der negativen Ladung der Phosphoserinreste durch Al^{3+}-Ionen konnten auch die Phosvitin-Banden sichtbar gemacht werden (Hegenauer *et al.*, 1977). Gleichzeitig konnte dieser Effekt zur

Bestimmung der Molekülmasse des Phosvitin genutzt werden, in dem die entsprechenden Gele vor und nach der Zugabe von Aluminiumnitrat miteinander verglichen wurden. Das Ergebnis der SDS-PAGE der Granulafraktion und die entsprechenden Bezeichnungen und Molekülmassen sind im Bild 3.2 dargestellt.

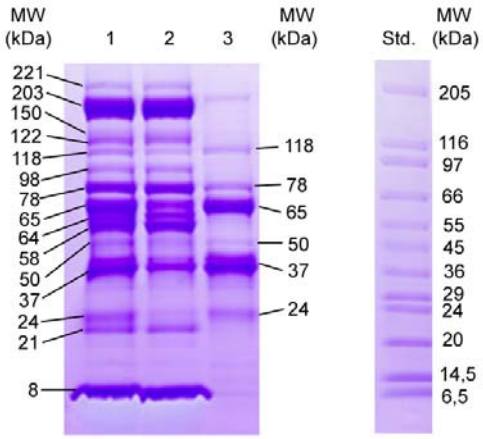


MW (kDa)	Protein-bezeichnung
110	Apo-HDL
74	Apo-HDL
47	Apo-HDL
38	Phosvitin
31	Apo-HDL
17	Apo-HDL
16	Apo-HDL

Bild 3.2: Reduzierende SDS-PAGE der entfetteten Granulaproteine. (1a) Granula; (2a) HDL-Fraktion; (3a) Phosvitin (selbst isoliert), gefärbt mit Coomassie-Blau-Färbelösung. (1b) Granula; (2b) HDL-Fraktion; (3b) Phosvitin (selbst isoliert), das selbe Gel mit Zusatz von 0,1 M $Al(NO_3)_3$ zur Coomassie-Blau-Färbelösung.); Std.: Molekulargewichtsmarker; MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton. Die entsprechenden Bezeichnungen sind in der Tabelle (rechts) dargestellt.

Plasmaproteine:

Das Ergebnis der SDS-PAGE der Plasmafraktion und die entsprechenden Bezeichnungen und Molekülmassen sind im Bild 3.3 dargestellt.



MW (kDa)	Protein-bezeichnung
221	Apo-LDL
203	Apo-LDL
150	Apo-LDL
122	Apo-LDL
118	γ-Livetin
98	Apo-LDL
78	α-Livetin
65	γ-Livetin
64	Apo-LDL
58	Apo-LDL
50	α-Livetin
37	β-Livetin
24	β-Livetin
21	Apo-LDL
8	Apo-LDL

Bild 3.3: Reduzierende SDS-PAGE der entfetteten Plasmaproteine. (1) Plasma; (2) LDL-Fraktion des Plasmas; (3) α,- β- und γ-Livetin-Fraktion des Plasmas. Std.: Marker; MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton. Die entsprechenden Bezeichnungen sind in der Tabelle (rechts) dargestellt.

3.4 Methoden zur Charakterisierung des Eigelbs

3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (JEOL, Japan) mit Cryopräparation wurde benutzt, um die Mikrostruktur des Eigelbs sowie dessen Fraktionen Granula und Plasma zu visualisieren.

Dazu wurden jeweils ca. 1,5 µl Probe in unterkühltem flüssigen Stickstoff eingefroren. Der dabei auftretende Temperaturgradient von ca. 20000 K/min bewirkte, dass die entstehenden Eiskristalle nur wenige nm groß und somit sehr viel kleiner als die sichtbaren Strukturelemente waren. Die in der Probe nach dem Einfrieren vorliegende Viskosität von ca. 10^6 Pas verhinderte zudem einen Stofftransport innerhalb der Präparations- und Untersuchungszeit, so dass im untersuchten Vergrößerungsbereich der REM nicht mit Artefakten zu rechnen war. Im Anschluss an das cryogene Einfrieren wurde die Probe bei -180 °C gebrochen und das Wasser an der Probenoberfläche bei -40 °C durch Sublimation entfernt. Anschließend wurde die Probe mit Gold besputtert und bei -180 °C im REM untersucht. Bei der Untersuchung wurde die Probenoberfläche mit einem energiereichen Elektronenstrahl in einem isometrischen Muster abgerastert. In Abhängigkeit von der Oberflächentopographie erzeugten die an der Probe reflektierten Elektronenstahlen entsprechend dem Abtastraster ein Bild, das elektronisch gespeichert wurde und visuell bewertet werden konnte.

3.4.2 Circulardichroismus

Prinzip:

Mittels der Circulardichroismus-(CD)-Spektroskopie ist es möglich, die Sekundärstruktur der Proteine bzw. ihre Veränderung zu ermitteln. Das Prinzip der CD-Messung basiert darauf, dass lins und rechts zirkular-polarisiertes Licht beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium unterschiedlich stark absorbiert wird. Aus diesem Grund weisen asymetrische und optisch aktive Moleküle, wie z.B. Proteine unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links und rechts-zirkular polarisiertes Licht auf. Bei der CD-Spektroskopie wird folglich der Unterschied zwischen den beiden Koeffizienten gemessen. Die Sekundärstruktur der jeweiligen Probe kann anhand des Vergleichs mit Modellsubstanzen berechnet werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von

empirischen Methoden auch den Anteil der jeweiligen Sekundärstruktur (α-Helix, β-Faltblatt oder Random Coil) der zu messenden Probe zu berechnen.

Probenvorbereitung:

Um den Einfluss der Erhitzung auf die Sekundärstruktur der Eigelbproteine zu ermitteln, wurden sowohl nicht erhitztes als auch ein bei 75 °C bzw. 85 °C erhitztes Eigelb mittels CD-Spektroskopie untersucht. Vor der thermischen Behandlung wurden alle Eigelbproben mit 30 % dest. Wasser verdünnt. Die thermische Behandlung des Eigelbs erfolgte in Edelstahlröhrchen (Länge: 15 cm; Innendurchmesser: 1,3 cm; Wandstärke: 2 mm). Die Röhrchen wurden mit 20 ml Eigelbsuspension gefüllt und in einem Wasserbad, das eine um 5 °C höhere Temperatur, d.h. 80 °C bzw. 90 °C als die vorgesehene Behandlungstemperatur aufwies, für 3 min aufgeheizt. Die Aufheizdauer wurde dabei in Vorversuchen ermittelt. Die erforderliche Temperatur von 75 °C bzw. 85 °C wurde nach 3 min erreicht. Anschließend wurden die Edelstahlröhrchen mit den Eigelbproben in ein weiteres Wasserbad mit 75 °C bzw. 85 °C überführt. Die Haltezeit betrug 7 min. Nach Ablauf der Haltezeit wurden die Röhrchen im Eisbad rasch auf 7 °C abgekühlt.

CD-Messung:

Vor der Aufnahme des CD-Spektrums wurden die zu messenden Proben mit dest. Wasser auf eine Proteinkonzentration von etwa 0,1 mg/ml verdünnt. Die CD-Spektren wurden mit dem Jasco J-810 CD Spektrometer (JASKO Inc., Easton, MD, USA) in einer 0,02 cm Quarzglasküvette bei Raumtemperatur aufgenommen. Die eingestellten Parameter waren wie folgt: Scan-Geschwindigkeit: 50 nm/min, Bandbreite: 1 nm; ein Messpunkt pro 0,2 nm; Zeitkonstante: 1 s; Wellenlängenbereich: 350-190 nm; Akkumulierung von 3 Wiederholungen. Quantitative Sekundärstrukturanalyse erfolgte mittels der Software CDNN (nach Böhm *et al*., 1992).

3.4.3 Rheologische Charakterisierung des Eigelbs

Die Veränderung der rheologischen Eigenschaften des Eigelbs während der Inkubation mit PLD wurde anhand der Veränderung der scheinbaren Viskosität charakterisiert. Die Messung erfolgte mittels des Rotationsviskosimeters Rheo-Logic MC 10 (Anton Paar, Stuttgart) mit einem standardmäßigen Zylindersystem Z2 (DIN 53109). Die Messung wurde sofort nach der Enzymzugabe gestartet (vgl. 3.2.1) und dauerte 6 h bei 50 °C und einer konstanten Scherrate von 20 s^{-1}.

3.4.4 Bestimmung der dynamischen Grenzflächenspannung

Prinzip:

Gemessen wird die Tropfenanzahl, in die sich ein vorgegebenes Flüssigkeitsvolumen teilt. Das Tropfentensiometer misst die dynamische Grenzflächenspannung an der Phasengrenzfläche flüssig/flüssig, während neue Grenzflächen gebildet werden. Dynamisch bedeutet hier, dass die Bestimmung der Grenzflächenspannung in Abhängigkeit vom Grenzflächenalter erfolgt.

Durchführung:

Die Messung der dynamischen Grenzflächenspannung erfolgte mittels des Tropfenvolumen Tensiometers DVT 10 (Krüss GmbH, Hamburg). Untersucht wurde, inwiefern sich das Grenzflächenverhalten des Eigelbs bzw. seiner grenzflächenaktiven Substanzen als Ganzes, durch Modifizierung mit PLA_2 sowie PLD ändert. Die leichtere Phase (Miglyol 812 N, Sasol) wurde in die schwerere Phase (wässrige Eigelbsuspension, 0,5 % w/w) mit jeweils definiertem Volumenstrom gepumpt und die Zeit des Wachstums des Tropfens bis zum Ablösen von der Kapillare gemessen. Das Volumen des Tropfens ist dabei direkt zur Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen (Öl/Eigelbdispersion) proportional. Zur Ermittlung des Tropfenvolumens wird die Zeit zwischen den einzelnen Öltropfen, die während der Aufwärtsbewegung eine Lichtschranke passieren, bestimmt und ins Verhältnis zum jeweiligen Volumenstrom gesetzt. Die Grenzflächenspannung (σ_i) wird entsprechend Gleichung (3.1) ermittelt. Das Volumen der einzelnen Tropfen wird durch Messung der Zeit V=0 bis zum Tropfenabriss bei bekannter Flussrate des Öls bestimmt.

$$\sigma_i = \frac{V_{Tropfen}(\rho_H - \rho_L)g}{\pi \cdot d} \tag{3.1}$$

ρ_H: Dichte der wässrigen Phase; ρ_L: Dichte der Ölphase; $V_{Tropfen}$: Tropfenvolumen; d: Kapillardurchmesser; g: Erdbeschleunigung

3.5 Charakterisierung der aus Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen

3.5.1 Herstellung der Emulsionen

3.5.1.1 Emulsionen aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb

Zur Charakterisierung der Emulgiereigenschaften des Eigelbs wurden O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil hergestellt. Die Standardisierung der Emulsionen erfolgte über den Proteinanteil in der wässrigen Phase, der 2 %, 1 %, 0,5 % und 0,1 % betrug. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Emulsion in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase ist Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus unbehandeltem sowie PLA_2-behandeltem Eigelb

Komponenten	Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion			
	2 %	1 %	0,5 %	0,1 %
Eigelb	13,13 g	6,56 g	3,28 g	0,66 g
NaCl-Lösung (0,15 M; pH7)	81,37 g	87,94 g	91,20 g	93,84 g
Miglyol 812 N	40,50 g	40,50 g	40,50 g	40,50 g

3.5.1.2 Emulsionen aus Eigelb nach Zusatz von Lyso-Phospholipiden

Isolierung von Lyso-Phospholipiden aus Eigelb:

Ein Teil Flüssigeigelb wurde mit zwei Teilen Aceton (v/v) versetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über einen Rundfilter gegeben und mit der 6-fachen Menge an Aceton gewaschen. Der so gewonnene Rückstand (Extrakt) wurde nach 10 min Trocknung in Ethanol suspendiert. Nach 1 h auf dem Magnetrührer wurde die Suspension über zwei Faltenfilter filtriert und das Filtrat (Ethanol mit dem darin gelöstem Eigelblecithin) aufgefangen. Anschließend wurde Ethanol mittels eines Rotationsverdampfers bei 40 °C und unter Vakuum entfernt.

Zusammensetzung von Emulsionen:

Die Standardisierung dieser Emulsionen erfolgte über den Phospholipidgehalt in der wässrigen Phase. Dieser betrug jeweils 1,5 %. Die genauer Zusammensetzung der Emulsionen sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb nach Zusatz von Lyso-Phospholipiden in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion

Komponenten	Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion		
	1 %	0,5 %	0,1 %
Eigelb	6,56 g	3,28 g	0,66 g
Lyso-Phospholipide	0,76 g	1,13 g	1,43 g
NaCl-Lösung (0,15 M; pH7)	81,37 g	91,20 g	93,84 g
Miglyol 812 N	40,50 g	40,50 g	40,50 g

3.5.1.3 Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb

Da das Eigelb vor der Inkubation mit PLD mit dest. Wasser verdünnt wurde (vgl. 3.2.1), musste die Rezeptur der Emulsionen dementsprechend angepasst werden. Die genaue Zusammensetzung der Emulsionen ist Tabelle 3.7 zu entnehmen

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion

Komponenten	Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion			
	2 %	1 %	0,5 %	0,1 %
Eigelbsuspension	18,76 g	8,75 g	4,37 g	0,88 g
NaCl-Lösung (0,15 M; pH7)	75,74 g	85,75 g	90,11 g	93,62 g
Miglyol 812 N	40,50 g	40,50 g	40,50 g	40,50 g

3.5.2 Bestimmung der spezifischen Grenzfläche

Die Öltropfengrößenverteilung und die spezifische Grenzfläche der Emulsionen wurden mit Hilfe des Laserbeugungsspektrometers Malvern Mastersizer X (Malvern) bestimmt. Das Messprinzip der Laserbeugungsspektroskopie ist zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilung gut geeignet, da die Öltropfen aufgrund der Minimierung der freien Oberflächenenergie in Kugelform vorliegen. Die Emulsion wurde vor der Messung in einem polaren Medium (tetra-Natriumpyrophosphatlösung) im Verhältnis von ca. 1:20.000 verdünnt. Die spezifische Grenzfläche der Öltropfen $A_{0,sp}$ wurde nach der Gleichung (2.2, siehe Kapitel 2.1) berechnet. Dabei bedeutet eine große spezifische Grenzfläche eine Emulsion mit kleinen Öltropfen und umgekehrt.

3.5.3 Wärmebeanspruchung der Modellemulsion

Die Erhitzung der Emulsionen erfolgte bei 75 °C bzw. 85 °C. Das Ziel dieser Untersuchung war die Prüfung der Wärmestabilität der aus den jeweiligen Eigelbprodukten hergestellten Emulsionen. Dazu wurden jeweils 20 ml der Emulsionen in ein Glasröhrchen

(Länge: 15,5 cm; Innendurchmesser: 1,5 cm) überführt und 3 min im Wasserbad, das eine um 5 °C höhere Temperatur (80 °C bzw. 90 °C) als die angestrebte Erhitzungstemperatur aufwies, aufgeheizt. Nach Ablauf von 3 min (die Aufheizzeit wurde experimentell ermittelt (Bild 3.4)), wurde das Glasröhrchen ins Wasserbad mit 75 °C bzw. 85 °C überführt. Die Haltezeit betrug 7 min, das Glasröhrchen wurde anschließend im Eiswasser gekühlt. Während des gesamten Erhitzungsvorganges wurde die tatsächliche Kerntemperatur mittels eines Thermofühlers (P 300 W, Omnilab, Bremen) verfolgt. Bild 3.4 zeigt beispielhaft den Temperatur-Zeit-Verlauf in der Emulsion während der Aufheizphase in einem auf 90 °C temperierten Wasserbad. Bereits nach 3 min wird die erforderliche Temperatur von 85 °C erreicht.

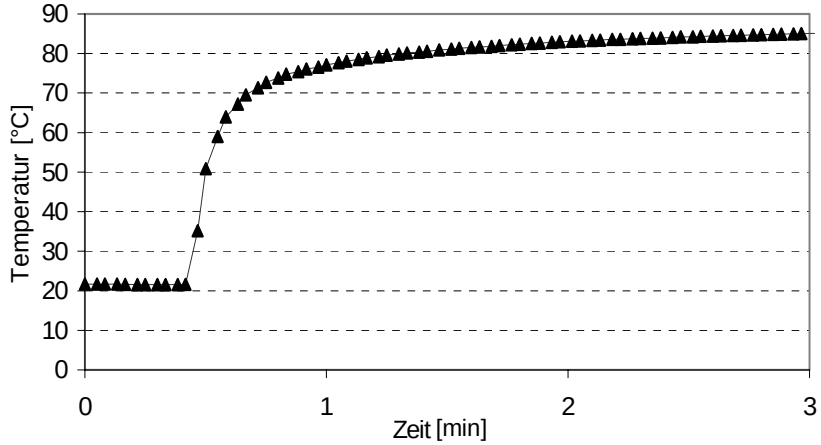


Bild 3.4: Temperatur-Zeitlauf während der Wärmebehandlung der Modellemulsion (90 °C Wasserbadtemperatur).

Nach der Wärmebeanspruchung wurden die Emulsionen bezüglich der spezifischen Grenzfläche untersucht (siehe 3.5.2). Zusätzlich wurde dabei der Grad der Flockung der Tropfen bestimmt. Dazu wurden die wärmebehandelten Emulsionen vor der Messung mittels Laserbeugung mit einer 1 %-igen SDS-Lösung (1:20 w/w) verdünnt. Auf diese Weise werden nichtkovalente Bindungen der Proteinaggregate gespalten, so dass die tatsächliche Größe der nicht geflockten Tropfen ermittelt werden kann.

3.5.4 Untersuchung der Grenzflächenbelegung

3.5.4.1 Auftrennung der kontinuierlichen und der dispersen Phasen

Die Abtrennung der Öltropfen mit den entsprechenden Grenzflächen (disperse Phase) von der wässrigen Phase erfolgte durch Zentrifugation (Zentrifuge RC-58 mit SA 600 Rotor, Sorvall) von 30 g Emulsion bei 10.000 g für 30 min bei 20 °C. Die abgesetzte

wässrige Phase wurde abgeschöpft und die Sahneschicht mit 10 g 20 mM Imidazolpuffer (pH 7) im Zentrifugenröhrchen gut vermischt und anschließend mit Imidazolpuffer auf 30 g aufgefüllt. Diese resuspendierte Sahne wurde erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Sahneschichten und die wässrigen Phasen wurden für die nachfolgenden Untersuchungen gesammelt und ausgewogen.

3.5.4.2 Grenzflächenbelegung der Emulsionen

Die Berechnung der Grenzflächenbelegung erfolgte in Kombination mit der Bestimmung der spezifischen Grenzfläche der jeweiligen Emulsion (siehe 3.5.2). Die Berechnung der Grenzflächenbelegung (Γ) erfolgte entsprechend nachstehender Formel (3.2):

$$\Gamma = \frac{e_F}{A_{0,sp}} \qquad (3.2)$$

e_F: Konzentration des jeweiligen Stoffes; $A_{0,sp}$: spezifische Grenzfläche

Dazu mussten aber zuerst die Protein-, Phospholipid-, FFS-Konzentrationen der gewaschenen dispersen Phase bestimmt werden.

3.5.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes der dispersen Phase

Prinzip:

Der Proteingehalt der Proben (disperse und wässrige Phase) wurden photometrisch mittels der modifizierten Lowry-Methode (Hartree, 1972; Markwell *et al.,* 1978) ermittelt. Dabei wurde die Extinktion der Folinreaktion photometrisch gemessen.

Notwendige Reagenzien:

CTC-Lösung:	1g $CuSO_4$ x $5H_2O$ (0,1 %)
	2g Na^+/K^+-Tartrat (0,2 %)
	100 g $NaCO_3$ (10 %)
	1000 ml dest. Wasser
Reagenz A:	CTC-Lösung/ SDS-Lösung (5 %)/ NaOH (0,8 mol/l) (1/2/1, v/v/v)
Reagenz B	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz/dest. Wasser (1/4, v/v)

Durchführung:

Zuerst wurden 0,5 g homogenisierte disperse Phase in ein Reagenzglas eingewogen und mit 2 g 5 %iger SDS-Lösung verdünnt. Danach wurden die Proben 10 min bei 90 °C im Wasserbad erhitzt. 1 ml der abgekühlten Probe wurde in Eppendorf-Tubes pipettiert und zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge 10 min mit 10.000 g bei 20 °C). Als nächstes wurden aus dem Tube 100 µl Probe in ein Reagenzglas pipettiert. Das Reagenzglas wurde mit 900 µl 5 %iger SDS-Lösung aufgefüllt, 1,0 ml Reagenz A dazu pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,5 ml Reagenz B zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 750 nm spektrometrisch gemessen.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte anhand der vorher erstellten Kalibrationsgeraden. Dazu wurden etwa 50 mg des Eigelbs in 30 ml 5 %iger SDS-Lösung im Ultraschallbad (ca. 5 min) gelöst, in einen 100 ml Messkolben überführt und bis zum Eichstrich aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe (20 - 220 µg/ml) erstellt. Anschließend wurden alle Verdünnungen wie oben beschrieben mit Reagenz A und B behandelt und spektrometrisch vermessen.

Proteinzusammensetzung:

Die Proteinzusammensetzung der Emulsionsgrenzfläche wurde mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.3.2.2) ermittelt

3.5.4.4 Bestimmung des Phospholipidgehalts der dispersen Phase

Der Phospholipidgehalt der dispersen Phase wurde mittels Dünnschichtchromatographie (siehe Kapitel 3.2.2.1 und Kapitel 3.2.2.2) ermittelt.

3.5.5 Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren in der dispersen Phase

Prinzip:

Das aus der dispersen Phase extrahierte Fett bzw. freie Fett wurde mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) umgeestert und die Fettsäuremethylester mit GC bestimmt.

Extraktion der freien Fettsäuren:

Die Bestimmung der Zusammensetzung der freien Fettsäuren (FFS) erfolgte in Anlehnung an Methoden von Jong und Badings (1990) sowie nach dem FFS-Prüfverfahren DGF C-VI 10a (00) (Lebensmitteluntersuchungsamt, Aachen). Etwa 0,7 g der dispersen Phase der Emulsion wurden mit 10 ml Diethylether/Hexan (1/1, v/v) und mit 1 ml internem Standard (100 mg Tridecansäure in 50 ml Ether/Hexan (1/1)) versetzt, 5 min geschüttelt und anschließend filtriert. Zur Abtrennung der Triglyceride wurde eine Amino-SPE-Phase (Chromabond NH_2, 3 ml, 500 mg, Macherey & Nagel, Düren) mit 10 ml Chloroform konditioniert. 1,5 ml des Proben-Filtrates wurden auf die Säule gegeben und die Triglyceride mit 10 ml Chloroform eluiert. Die freien Fettsäuren wurden mit 7 ml Diethylether/Ameisensäure (49/1, v/v) eluiert. Anschließend wurde das Eluat unter Stickstoff getrocknet.

Herstellung des Derivatisierungsreagenz:

Ca. 20 g Ionenaustauscher wurden in die Glassäule, die zuvor mit etwas Glaswatte versehen worden war, eingeschäumt. Der Austauscher wurde mit 150 ml Natronlauge (0,04 g/ml) regeneriert, mit ca. 150 ml dest. Wasser neutral gewaschen (Indikatorpapier) und mit 60-100 ml Methanol nachgewaschen. 4,1 g Trimethylsulfoniumiodid wurden in 60 ml Methanol unter Erwärmen in einem Wasserbad von 50-60 °C gelöst und in Portionen von 5-10 ml über den Austauscher gegeben. Die Lösung wurde in einem Messkolben (100 ml) aufgefangen. Zwischendurch wurde die Lösung ins Wasserbad zurückgestellt, um ein Auskristallisieren im Gefäß oder in der Säule zu vermeiden. Der Austauscher wurde zum Schluss mit 60 ml Methanol nachgewaschen. Die Lösung (etwa 100 ml) wurde verschlossen bei 4-8 °C aufbewahrt.

Herstellung der Standardlösung:

Als Standard wurden 1 µl einer Lösung aus Capronsäure (6:0), Caprylsäure (8:0), Caprinsäure (10:0), Laurinsäure (12:0), Tridecansäure (13:0), Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Linolensäure (18:3), Arachinsäure (20:0), Arachidonsäure (20:4), Eicosapentaensäure (20:5), Erucasäure (22:1) und Docosahexaensäure (22:6) (je 1 mg/ml in Ether/Hexan (1/1)) eingesetzt. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe mit 1; 0,75; 0,1; 0,5; 0,3; 0,2 mg/ml hergestellt und zusammen mit dem internen Standard zur GC eingesetzt (s.u.).

Derivatisierung:

Die Proben wurden nach der Extraktion in 800 µl *t*-Butylmethylether gelöst, dabei das Headspaceglas mehrmals mit der Lösung gespült, in ein kleines Vial überführt, 250µl 0,2M TMSH-Lösung zugefügt, das Vial verschlossen, geschüttelt und zur GC-Messung eingesetzt.

GC-Bestimmung:

GC: HP 5890 (Hewlett Packard)

Injektion: cool on column

Säule: Optima-FFAP 30m x 0,32mm, Filmdicke 0,25µm (Macherey & Nagel, Düren)

Trägergas: Stickstoff

Detektor: FID, 250 °C

Temperaturprogramm: 150 °C $\rightarrow$ (3 °C/min) $\rightarrow$ 260 °C, 15min

Datenauswertung: Millenium-Software (Waters)

Die Quantifizierung erfolgte über die Berechnung der Responsefaktoren über den internen Standard.

Auswertung:

Die einzelnen Peaks wurden durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit einem Standard zugeordnet. Zur Berechnung des Anteils der verschiedenen Fettsäuren wurden die Flächen der einzelnen Peaks addiert und der Anteil der Einzelpeaks in % errechnet und angegeben.

Zunächst wurde eine Standardlösung mit den verschiedenen Fettsäuremethylestern (s.o., incl. Tridecansäure, 13:0) am GC gemessen. Danach wurden aus den gemessenen Flächen und bekannten Konzentrationen die Responsefaktoren für jeden Standard berechnet (3.3):

$$Responsefaktor_{FFS} = \frac{A_{FFS-Methyl} \cdot c_{ISTD-Methyl}}{A_{ISTD-Methyl} \cdot c_{FFS-Methyl}} \qquad (3.3)$$

$A_{FFS\text{-}Methyl}$: Fläche des jeweiligen FFS-Standards als Methylester ; $A_{ISTD\text{-}Methyl}$: Fläche des internen Standards als Methylester; $c_{FFS\text{-}Methyl}$: Konzentration der eingesetzten FFS als Methylester; $c_{ISTD\text{-}Mehtyl}$: Konzentration des eingesetzten internen Standards als Methylester

Anschließend wurden auch die Eigelbproben am GC vermessen. Die Konzentration des jeweiligen FFS-Methylesters in der Probe ($c_{FFS\text{-}Methyl}$) wurde unter Einbeziehung der Kon-

zentration der Tridecansäure (interner Standard), die 2 mg/g Probe betrug, mit Hilfe der Formel (3.4) berechnet:

$$c_{FFS-Methyl.} = \frac{R_{FFS} \cdot G_{ISTD} \cdot A_{FFS-Methyl.}}{E_{Probe} \cdot A_{ISTD-Methyl}} \quad (3.4)$$

R_{FFS}: Konzentration des FFS-Methylesters in der Eigelbprobe; $A_{FFS\text{-}Methyl}$: Fläche des FFS-Methylesters in der Eigelbprobe; $A_{ISTD\text{-}Methyl}$: Fläche des FFS-Methylesters des internen Standards; G_{ISTD}: Gehalt des internen Standards in der Eigelbprobe; E_{Probe}: Einwaage der Eigelbprobe

Umrechnung von FFS-Methylester zu FFS:

Es ist zu beachten, dass die ermittelten FFS-Konzentrationen als Fettsäuremethylester berechnet wurden. Deswegen mussten diese anschließend unter Einbeziehung der jeweiligen Umrechnungsfaktoren für jede freie Fettsäure umgerechnet werden. Die Faktoren zur Umrechnung der Massenprozente von Fettsäuremethylestern in diejenige freie Fettsäure sind in der Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Faktoren zur Umrechnung der Massenprozente von Fettsäuremethylestern zu freien Fettsäuren

Fettsäure		Molmasse [g/mol]		Umrechnungs-faktor
		Fettsäure	Methylester	
Capronsäure	(6:0)	116,60	130,19	0,892
Caprylsäure	(8:0)	144,21	158,24	0,911
Caprinsäure	(10:0)	172,27	186,30	0,925
Laurinsäure	(12:0)	200,32	214,35	0,935
Tridecansäure	(13:0)	214,35	228,38	0,939
Myristinsäure	(14:0)	228,38	242,41	0,942
Palmitinsäure	(16:0)	256,43	270,46	0,948
Palmitoleinsäure	(16:1)	254,41	268,44	0,948
Stearinsäure	(18:0)	284,48	298,51	0,953
Ölsäure	(18:1)	282,47	296,50	0,953
Linolsäure	(18:2)	280,45	294,48	0,952
Linolensäure	(18:3)	278,44	292,47	0,952
Arachinsäure	(20:0)	312,54	326,57	0,957
Arachidonsäure	(20:4)	304,47	318,50	0,956
Eicosapentaensäure	(20:5)	302,46	316,49	0,956
Erucasäure	(22:1)	338,58	352,61	0,963
Docosahexaensäure	(22:6)	328,50	342,53	0,959

Die Umrechnung erfolgte nach folgender Formel (3.5):

$$c_{FFS} = c_{FFS-Methyl} \cdot K \quad (3.5)$$

c_{FFS}: Konzentration der FFS in der Eigelbprobe; $c_{FFS\text{-}Methyl}$: Konzentration der FFS in der Eigelbprobe als Methylester; K: Umrechnungsfaktor

3.5.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Prinzip:

Das Prinzip der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) besteht im selektiven Anfärben der Makromoleküle mit fluoreszierenden Substanzen, die dann angeregt durch den Laserstrahl Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses emittierte Licht wird pixelweise erfasst. Dadurch lassen sich lokale Verbindungen von Makromolekülen in der Lebensmittelmatrix sichtbar machen.

CMC-Lösung:

Da es sich bei den in diesem Projekt untersuchten Proben um Emulsionen handelt, die keine feste Struktur aufweisen, mussten die Öltropfen zur Schärfeinstellung der Rasterung fixiert werden. Dieses geschah durch Zugabe von Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC) zu der Probe. Dazu wurde unter Rühren in ein Becherglas mit 1 l lauwarmem Wasser langsam soviel CMC gegeben, dass eine dickflüssige Konsistenz entstand.

Anfärben der Proben für die Mikroskopie:

Eine kleine Menge der dispersen Phase (vgl. 3.5.4.1) wurde in einen Plastikbecher gegeben und mit den Farbstoffen FITC (Fluoresceinisothiocyanat) (Fluka) und Alexa Fluor 555 (Fluka) gemischt. Anschließend wurde der Plastikbecher zu 75 % mit der eingesetzten CMC-Lösung aufgefüllt und diese und gründlich verrührt.

Mikroskopie:

Die bereits angefärbte Probe wurde auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Der Objektträger wurde dann unter das CLSM-Mikroskop (Nikon ECLIPSE C1) gelegt und mit verschiedenen Vergrößerungsstufen mikroskopiert. Die Bilder wurden elektronisch gespeichert und konnten anschließend mit einer Bild-Software bearbeitet werden. Im vorliegenden Fall wurde mittels Diffusion Farbstoff FITC an Proteinbestandteile und Alexa Fluor 555 an die Phospholipidkomponenten angelagert, wobei die Proteinmoleküle mit dem Argon-Laser angeregt werden und an den grünen Bereichen der Mikroskopiebilder zu erkennen waren. Die Anregung der Phospholipidbestandteile erfolgte durch den Helium-Neon-Laser. Auf den Mikroskopiebildern sind sie dementsprechend rot angefärbt.

3.5.7 Rheologische Charakterisierung der Emulsionen

Die rheologische Charakterisierung der Emulsionen wurde mittels des Rotationsrheometer AR 200 (T.A. Instruments) mit Kegel-Platte-Messsystem mit den folgenden Parametern durchgeführt: Kegelgeometrie: d = 4 cm; Öffnungswinkel: 4:00:24°; Messtemperatur: 20 °C; Schergefälle: kontinuierlich steigend von 0,5 bis 500 s^{-1}. Die rheologischen Eigenschaften wurden über eine Modellierung der Fließfunktion mit einem geeigneten rheologischen Modell beschrieben. Dabei zeigte sich, dass das Modell nach Ostwald/deWaele (3.6), das für nicht-lineare Fluide ohne Fließgrenze angewendet wird, zur Charakterisierung des Fließverhaltens sowohl des Eigelbs als auch der Emulsionen gut geeignet ist.

$$\tau = K \cdot \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_0} \right)^n \qquad (3.6)$$

τ :Scherspannung; *K*: Konsistenzwert; $\dot{\gamma}$: Schergeschwindigkeit; $\dot{\gamma}_0$: konstante Schergeschwindigkeit s^{-1}; *n*: Fließindex

Der Konsistenzwert *K* ist ein direktes Maß für die Festigkeit der Emulsion. Je größer der Wert von *K* ist, desto zäher oder viskoser ist die Substanz. Der Fließindex *n* beschreibt das Maß der Strukturviskosität, wobei ein Wert für *n* nahe 1,0 auf eine geringe Strukturviskosität hin weist. Dass heißt, bei einer solchen Substanz ist die Abhängigkeit der effektiven Viskosität vom Schergefälle wenig ausgeprägt. Wird das *n* hingegen kleiner, deutet das auf eine größere Viskositätsverringerung mit zunehmender Scherung hin (höhere Strukturviskosität). Die Auswertung der rheologischen Messungen erfolgte mittels des speziellen Programms „RheoStar“ (Franke und Tscheuschner, 1995).

3.5.8 Bestimmung der Oberflächenladung der Emulsionstropfen (Zetapotential)

Prinzip:

An der Grenzfläche zwischen Tropfen und der kontinuierlichen Phase (wässrige Lösung) einer O/W-Emulsion sind meistens elektrische Ladungen vorhanden. Diese können entweder positiv oder negativ sein (Schubert, 2005c). Dies führt zur Anhäufung von Gegenionen an der Oberfläche der Tropfen. Wird die Gegenionenwolke, die den Ladungsträger umgibt, durch eine Strömung verzerrt, kann ein Strömungspotential gemessen werden. Am Vorzeichen des Messwertes ist dabei erkennbar, ob es sich um eine positive (kationische) oder negative (anionische) Ladung handelt.

Messung:

Die Messung der Tropfenladung wurde mit dem Partikelladungsmessgerät CAS (emtec) bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Proben wurden zuvor verdünnt, indem 10 Tropfen der jeweiligen Emulsion in 50 ml bidest. Wasser gegeben wurden.

3.5.9 Bestimmung des extrahiebaren Fettanteils in Emulsionen

Prinzip:

Unter dem Begriff extrahierbarer Fettanteil versteht man den Anteil des Fettes, der mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar ist. Dabei gilt, je stabiler und dichter der Grenzflächenfilm der Emulsion desto weniger Lösungsmittel kann zur dispersen Phase durchdringen und das Fett aus dem Öltropfen extrahieren und desto niedriger ist der Anteil des extrahierbaren Fettes.

Durchführung:

Zu 20 g Emulsion wurden 100 ml Petroleumbenzin dazugegeben. Nach 5 min auf dem Schütteltisch (180 min^{-1}) wurde das Petroleumbenzin durch Faltenfilter in einen Rundkolben dekantiert. Nach dem Abgießen wurden erneut 100 ml Petroleumbenzin dazugegeben und nochmals 5 min bei 180 min^{-1} geschüttelt. Nach dem erneuten Dekantieren wurde das Lösungsmittel bei 40 °C im Rotationsverdampfer entfernt. Danach wurde der Rundkolben bei 103 °C im Trockenschrank getrocknet und 45 min im Exsikkator abgekühlt. Anschließend wurden die Kolben auf der Analysewaage ausgewogen. Aus der Masse des extrahierten Fettes wurde der Freifettanteil (FFE) nach folgender Formel berechnet (3.7):

$$FFE = \frac{m_F \cdot 1000}{m_E \cdot c_F} \qquad (3.7)$$

m_F: Masse extrahiertes Fett nach Trocknung; m_E: Einwaage Emulsion; c_F: Gesamtfettgehalt der Emulsion

Der Gesamtfettgehalt der Emulsionen wurde nach Caviezel® mit der DGF Einheitsmethode C-III 19 (00) (Schnellmethode) bestimmt. Die Bestimmung wurde mit einer Extraktionseinheit B-815 (Büchi, Essen) sowie einem Fettbestimmungsgerät B-820 (Büchi, Essen) durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Auswirkungen der enzymatischen Behandlung des Eigelbs mit Phospholipase A_2 auf dessen Eigenschaften

4.1.1 Einfluss auf die Zusammensetzung des Eigelbs

Die Veränderung der Zusammensetzung der Phospholipide als Folge der enzymatischen Behandlung von Eigelb mit Phospholipase A_2 (PLA_2) aus Schweinepankreas ist in der Tabelle 4.1 dargestellt. Die Analytik erfolgte mittels quantitativer Dünnschichtchromatographie, wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben. Der entsprechende Bandenverlauf kann Bild 6.1 im Anhang entnommen werden.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der Phospholipide während der Inkubation des Eigelbs mit PLA_2 bei 35 °C. Die Enzymkonzentration beträgt 1000 Units pro g Phospholipide. Die Phospholipidkonzentration ist in µmol/g Trockeneigelb angegeben. PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; LPC: Lyso-Phosphatidylcholin; LPE: Lyso-Phosphatidylethanolamin

Phospholipide	Inkubationsdauer						
	0	10 min	30 min	1 h	3 h	4 h	8 h
PC	188,7 ±7,8	123,8 ±6,6	96,9 ±6,6	73,9 ±2,5	32,1 ±1,1	23,3 ±1,6	19,7 ±2,6
PE	56,6 ±1,5	32,5 ±1,4	19,9 ±1,0	12,6 ±1,4	5,7 ±0,7	4,9 ±1,1	2,7 ±1,7
LPC	11,4 ±0,4	46,2 ±1,1	89,2 ±2,2	133,8 ±9,9	143,9 ±10,4	155,4 ±12,0	169,6 ±13,2
LPE	4,9 ±0,1	16,1 ±0,5	25,3 ±1,1	29,3 ±3,7	35,3 ±2,7	35,8 ±2,6	42,4 ±3,9

Die eingesetzte Enzymmenge betrug 1000 Units pro g Eigelbphospholipide, was der vom Hersteller empfohlenen Konzentration entspricht. Zunächst ist die für eine Hydrolyse mit Phospholipase A_2 zu erwartende Abnahme von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) zu erkennen. Parallel dazu steigen die Gehalte der entsprechenden Lyso-Phospholipide, Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) und Lyso-Phosphatidylethanolamin (LPE). Es fällt sofort auf, dass die PC- und PE-Gehalte sehr schnell abnehmen, so dass PC und PE bereits nach 30 min zu 50 % bzw. 68 % abgebaut sind. Dementsprechend ergibt sich ein vergleichbarer Verlauf in Bezug auf Bildung von Lyso-Phospholipiden, wobei nach 4 h ein Hydrolysegrad, d.h. der Grad der Umwandlung der Phospholipide in die entsprechenden Lyso-Verbindungen, von etwa 90 % erreicht wird. Im weiteren Verlauf der Hydrolyse änderte sich der Hydrolysegrad nur noch geringfügig.

Da die Enzymaktivität neben den äußeren Parametern, wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, auch von der zur Verfügung stehenden Substratmenge abhängig ist, verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend dem Substratabbau. Aufgrund von vergleichbaren Abbauverläufen von PC und PE konnte die in der Literatur mehrfach beschriebene Kopfgruppenunspezifität der aus Schweinepankreas stammenden PLA_2 bestätigt werden (Markert, 2004; Mustranta *et al.*, 1995). Der schnelle Abbau der Phospholipide ist ein Hinweis darauf, dass die Alkylgruppen der Phospholipide für das Enzym leicht zugänglich sind. Liegen die Phospholipide in einer wässrigen Umgebung als Mizellen mit einer doppelschichtigen Membran vor, so sind die Alkylgruppen der Phospholipide ins Innere der Mizelle gerichtet (Belitz *et al.*, 2005). Dadurch können sie von Phospholipasen nur schwer erreicht werden, was dazu führt, dass die Hydrolyse solcher Phospholipid-Mizellen relativ langsam abläuft (Mine, 1997). Im Eigelb liegen Phospholipide dagegen nicht einzeln, sondern im Verbund mit Proteinen als Lipoproteine an der Oberfläche der LDL-Mizellen bzw. HDL vor (Anton, 2007a, b). Dieser Verbund wird durch Wechselwirkungen zwischen der Kopfgruppe der Phospholipide und den hydrophilen Aminosäureresten des Apoproteins stabilisiert (Kamat *et al.*, 1972; Mine *et al.*, 1993). Die Alkylgruppen der Phospholipide scheinen dagegen in diese Wechselwirkungen nicht involviert zu sein und sind damit für die PLA_2 leichter zu erreichen.

4.1.2 Einfluss auf Strukturelemente des Eigelbs

Da nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die Struktur des Eigelbs dessen Eigenschaften im Wesentlichen bestimmt, ist es sinnvoll, zu untersuchen, ob die enzymatische Modifizierung mit PLA_2 einen Einfluss darauf hat. Aus diesem Grund wurde die Mikrostruktur des Eigelbs und der Fraktionen Plasma und Granula mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) dargestellt. Die Methode der Auftrennung von Plasma und Granula kann Kapitel 3.3.1 entnommen werden. Wie im Bild 4.1 (1a) zu erkennen ist, ist im unbehandelten Eigelb ein einheitlich geordnetes Netzwerk miteinander verbundener Stränge sichtbar. Der Durchmesser der Hohlräume beträgt etwa 0,5 bis 1 µm. Es lassen sich Partikel unterschiedlicher Größe und Form, die in das Proteinnetzwerk eingebettet sind, erkennen. Größere Partikel (1–2 µm), die eine eher ungleichmäßige bzw. polyedrische Gestalt aufweisen, konnten anhand ihres Aussehens und ihrer Größe durch einen Vergleich mit Veröffentlichungen von Chang *et al.* (1977) und Causeret *et al.* (1992) als Granulapartikel identifiziert werden. Bei der Betrachtung der Mikrostruktur des PLA_2-behandelten Eigelbs (1b) erkennt man ebenfalls ein Netzwerk, allerdings mit etwas

größeren Zwischenräumen von 1–3 µm. Ferner lassen sich keine granulären Partikel mehr erkennen.

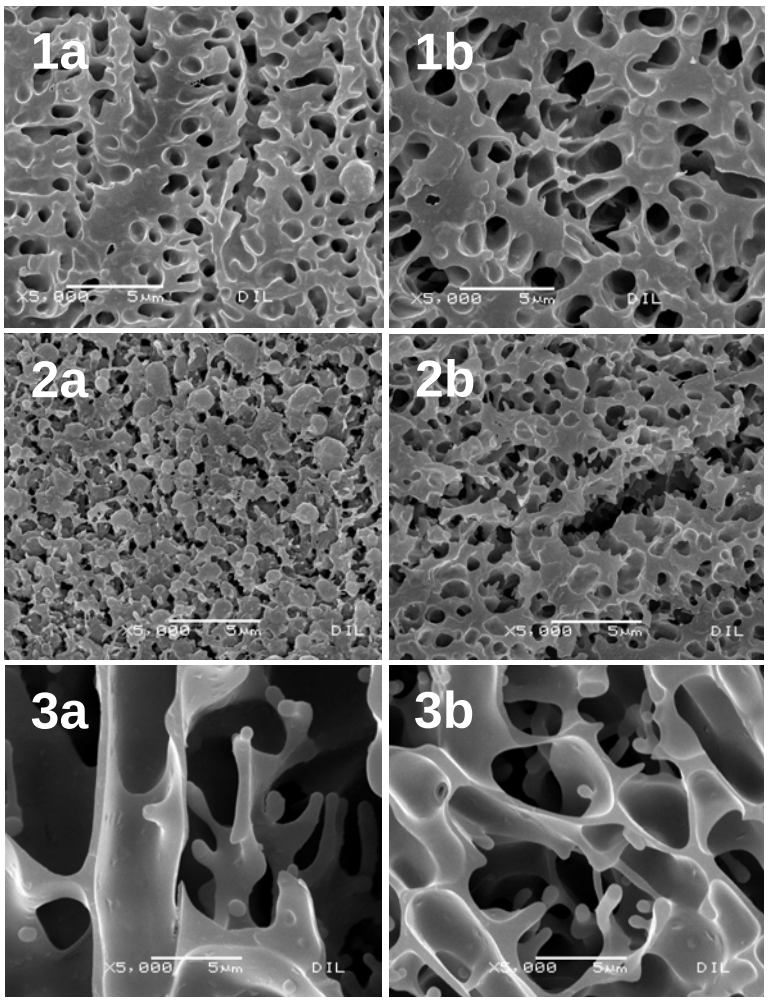


Bild 4.1: REM-Aufnahmen von Eigelb (1) sowie dessen Fraktionen Granula (2) und Plasma (3) vor (a) bzw. nach (b) enzymatischer Behandlung des Eigelbs mit PLA_2. Länge des Balkens: 5 µm.

Die Struktur der Granulafraktion des unbehandelten Eigelbs besteht aus einer gleichmäßigen Anordnung von zahlreichen, dichtgepackten und ungleichmäßig geformten polyedrischen Partikeln (Bild 4.1, 2a). Der Durchmesser beträgt etwa 0,1 bis 2 µm, was mit den Angaben anderer Autoren bezüglich der Größe von Granulapartikeln gut übereinstimmt (Chang *et al*., 1977; Daimer und Kulozik, 2008). Die einzelnen Granulateilchen, die eine raue Oberfläche haben, liegen in assoziierter Form vor und sind durch faserartige Stränge miteinander verbunden, wodurch sich geordnete Strukturen ausbilden. Eine völlig veränderte Struktur zeigt die Granulafraktion des PLA_2-behandelten Eigelbs. Es sind keinerlei granuläre Partikel mehr zu erkennen. Stattdessen kommt es zur Ausbildung geordneter Netzwerkstrukturen mit deutlich ausgeprägten Zwischenräumen, mit

einer Maschenweite von 0,5 bis 2 µm Bild 4.1 (2b). Die im Bild 4.1 (3a) dargestellten Aufnahmen der Plasmafraktion des unbehandelten Eigelbs zeigen ein Netzwerk aus faserartigen Proteinsträngen. Die Struktur des Netzwerkes erscheint eher ungeordnet, wobei Größe und Form der Hohlräume variieren. Für die Ausbildung des Netzwerkes sind die wasserlöslichen Livetine, neben den LDL-Mizellen die Hauptbestandteile der Plasmafraktion, verantwortlich. Letztere haben eine Größe von 40 bis 60 nm (Anton *et al*., 2003) und sind deswegen auf den vorliegenden REM-Aufnahmen nicht sichtbar. Die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 führte zu einer merklichen Umstrukturierung des Proteinnetzwerkes, wobei dieses deutlich geordneter und die Zwischenräume deutlich schmaler und einheitlicher erscheinen.

Die strukturellen Veränderungen des Gesamteigelbs sowie der Granula- und Plasmafraktion nach Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 sind auf die partielle Auflösung der granulären Strukturen der Granulafraktion zurückzuführen. Daimer und Kulozik (2008) konnten eine deutliche Reduzierung der mittleren Partikelgröße der Granulafraktion (bei natürlichen Bedingungen des Eigelbs, pH 6,5 und Ionenstärke 0,15 M) nach Behandlung mit PLA_2 feststellen. Sie geben an, dass die Struktur der Granulapartikel durch Einwirkung von PLA_2 nur gelockert wird und es zu keiner vollständigen Dissoziation kommt. Zusätzlich konnten die Autoren eine deutliche Erhöhung der Löslichkeit der Apo-HDL der Granulafraktion nach Behandlung mit PLA_2 beobachten. Ähnliches Verhalten der Granulafraktion konnte durch Erhöhung der Ionenstärke auf >0,5 M durch Zugabe von NaCl beobachtet werden (Chang *et al*., 1977). Dabei wird das divalente Ca^{2+} in den Calciumbrücken zwischen Phosvitin und HDL durch das monovalente Na^{+} ersetzt. Dies führt zum Aufbruch der Granulapartikel, wobei gleichzeitig die Löslichkeit der Granulaproteine steigt. Causeret *et al*. (1992) berichteten, dass die Erhöhung der Löslichkeit auf die Strukturänderung der Granulapartikel zurückgeführt werden konnte. Dabei verschwanden die aggregierten granulären Strukturen und es bildete sich stattdessen ein Proteinnetzwerk aus.

Die Hydrolyse der Phospholipide mit PLA_2 wird durch Ca^{2+}-Ionen katalysiert, wobei diese fest an das Enzym gebunden werden, um die Enzymkonformation zu stabilisieren (Plückthun und Dennis, 1981). Außerdem beteiligt sich Calcium sowohl an der Substrat- als auch an der Produktbindung, welche in diesem Fall die Lyso-Phospholipide und die freigewordenen Fettsäuren sind (Scott und Sigler, 1994). Daher kann angenommen werden, dass bei der Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs die Calciumbrücken

zwischen HDL und Phosvitin der Granula durch die Bindung des Calciums an PLA_2 teilweise aufgelöst werden, was zum oben beschriebenen Aufbruch der Struktur der Granulapartikel führt. Die dadurch freigewordenen HDL und Phosvitin gehen in Lösung. Somit findet während der Auftrennung von Granula und Plasma durch Zentrifugation eine Umverteilung von HDL und Phosvitin aus der Granula- in die Plasmafraktion statt, womit auch die in den REM-Aufnahmen beobachtete Erhöhung der Netzwerkdichte der Plasmafraktion erklärt werden kann.

4.1.3 Einfluss auf die Proteinstruktur des Eigelbs

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt werden konnte, hat die Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs mit PLA_2 einen Einfluss auf die Struktur der Eigelbfraktionen. Daher sollte geprüft werden, in welcher Weise die Enzymbehandlung die Proteinstruktur beeinflusst. So spielen die unterschiedlichen Anteile der Sekundärstruktur für die technofunktionellen Eigenschaften der Proteine eine wichtige Rolle. Die Erfassung der Circulardichroismus-Spektren (CD) ist eine geeignete Methode, um die Konformation der Proteine und eine mögliche Änderung dieser durch modifizierte Wechselwirkungen mit Phospholipiden nach der enzymatischen Behandlung durch Phospholipase A_2 sichtbar zu machen (Mine, 1993, 1997). In Bild 4.2 ist ein typisches CD-Spektrum eines unbehandelten und eines PLA_2-behandelten Eigelbs dargestellt.

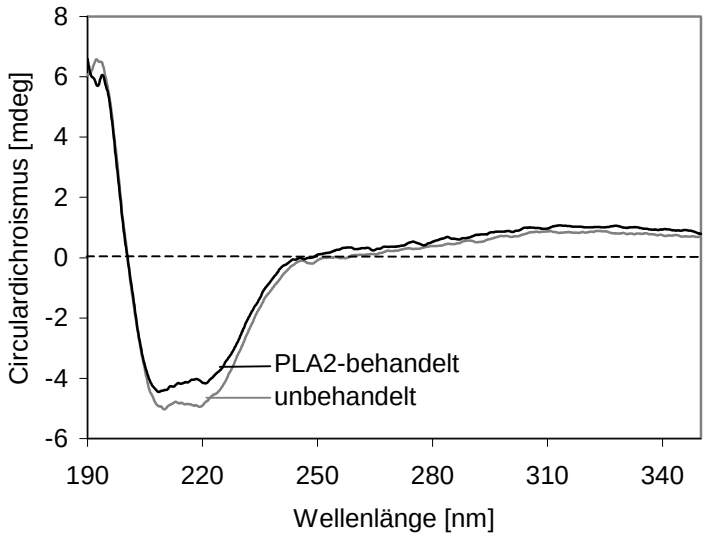


Bild 4.2: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLA_2-behandelten Eigelbs.

Die quantitativen Anteile der Sekundärstrukturen sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Sekundärstrukturanteile der Proteine im unbehandelten und PLA_2-behandelten Eigelb vor und nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C

Eigelb	Behandlung	Sekundärstrukturanteile [%]			
		α-Helix	β-Faltblatt	β-Turn	Random Coil
unbehandelt	nicht erhitzt	47,5	11,4	16,8	24,3
	erhitzt bei 75 °C	24,9	25,4	17,3	32,4
	erhitzt bei 85 °C	14,5	36,0	15,5	34,0
PLA_2-behandelt	nicht erhitzt	42,7	13,5	17,34	26,3
	erhitzt bei 75 °C	20,0	31,1	16,9	32,1
	erhitzt bei 85 °C	25,0	26,1	17,5	31,4

Es lässt sich erkennen, dass der Gehalt an α-helikalen Strukturen der Proteine des unbehandelten Eigelbs vor der Erhitzung mit 47,5 % relativ hoch ist. Der Anteil an β-Faltblatt liegt mit 11,4 % deutlich darunter. Die aus der Literatur bekannten Ergebnisse bezüglich Sekundärstruktur beziehen sich jeweils auf einzelne Apo-Proteine des Eigelbs (Mine, 1997; Anton *et al.,* 2003; Martinet *et al.,* 2003; Jolivet *et al.*, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messungen wurden allerdings am Gesamteigelb durchgeführt, so dass ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren nicht ohne Weiteres möglich ist. Allerdings stellten Anton *et al*. (2003) fest, dass das CD-Spektrum von Apo-LDL C zwei Hochpunkte im Bereich von 191-193 nm und zwei Tiefpunkte im Bereich von 208 und 222 nm besitzt. Die identischen Hochpunkte des CD-Spektrums des Gesamteigelbs in der vorliegenden Arbeit sind damit zu erklären, dass das in der Studie von Anton *et al.* (2003) gemessene Apo-LDL C eines der wichtigsten Apo-Proteine des Eigelbs darstellt und somit die Eigenschaften des Gesamteigelbs bestimmt. Außerdem ist bekannt, dass das HDL des Eigelbs bei natürlichen Milieubedingungen (pH 6,5–7 und Ionenstärke 0,15 M) in Form von nahezu unlöslichen Aggregaten vorliegt (Granula) (Anton, 2007b) und somit während der CD-Messung nicht mit erfasst wird. Die entsprechende Probenaufarbeitung ist Kapitel 3.4.2 zu entnehmen.

Eine Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 führt im Vergleich zum unbehandelten Eigelb zu einer Verschiebung des CD-Spektrums im Wellenlängenbereich von 200–230 nm. Der Gehalt an α-helikalen Strukturen im PLA_2-behandelten Eigelb geht auf 42,7 % zurück. Der Anteil von β-Faltblatt nimmt dementsprechend etwas zu. Mine (1997) berichtete, dass die sekundäre Proteinstruktur von Apo-LDL durch Hydrolyse der Phospholipide mit PLA_2 nicht beeinflusst wird. Wie bereits im Kapitel 4.1.2 beschrieben, bewirkt die enzymatische Behandlung mit PLA_2 eine partielle Auflösung der granulären Strukturen des Eigelbs. Zusätzlich ist dieser Effekt mit einer Erhöhung der Löslichkeit der Apo-HDL

verbunden (Daimer und Kulozik, 2008). Da bei der CD-Messung nur lösliche Proteine erfasst werden, kann man davon ausgehen, dass das Apo-HDL der Granula erst nach der PLA_2-Behandlung des Eigelbs einen Einfluss auf den Verlauf des CD-Spektrums hat. Nach Anderson *et al.* (1998) stellt das Apo-HDL ein globuläres Protein dar, das hauptsächlich aus β-Faltblatt-Strukturen besteht. Damit kann der Rückgang des Anteils der α-Helix-Strukturen und Zunahme an β-Faltblatt im Eigelb nach PLA_2-Behandlung durch die höhere Löslichkeit von HDL erklärt werden. Somit ist festzuhalten, dass durch die enzymatische Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs mit PLA_2 die Sekundärstruktur der Eigelbproteine nicht wesentlich beeinflusst wird.

CD-Spektren des unbehandelten und PLA_2-behandelten Eigelbs nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C bzw. die Sekundärstrukturanteile sind im Bild 4.3 und in der Tabelle 4.2 dargestellt.

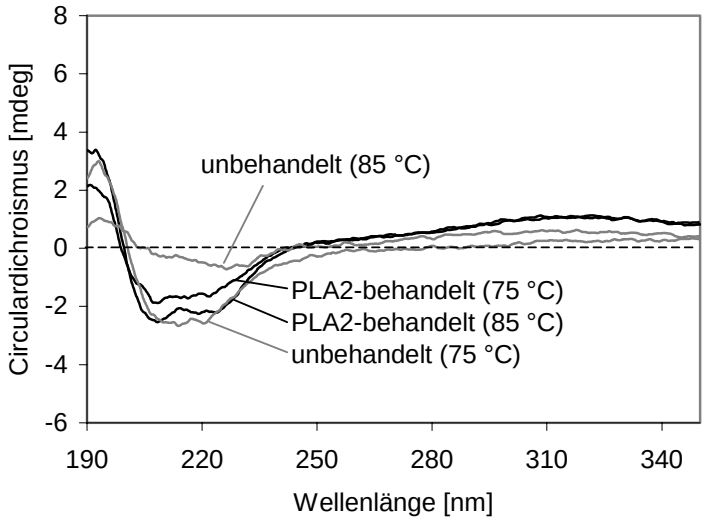


Bild 4.3: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLA_2-behandelten Eigelbs nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C.

Wie man in der Tabelle 4.2 erkennen kann, führt die Erhitzung sowohl von unbehandeltem als auch PLA_2-behandeltem Eigelb zur Umwandlung von α-Helix-Strukturen in β-Faltblatt und Random Coil. Bei einer Erhitzung auf 75 °C zeigen sich im unbehandelten und PLA_2-behandeltem Eigelb keine Unterschiede bezüglich Veränderung des α-Helix-Anteils, der in beiden Fällen bei etwa 50 % liegt. Im Gegensatz dazu induziert die Erhitzung des unbehandelten Eigelbs bei 85 °C eine Abnahme des Anteils der ursprünglich vorhandenen α-Helix-Strukturen um ca. 70 %, wohingegen diese Abnahme bei dem

PLA_2-behandelten Eigelb nur 40 % beträgt und damit sogar unter dem Wert des entsprechenden Eigelbs, das bei 75 °C erhitzt worden ist, liegt.

Mine (1997) zeigte, dass sich bei einer sukzessiven Erhitzung von unbehandeltem und von zuvor mit PLA_2 modifiziertem LDL erst ab einer Temperatur von 80 °C Differenzen bezüglich der Umwandlung von α-Helix-Strukturen ergaben. Dabei konnte die Abnahme des Anteils an α-Helix durch Modifikation von LDL mit PLA_2 fast um die Hälfte reduziert werden. Verantwortlich dafür wurden in erster Linie die veränderten Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden gemacht. Allerdings scheinen diese Wechselwirkungen erst während der Erhitzung, d.h. während der hitzeinduzierten Auffaltung der Proteine, wirksam zu werden bzw. einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine zu haben. Es wurde gezeigt, dass LPC durch hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine gebunden ist (Kamat *et al.*, 1977; Mine, 1997). Somit kann bezugnehmend auf Mine (1997) postuliert werden, dass während der hitzeinduzierten Auffaltung der Eigelbproteine mehr hydrophobe Bereiche freigelegt werden, wodurch sich die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden derartig verstärken, dass eine weitere Abnahme des Anteils an α-helikalen Strukturen verhindert wird.

4.1.4 Einfluss auf die Grenzflächeneigenschaften

Die Emulgiereigenschaften grenzflächenaktiver Substanzen werden u.a. durch ihr Vermögen, zur Phasengrenzfläche zwischen Wasser und Öl zu diffundieren und die Grenzflächenspannung herabzusetzen, gekennzeichnet. Zusätzlich spielt bei großen grenzflächenaktiven Molekülen, wie z.B. Proteinen, die Fähigkeit, sich an der Öltropfenoberfläche auszubreiten, eine entscheidende Rolle für die Herabsetzung der Grenzflächenspannung (siehe auch 2.1.3). Im Bild 4.4 ist der Einfluss der enzymatischen Modifizierung des Eigelbs mit PLA_2 auf die dynamische Grenzflächenspannung zwischen Wasser- und Ölphase bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt.

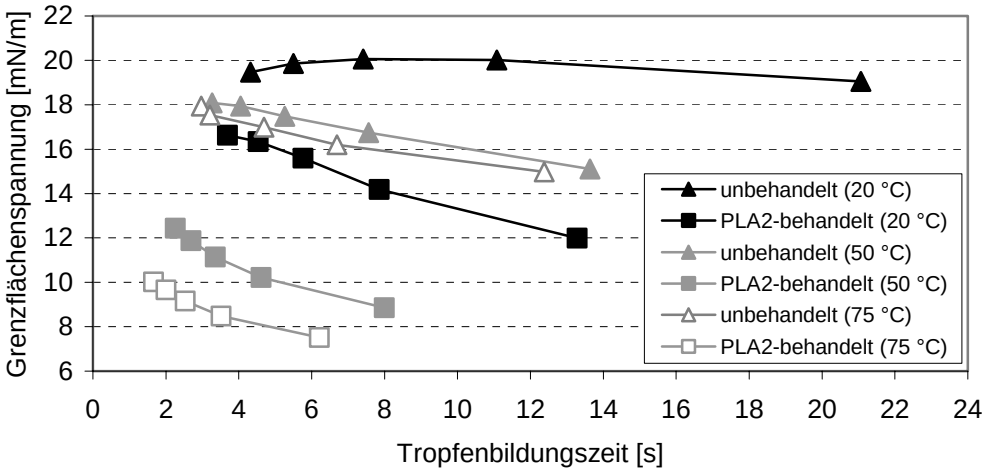


Bild 4.4: Dynamische Grenzflächenspannung zwischen Miglyol und einer wässrigen Eigelbdispersion (0,5 % Proteinanteil) mit unterschiedlich behandeltem Eigelb in Abhängigkeit von Tropfenbildungszeit und Temperatur.

Es ist zu erkennen, dass die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 zu einer deutlichen Reduzierung der Grenzflächenspannung, verglichen mit dem unbehandelten Eigelb, führt. Dieser Effekt wird bei höheren Temperaturen und längeren Tropfenbildungszeit noch verstärkt. Damit wird deutlich, dass die Emulgieraktivität des Eigelbs nach einer Modifizierung mit PLA_2 erheblich verbessert werden kann.

Für die Interpretation dieses Effektes ist es zunächst wichtig zu beachten, dass das Eigelb ein komplexes System darstellt, in dem mehrere grenzflächenaktive Substanzen an der Grenzfläche adsorbiert werden können. Dabei konkurrieren diese miteinander um den Platz an der Grenzfläche, so dass es zur Verdrängung einer grenzflächenaktiven Substanz durch die andere führen kann. So beschrieben Daimer und Kulozik (2009a) die Verdrängung von Eigelbproteinen durch Lyso-Phospholipide von der Öl-Wasser-Grenzfläche. Da Lyso-Phospholipide aufgrund der Abspaltung einer Fettsäure hydrophiler und auch kleiner als Phospholipide sind, können sie schneller zur Grenzfläche diffundieren, um diese zu stabilisieren. Allerdings ist bekannt, dass die LDL-Mizellen des Eigelbs erst an der Grenzfläche aufbrechen, wobei Proteine und Phospholipide an der Oberfläche des Öltropfens adsorbiert werden, während die neutralen Lipide ins Öltropfeninnere diffundieren (Kiosseoglou und Sherman, 1983; Mine, 1998b). Da Lyso-Phospholipide und Apo-Proteine in der LDL-Mizelle als Komplex vorliegen (van Dam, 1974), müssen sie auch als Komplex bis zur Grenzfläche diffundieren und erst während des Adsorptionsvorgangs in Wettbewerb miteinander treten. Damit kann die Annahme von Daimer und Kulozik (2009a) an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass die PLA_2-Behandlung des Eigelbs eine

Abnahme der Partikelgröße der Granula, verbunden mit einer Erhöhung der Löslichkeit der Granulaproteine, bewirkt (Daimer und Kulozik, 2008). Daher kann angenommen werden, dass die Diffusion der Granulapartikel zur Grenzfläche durch die geringere Partikelgröße beschleunigt wird. Darüber hinaus liegen die Granulaproteine HDL und Phosvitin nach der Modifizierung des Eigelbs mit PLA_2 teilweise frei vor, während sie im unbehandelten Eigelb „starre“ Komplexe bilden. Folglich sind diese nach dem Aufbruch der Granulapartikel flexibler und dadurch auch in der Lage, sich besser an der Grenzfläche auszubreiten, und so zu einer höheren Abnahme der dynamischen Grenzflächenspannung, verglichen mit dem unbehandeltem Eigelb, beitragen.

4.1.5 Einfluss auf die Funktionalität in Emulsionen

Nachdem die Auswirkungen der enzymatischen Behandlung des Eigelbs auf dessen Struktur und Eigenschaften diskutiert wurden, soll in den nächsten Kapiteln untersucht werden, inwiefern dadurch dessen Emulgiereigenschaften beeinflusst werden. Dabei soll die Hitzestabilität der Emulsionen im Vordergrund stehen. Die Untersuchung der Emulgiereigenschaften des Eigelbs erfolgte anhand von O/W-Emulsionen, hergestellt aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb. Der Volumenanteil der dispersen Phase der O/W-Emulsion betrug 30 %. Der Gehalt an zur Stabilisierung der Emulsionen eingesetzten Eigelbs sollte variiert werden, um die Abhängigkeit der Konzentration an grenzflächenaktiven Substanzen zu untersuchen. Da Proteine den größten Beitrag zu den Emulgiereigenschaften des Eigelbs leisten (u.a. Kiossouglou, 1983; Anton *et al.*, 1997), erfolgte die Standardisierung über den Proteinanteil in der wässrigen Phase.

4.1.5.1 Festlegung der Parameter der hitzeinduzierten Destabilisierung von Emulsionen

Vor den eigentlichen Untersuchungen zur Hitzestabilität der eigelbstabilisierten Emulsionen mussten die Parameter bezüglich des Wärmeeintrags (Temperatur) festgelegt werden. Die Beurteilung der Hitzestabilität von Lebensmittelemulsionen erfolgt in der Industrie vorwiegend qualitativ. Dabei spricht man bei einer offensichtlichen Phasentrennung von einem “Bruch“ der Emulsion (Kapitel 2.1.2). Im Rahmen der Untersuchungen sollte aber quantitativ anhand der spezifischen Grenzfläche beschrieben werden, wann eine eigelbstabilisierte O/W-Emulsion mit 30 % Ölanteil als nicht mehr hitzestabil anzusehen ist. Die Untersuchung erfolgte anhand von Emulsionen mit zwei unterschiedlichen Pro-

teingehalten in der wässrigen Phase (2 % und 0,5 %). Die entsprechenden Ergebnisse sind Bild 4.5 zu entnehmen.

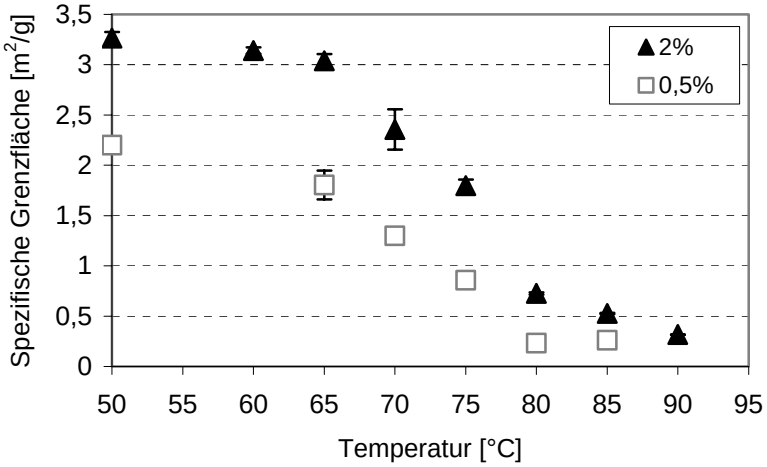


Bild 4.5: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb mit 30 % Ölanteil und 2 % bzw. 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur.

Eine erste Reduzierung der spezifischen Grenzfläche, d.h. Beeinträchtigung der Stabilität der Emulsion mit 2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase tritt nach einer Erhitzung im Bereich zwischen 65 °C und 75 °C auf. Weitere Erhitzung der Emulsion auf 80 °C bis 85 °C führt zu einer drastischen Reduzierung der spezifischen Grenzfläche. Zusätzlich sind bei diesen Temperaturen Ausflockungen sowie Phasentrennung zu erkennen (Bild 6.2, Anhang). Das bedeutet, dass die Emulsion ab einem Temperaturbereich zwischen 80 °C und 85 °C nicht mehr als intakt anzusehen ist. Die Erhitzung der Emulsion mit 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase führt bereits ab 75 °C zu einer deutlichen Trennung zwischen Öl- und Wasserphase (siehe Anhang, Bild 6.3). Die entsprechende Abnahme der spezifischen Grenzfläche bei der Erhöhung der Temperatur von 65 °C auf 75 °C verdeutlicht die nahezu vollständige Destabilisierung der Emulsion. Eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C bzw. 85 °C führt zur weiteren Reduzierung der spezifischen Grenzfläche.

Die Abnahme der spezifischen Grenzfläche hängt mit der Koaleszenz oder der Flockung der Öltropfen zusammen. Dies ist auf die hitzeinduzierte irreversible Denaturierung der an der Emulsionsgrenzfläche adsorbierten Proteine und die damit verbundene Destabilisierung des Grenzflächenfilms zurückzuführen. Wie bereits im Kapitel 2.2.5 beschrieben, liegt der kritische Bereich der Eigelbproteine bezüglich der hitzeinduzierten Denaturierung im Bereich von 70 °C bis 75 °C (Livetine und Apo-LDL) (Anton *et al*., 2000b) bzw.

ab 76 °C (Apo-HDL) (Le Denmat *et al.*, 1999). Das Phosvitin bleibt dagegen auch bei höheren Temperaturen (110° C) noch intakt. Dementsprechend finden die Destabilisierungsvorgänge in einem weiten Temperaturbereich (65 °C bis 85 °C) statt.

Somit konnte nun der qualitativen Charakterisierung der Stabilität der Emulsionen, die anhand einer visuellen Beurteilung erfolgte, eine quantitative Größe (spezifische Grenzfläche der jeweiligen Emulsion) zugewiesen werden. Demzufolge werden Emulsionen, die eine spezifische Grenzfläche von etwa 0,5 m^2/g und weniger aufweisen, als nicht mehr intakt bzw. als „gebrochen" betrachtet. Darüber hinaus wurden aufgrund der ermittelten „kritischen Temperaturbereiche" für alle weiteren Experimente bezüglich der Untersuchung der Hitzestabilität eigelbstabilisierter Emulsionen eine Hitzebehandlung bei 75 °C bzw. 85 °C herangezogen. Auf den Zusammenhang zwischen der Eigelbkonzentration und Stabilität der Emulsion soll im nächsten Kapitel eingegangen werden.

4.1.5.2 Spezifische Grenzfläche der O/W-Emulsionen

Die Emulgieraktivität des Eigelbs in einer O/W-Emulsion wurde in Abhängigkeit von der Eigelbkonzentration bestimmt. Die Standardisierung erfolgte stets anhand des Proteinanteils in der wässrigen Phase der Emulsionen. Es wurden Emulsionen mit einem Proteinanteil von 2 %, 1 %, 0,5 % und 0,1 % untersucht. Dies entspricht einem Eigelbanteil von jeweils etwa 10 %, 5 %, 2,5 % und 0,5 %. Bild 4.6 zeigt die spezifischen Grenzflächen der Emulsionen mit unterschiedlichem Proteingehalt. Dabei bedeutet eine hohe spezifische Grenzfläche kleine Öltropfen und umgekehrt.

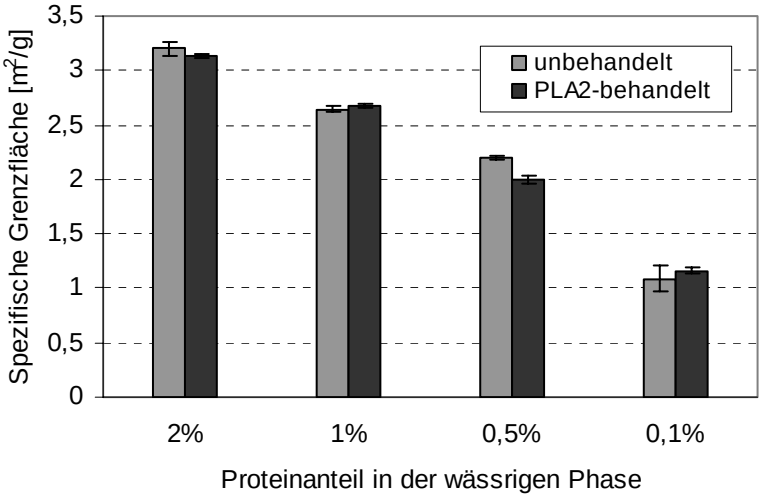


Bild 4.6: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Wie zunächst zu erkennen ist, hängt die spezifische Grenzfläche und damit die Größe der Öltropfen in den Emulsionen mit dem Eigelbgehalt in der Emulsion bzw. dem Proteingehalt in der wässrigen Phase eng zusammen. Dabei führt eine Reduzierung der Eigelbkonzentration zur Abnahme der spezifischen Grenzfläche. Dieser Effekt ist mit der Abnahme der Konzentration der grenzflächenaktiven Substanzen wie der Proteine und der Phospholipide in der Emulsion während des Emulgierens zu erklären (Mine, 1998). Die vorangegangene enzymatische Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 führt nicht zur Veränderung der spezifischen Grenzfläche der daraus hergestellten Emulsionen im Vergleich zu denen, die mit unbehandeltem Eigelb stabilisiert wurden. Dieses Ergebnis erscheint angesichts der im Kapitel 4.1.4 beschriebenen deutlichen Reduzierung der Grenzflächenspannung durch Modifizierung des Eigelbs mit PLA_2 zunächst überraschend. Allerdings hängt die Größe der Öltropfen und damit die spezifische Grenzfläche neben der Reduzierung der Grenzflächenspannung auch von anderen Faktoren ab. So spielt neben der schnellen Adsorption der grenzflächenaktiven Substanzen an der Grenzfläche auch die Ausbildung stabiler Filme an der Öltropfenoberfläche eine entscheidende Rolle (Friberg *et al*., 2004). Für diese Art der Stabilisierung sind Proteine als relativ große Biopolymermoleküle besonders von Bedeutung (Nylander, 2004). Bei einer langsameren Tropfenbildung, wie es bei der Messung der dynamischen Grenzflächenspannung der Fall ist, haben die grenzflächenaktiven Moleküle genügend Zeit, die Grenzfläche zu erreichen und zu besetzen. Dabei konkurrieren die unterschiedlichen Proteine, die im Eigelb enthalten sind, sowohl miteinander als auch mit den Phospholipiden, sofern sie separat voneinander vorliegen, um die Adsorption. Dies führt dazu, dass die vollständige Belegung der Grenzfläche zeitlich etwas verzögert wird (Mel'nikov, 2002). Da die Tropfenbildungszeiten während des Emulgierens mit Ultra-Turrax im Millisekunden-Bereich liegen, ist diese zeitliche Verzögerung der Grenzflächenstabilisierung für die Öltropfengröße ausschlaggebend. Dabei neigen die Öltropfen dazu, sofort nach der Bildung zu koaleszieren, weswegen die Grenzfläche zwischen ihnen und Wasser sehr rasch durch grenzflächenaktive Substanzen besetzt und stabilisiert werden muss. Folglich überwiegt während des Emulgierens der Effekt der verzögerten Adsorption der grenzflächenaktiven Substanzen, so dass die Fähigkeit des PLA_2-behandelten Eigelbs, die Grenzflächenspannung effektiver herabzusetzen, nicht zur Bildung von kleineren Öltropfen, verglichen mit dem unbehandeltem Eigelb, führt. So wurde bereits beschrieben, dass die enzymatische Modifikation der LDL des Eigelbs mit PLA_2 ebenfalls zu keiner Reduzierung der Öltropfengrößen in damit stabilisierten Emulsionen (Mine, 1997) führte, was die oben beschriebene Annahme bestätigen würde.

Die spezifische Grenzfläche der Emulsionen mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion und der Erhitzungstemperatur ist Bild 4.7 zu entnehmen.

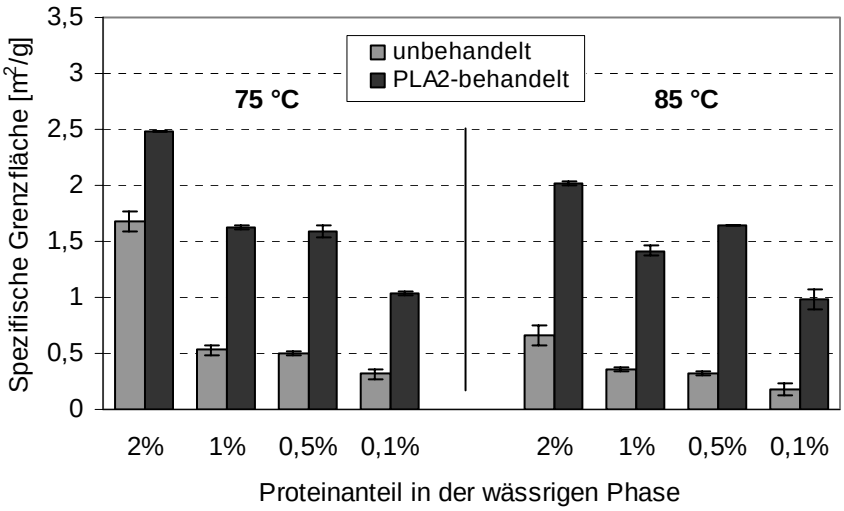


Bild 4.7: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Es ist zu erkennen, dass eine Erhitzung bei 75 °C bzw. bei 85 °C zur Reduzierung der spezifischen Grenzfläche der Emulsionen sowohl aus unbehandeltem als auch aus PLA_2-behandeltem Eigelb führt (vgl. Bild 4.6). Allerdings wird diese Abnahme durch die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 deutlich verringert. Die Eigelbkonzentration in den Emulsionen spielt dabei eine entscheidende Rolle. So weisen Emulsionen mit einem Proteinanteil von 2 %, hergestellt aus unbehandeltem Eigelb, nach der Hitzebehandlung bei 75 °C eine spezifische Grenzfläche von 1,7 m^2/g auf. Nach der Erhöhung der Erhitzungstemperatur um 10 °C beträgt die spezifische Grenzfläche der entsprechenden Emulsion nur noch 50 %. Andererseits führt die Erhitzung von Emulsionen mit einem Proteinanteil von 1 % bis 0,1 %, hergestellt aus unbehandeltem Eigelb, sowohl bei 75 °C als auch bei 85 °C zu spezifischen Grenzflächen, die jeweils unter 0,5 m^2/g liegen. Laut der im Kapitel 4.1.5.1 ermittelten Parameter sind diese Emulsionen nicht mehr intakt. Der entsprechende Bruch der Emulsionen wird den Bildern 6.4 und 6.5 im Anhang veranschaulicht. Vergleicht man nun Emulsionen, die mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisiert sind, untereinander, so ist festzustellen, dass mit sinkendem Proteinanteil die Unterschiede in der spezifischen Grenzfläche bei beiden Erhitzungstemperaturen geringer werden. Die Emulsionen mit einem Proteinanteil von 1 % und 0,5 % sind relativ unabhängig von der Erhitzungstemperatur. Darüber hinaus werden Emulsionen, die 0,1 %

Protein in der wässrigen Phase enthalten, durch die Hitzebehandlung nicht beeinträchtigt, wie ein Vergleich mit der spezifischen Grenzfläche der entsprechenden nicht erhitzten Emulsionen zeigt. Dementsprechend können die Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb auch bei einer visuellen Beurteilung als völlig intakt beschrieben werden (Bilder 6.4 und 6.5 im Anhang).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration an grenzflächenaktiven Substanzen in der Emulsion einen direkten Einfluss sowohl auf die spezifische Grenzfläche als auch auf die Hitzestabilität der eigelbstabilisierten Emulsionen hat. Welche Rolle dabei die einzelnen Eigelbbestandteile spielen, wird im nächsten Kapitel anhand der Untersuchung der Belegung, der Zusammensetzung und der Struktur der Grenzfläche analysiert.

4.1.6 Einfluss auf die Zusammensetzung und Struktur der Emulsionsgrenzfläche

4.1.6.1 Proteingrenzflächenbelegung

Wie bereits beschrieben (2.2.4), leisten Eigelbproteine den größten Beitrag zu den Emulgiereigenschaften des Eigelbs. Folglich ist die Untersuchung der Belegung der Emulsionsgrenzfläche mit Proteinen ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Emulgiereigenschaften. Die Proteingrenzflächenbelegung von Emulsionen in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase und Behandlung des Eigelbs ist im Bild 4.8 dargestellt.

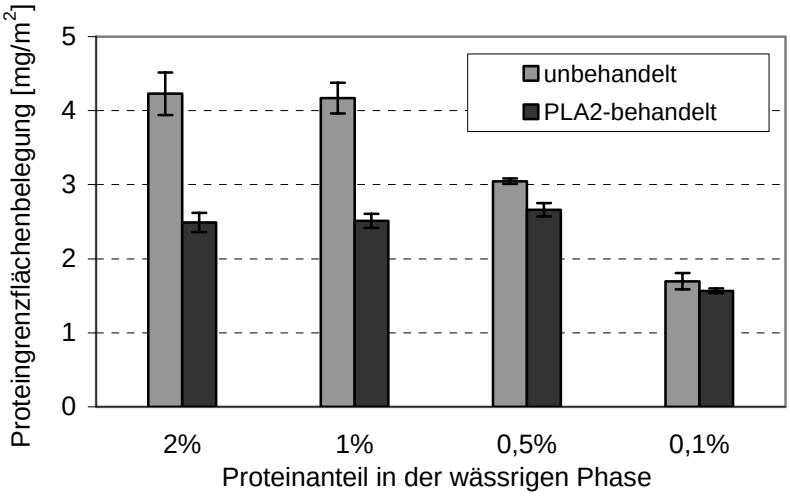


Bild 4.8: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Betrachtet man zunächst nur die Belegung der Grenzfläche mit Proteinen in den Emulsionen, die mit unbehandeltem Eigelb stabilisiert sind, so nimmt diese mit der Zunahme des Proteinanteils von 0,1 % bis 1 % stetig zu. Allerdings führt eine Verdoppelung des Proteinanteils von 1 % auf 2 % zu keiner weiteren Erhöhung der Proteingrenzflächenbelegung. Offenbar wird bei einer Grenzflächenbelegung von ca. 4,2 mg/m^2 eine Sättigung der Grenzfläche mit Proteinen erreicht. Zwar können bei einem Überangebot an Proteinen auch weiterhin neue Schichten an die Öltropfen anlagern, jedoch docken sie praktisch nur an die Außenschicht an und können so leicht beim Waschvorgang während der Abtrennung der Grenzfläche von der kontinuierlichen Phase abgewaschen werden (vgl. Kapitel 3.5.4.1). Die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 resultiert in einer deutlichen Abnahme der Proteingrenzflächenbelegung. Die Abnahme macht sich insbesondere in Emulsionen mit höheren Proteinanteilen (2 % und 1 %) bemerkbar und beträgt, verglichen mit Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb, etwa 50 %. Auch die Sättigungskonzentration der Grenzfläche mit Proteinen liegt mit etwa 2,5 mg/m^2 deutlich unter dem Wert, der in Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb beobachtet werden konnte. Insgesamt geht aber die Differenz zwischen den Emulsionen (hergestellt aus unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb) in Bezug auf die Grenzflächenbelegung mit der Abnahme der verfügbaren Proteine zurück, so dass zwischen den beiden Emulsionen mit 0,1 % Proteinanteil kein Unterschied in der Proteingrenzflächenbelegung nachweisbar war. Die Zusammensetzung der Proteine im Grenzflächenfilm und in der kontinuierlichen Phase wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (Bild 4.9).

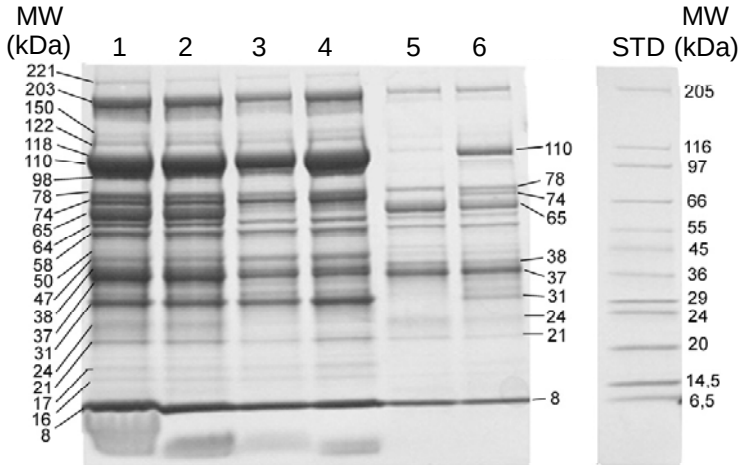


Bild 4.9: Zusammensetzung der Proteine in unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem (PLA_2-beh.) Eigelb sowie der dispersen (disp.) und der kontinuierlichen (kont.) Phasen der daraus hergestellten O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil und 2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase. Bahn 1: unbeh. Eigelb; 2: PLA_2-beh. Eigelb; 3: disp. Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 4: disp. Phase der Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb; 5: kont. Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 6: kont. Phase der Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb. SDS-PAGE wurde nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa:Kilodalton; STD: Standard.

Die einzelnen Proteine wurden anhand eigener Ergebnisse zur Zusammensetzung der Eigelbproteine (vgl. Kapitel 3.3.2.3) identifiziert. Betrachtet man die Verteilung einzelner Proteine, so sind alle Granulaproteine an der Grenzfläche vertreten, unabhängig davon, ob das Eigelb vorher mit PLA_2 behandelt wurde oder nicht. Bei den Plasmaproteinen sind die wasserlöslichen Livetine (α: 50 kDa; β: 24 & 37 kDa; γ: 65 & 118 kDa) nicht an der Emulsionsgrenzfläche adsorbiert. Lediglich das α-Livetin (78 kDa) ist wie alle Apo-LDL des Plasmas sowohl an der Grenzfläche als auch in der wässrigen Phase anzutreffen. Generell sind in der kontinuierlichen Phase der mit unbehandeltem Eigelb stabilisierten Emulsion hauptsächlich Plasmaproteine nachweisbar. Die einzige Ausnahme bildet das Phosvitin, das sowohl an der Grenzfläche als auch in der wässrigen Phase zu finden ist. Zusätzlich ist zu erkennen, dass nach der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 zahlreiche Granulaproteine, wie Apo-HDL (31 kDa, 74 kDa und 110 kDa), in der kontinuierlichen Phase der Emulsion verblieben sind.

Wie oben bereits beschrieben, hängt die Belegung der Grenzfläche mit Proteinen von deren Konzentration in der Emulsion ab. Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Zusammensetzung der Proteine, die an der Grenzfläche adsorbiert werden, ist im Bild 4.10 dargestellt. Zur besseren Überschaubarkeit wurden nur die mengenmäßig wichtigen Proteine gekennzeichnet (vgl. Bild 4.9, links).

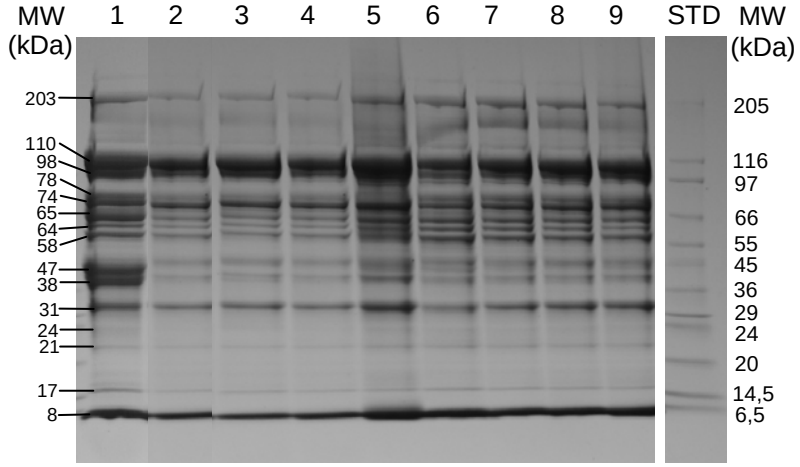


Bild 4.10: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (in der dispersen Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, hergestellt mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2–5: Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb jeweils mit 2 % (Bahn 2); 1% (3); 0,5 % (4) und 0,1 % (5) Proteinanteil in der wässrigen Phase; 6–9: Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb jeweils mit 2 % (6); 1% (7); 0,5 % (8) und 0,1 % (9) Proteinanteil in der wässrigen Phase. SDS-PAGE wurde nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard.

Wie man erkennen kann, hat die Reduzierung des Proteingehaltes keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von Emulsionen aus unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb.

Anhand der Veränderung der Proteinzusammensetzung in der kontinuierlichen Phase der Emulsionen (Bild 4.9) kann man erkennen, dass der Aufbruch der Granulapartikel durch Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 (vgl. Kapitel 4.1.2) mit der Erhöhung der Löslichkeit der Granulaproteine verbunden ist. Wie man feststellen konnte, werden die Granulaproteine aber unabhängig von der Vorbehandlung des Eigelbs an der Grenzfläche adsorbiert. Allerdings ist davon auszugehen, dass durch den Aufbruch kleinere Granulapartikel die Grenzfläche belegen, so dass der absolute Proteingehalt zurückgeht. Damit ist insgesamt eine dünnere Belegung realisierbar, was zu einer geringeren Proteingrenzflächenbelegung führt (Bild 4.8).

Im Bild 4.11 ist die Proteingrenzflächenbelegung von Emulsionen, hergestellt aus unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C dargestellt. Da bei beiden Temperaturen die Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb mit einem Proteinanteil von 1 % bis 0,1 % brachen (vgl. Kapitel 4.1.5.2), konnte in diesen Emulsionen keine Proteingrenzflächenbelegung bestimmt werden.

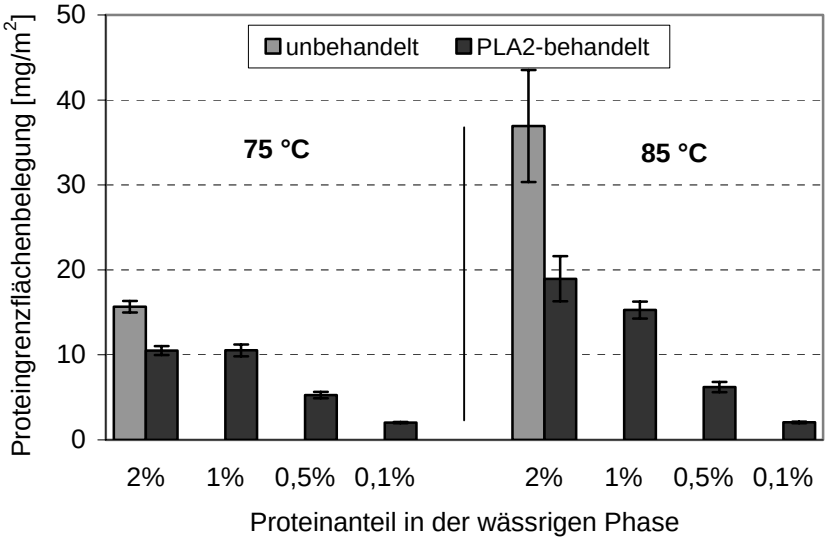


Bild 4.11 Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Es fällt sofort auf, dass die Erhitzung der Emulsionen zu einer deutlichen Steigerung der Proteingrenzflächenbelegung führt (vgl. Bild 4.8). Dieser Effekt ist mit der Aggregation

der Proteine an der Grenzfläche zu erklären. Die durch die hitzeinduzierte Auffaltung der Proteine exponierten Proteinseitenketten an der Grenzfläche führen zur Verstärkung der Wechselwirkungen mit den nicht adsorbierten Proteinen in der kontinuierlichen Phase, die dann ebenfalls an den Grenzflächenfilm andocken (vgl. auch Kapitel 2.2.6). Dadurch wird auch die Dicke des Grenzflächenfilms erhöht. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass die vorhergehende Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 eine deutlich geringere Belegung der Proteine an der Grenzfläche bewirkt. Demnach verhindert die Hydrolyse der Phospholipide bzw. das Vorhandensein der Lyso-Phospholipide zumindest teilweise die Aggregationsvorgänge an der Grenzfläche, so dass weniger Aggregate zwischen den nicht adsorbierten und an der Emulsionsgrenzfläche adsorbierten Proteinen entstehen.

Die Proteinzusammensetzung an der Grenzfläche nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C (Bild 4.12) und 85 °C (Bild 4.13) wird anhand von nicht reduzierender SDS-PAGE, d.h. ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol, dargestellt.

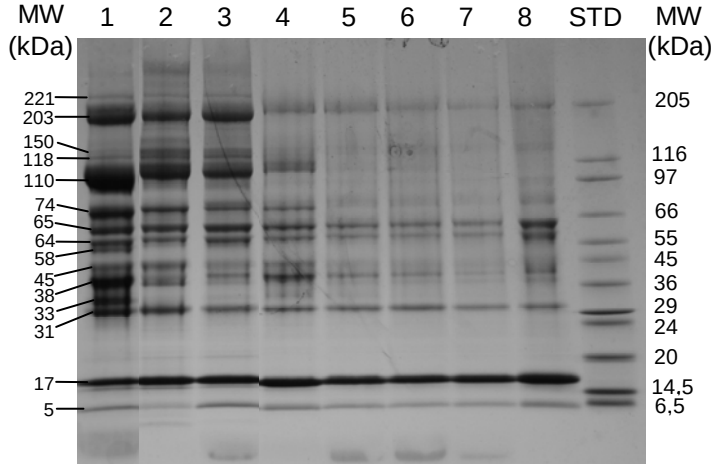


Bild 4.12: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (disperse Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Hitzebehandlung bei 75 °C, hergestellt aus unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem (PLA_2-beh.) Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2: Emulsion aus unbeh. Eigelb, 2 % Proteinanteil; 3: Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb, 2%; 4: Emulsion aus unbeh. Eigelb, 2 %, 75°C; 5–8: Emulsionen aus PLA_2-beh. Eigelb, erhitzt bei 75 °C, jeweils mit 2% (Bahn 5); 1 % (6); 0,5 % (7) und 0,1 % (8). SDS-PAGE wurde ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (nicht reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass hier keine Spaltung von Disulfidbrücken zwischen den Proteinen erfolgt. Da die thermisch induzierte Denaturierung der Proteine mit Ausbildung neuer Disulfidbrücken verbunden ist (Ternes, 2008), kann dadurch eine indirekte Aussage über das Aggregationsverhalten dieser Proteine bei höheren Temperaturen gemacht werden. Zunächst kann festgehalten werden, dass durch die

Erhitzung sowohl die Intensität als auch die Anzahl der im Gel sichtbaren Proteine abnimmt. Der Grund dafür ist die hitzeinduzierte Aggregation der hitzelabilen Proteine an der Grenzfläche. Durch Ausbildung von Aggregaten nimmt die Größe der Proteine derart zu, dass sie nicht mehr ins Gel wandern können. So zeigen sich Apo-LDL (221 kDa) und γ-Livetine (203 kDa) in Übereinstimmung mit Le Denmat *et al*. (1999) und Guilmineau *et al.* (2005) als besonders hitzelabil. Aber auch die Banden von Apo-HDL (110 und 74 kDa) verlieren an Intensität. Insgesamt fällt auf, dass die Hitzestabilität mit der Abnahme der Molekülmasse der jeweiligen Proteinfraktion zunimmt, was sicherlich mit der Abnahme der bindungsfähigen Stellen bei kleineren Molekülen zusammenhängt. So zeigen die Proteine mit der Molekülmasse von 5 bis 65 kDa keinerlei hitzebedingte Effekte. Die Proteinzusammensetzung in der dispersen Phase der bei 75 °C erhitzten Emulsionen mit 2 % Proteinanteil ist zusätzlich davon abhängig, ob zur Stabilisierung der Emulsion unbehandeltes oder PLA_2-behandeltes Eigelb verwendet wurde. So sind die Granulaproteine (110 und 74 kDa) auf der Bahn 4 (Emulsion aus unbehandeltem Eigelb) noch deutlich zu erkennen, während sie auf der Bahn 5 (Emulsion aus PLA_2-behandeltem Eigelb) nicht mehr sichtbar sind. Dabei ist berichtet worden, dass die Granulaproteine, wie Apo-HDL, noch bei einer Erhitzung bis 80 °C hitzestabil bleiben (Anton *et al*., 2000; Daimer und Kulozik, 2008). Offenbar führt der Aufbruch der granulären Strukturen dazu, dass die Hitzestabilität der Granulaproteine und insbesondere von Apo-HDL herabgesetzt wird. Im Bild 4.13 ist die Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche nach einer Hitzebehandlung der Emulsion bei 85 °C dargestellt.

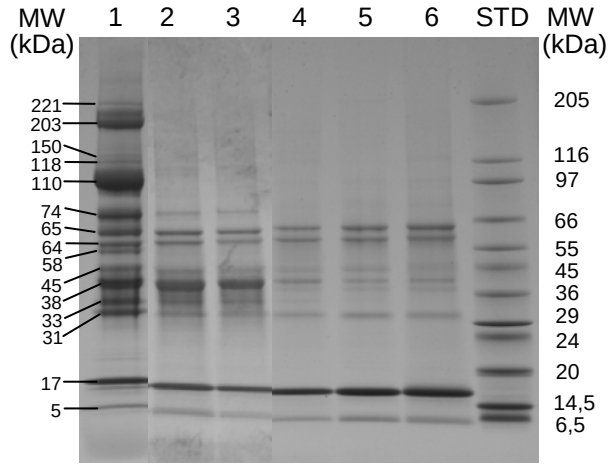


Bild 4.13: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (disperse Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Hitzebehandlung bei 85 °C, hergestellt mit unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem (PLA_2-beh.) Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2: disperse Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 3–6: disperse Phase der Emulsionen aus PLA_2-beh. Eigelb mit 2 % (3); 1 % (4); 0,5 % (5); 0,1% (6). SDS-PAGE wurde ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (nicht reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard.

Betrachtet man zunächst nur die Bahnen 2 und 3, so stimmen die Proteinzusammensetzungen der dispersen Phasen in den Emulsionen aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb mit 2 % Proteinanteil überein. Vergleicht man die Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen untereinander, so ist der Zusammenhang zwischen der Eigelbkonzentration in den Emulsionen und der Hitzestabilität der an der Grenzfläche adsorbierten Proteine bei höheren Temperaturen (85 °C) deutlich zu erkennen. So verschwinden z.B. die Banden von Apo-HDL (74 kDa und 33 kDa) sowie von Phosvitin (38 kDa) mit der Reduzierung der Proteinkonzentration in den Emulsionen (Bahnen 3–6). Es scheint, dass mit der Abnahme der Proteinkonzentration in den Emulsionen die Granulaproteine, Apo-HDL und Phosvitin sensibler gegenüber Hitzeeinwirkung reagieren. Die Plasmaproteine wie γ-Livetin (65 kDa) und Apo-LDL (64 kDa), aber vor allem die Apo-LDL mit niedrigen Molekülmassen (17 kDa und 5 kDa) scheinen durch die Hitzebeanspruchung nicht beeinträchtigt zu werden und sind somit mit der Abnahme der Eigelbkonzentration in der Emulsion hauptsächlich für die Stabilität der Grenzfläche verantwortlich.

4.1.6.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung

Die Belegung der Grenzfläche der O/W-Emulsionen aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb mit Phospholipiden ist im Bild 4.14 dargestellt.

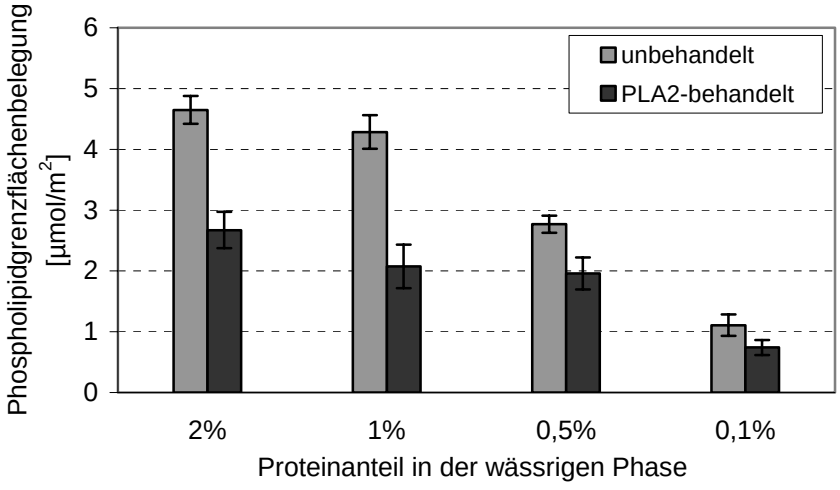


Bild 4.14: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Da sich die Molekülmassen der Phospholipide durch die Abspaltung einer Fettsäure bei der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 verringern, wird die Belegung der Grenzfläche mit

Phospholipiden in µmol/m^2 angegeben, so dass sich die Angaben auf die vergleichbare Anzahl von Molekülen beziehen. Wie man Bild 4.14 entnehmen kann, ist die Belegung der Grenzfläche mit Phospholipiden mit der Proteingrenzflächenbelegung der entsprechenden Emulsionen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in der wässrigen Phase nahezu identisch (vgl. Bild 4.8). Das gilt für Emulsionen sowohl aus unbehandeltem als auch aus PLA_2-behandeltem Eigelb. Auch die Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C führt zu einer deutlichen Zunahme der Belegung der Grenzfläche mit Phospholipiden (Bild 4.15).

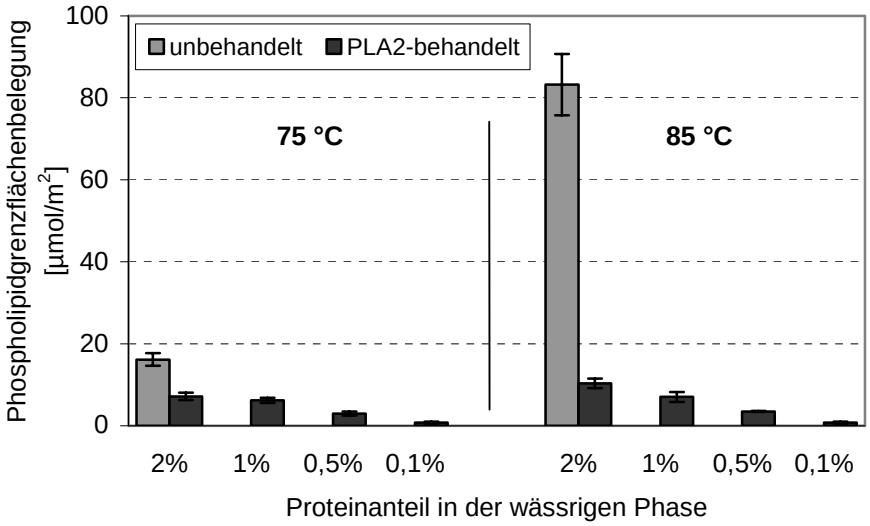


Bild 4.15: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Die Tatsache, dass sich die Phospholipidgrenzflächenbelegung ändert, und zwar in der gleichen Art und Weise wie die der Proteine, kann damit erklärt werden, dass sich die Phospholipide im Verbund mit Proteinen als ein Protein-Phospholipid-Komplex an die Grenzfläche anlagern. Die enzymatische Modifizierung der Phospholipide bewirkt sowohl vor als auch nach der Erhitzung der Emulsionen eine deutliche Abnahme der Phospholipidgrenzflächenbelegung. Auch in diesem Fall kann von einem direkten Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Proteine und der Phospholipide an der Grenzfläche ausgegangen werden (vgl. Bild 4.11). Die Annahme wird zusätzlich durch die Darstellung des Verhältnisses der Proteine zu Phospholipiden an der Grenzfläche bestätigt (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Verhältnis der Massen (w/w) zwischen den Proteinen und Phospholipiden an der Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit unterschiedlichem Proteingehalt in der wässrigen Phase, hergestellt aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb

Eigelb in der Emulsion	Behandlung der Emulsion	Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion			
		2 %	1 %	0,5 %	0,1 %
unbehandelt	nicht erhitzt	1,2	1,3	1,5	2,0
	erhitzt bei 75 °C	1,2	-	-	-
	erhitzt bei 85 °C	0,9	-	-	-
PLA_2-behandelt	nicht erhitzt	1,8	2,0	2,8	4,0
	erhitzt bei 75 °C	2,7	3,2	3,4	5,4
	erhitzt bei 85 °C	3,5	3,7	3,5	5,0

Dabei handelt es sich um Massenverhältnisse beider Substanzen. Deswegen ist die Erhöhung des Verhältnisses zwischen Proteinen und Phospholipiden an der Grenzfläche der aus PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen mit der Abnahme der Molekülmasse der Phospholipide nach der Abspaltung einer Fettsäure verbunden. Wie man Tabelle 4.3 entnehmen kann, bleibt das Verhältnis zwischen den Proteinen und Phospholipiden an der Grenzfläche der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb, unabhängig von der Proteinkonzentration in der wässrigen Phase der Emulsionen, konstant. Auch nach der Erhitzung der Emulsion bei 75 °C und 85 °C bleibt dieses Verhältnis nahezu unverändert. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, dass Proteine und Phospholipide des Eigelbs als ein Komplex an der Grenzfläche adsorbiert werden. Ob solche Komplexe auch an der Grenzfläche von Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb gebildet werden, geht aus der Tabelle 4.3 nicht ganz eindeutig hervor. Allerdings ist hier deutlich zu erkennen, dass das Protein-Phospholipid-Verhältnis unabhängig vom Proteinanteil in der wässrigen Phase konstant bleibt. Eine Ausnahme bildet die Emulsion mit 0,1 % Proteinanteil. Vermutlich hängt es damit zusammen, dass aufgrund des Mangels an grenzflächenaktiven Substanzen auch Proteine adsorbiert werden, die bei höherer Proteinkonzentration hauptsächlich in der kontinuierlichen Phase verbleiben. Dazu zählen z.B. die Livetine oder das Phosvitin, die allerdings keine Komplexe mit Phospholipiden ausbilden. Somit nimmt das Verhältnis zwischen den Proteinen und Phospholipiden in den Emulsionen mit niedrigem Proteinanteil (0,1 %) zu.

4.1.6.3 Belegung der Grenzfläche mit freien Fettsäuren

Die Belegung der Grenzfläche von O/W-Emulsionen aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb mit freien Fettsäuren (FFS) ist im Bild 4.16 dargestellt.

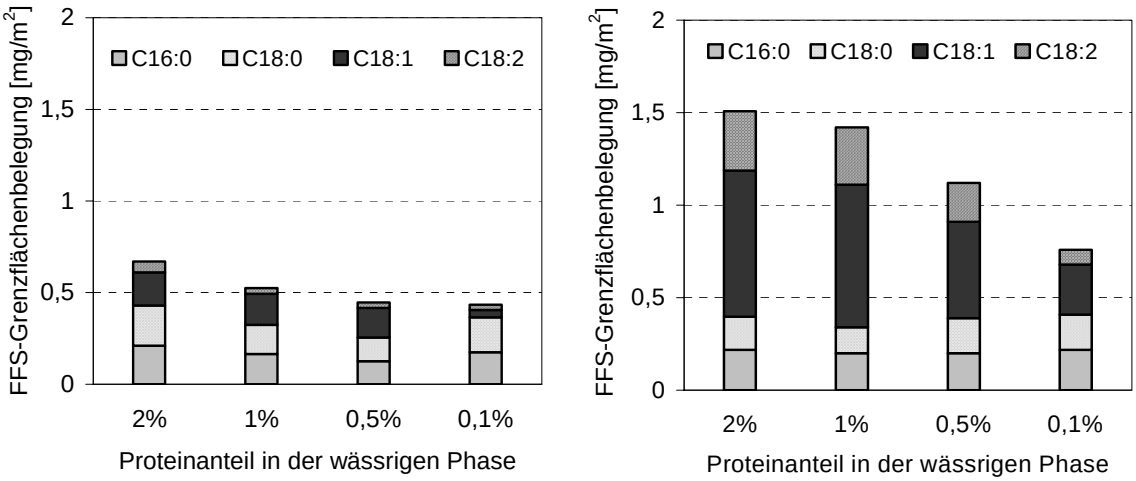


Bild 4.16: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem (links) bzw. PLA_2-behandeltem (rechts) Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. Fettsäuren sind im Einzelnen: C16:0: Palmitinsäure (gesättigt); C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure (ungesättigt); C18:2: Linolsäure (ungesättigt).

Der Vergleich beider Grafiken im Bild 4.16 zeigt, dass die PLA_2-Behandlung des Eigelbs zu einer deutlichen Zunahme der Belegung der Emulsionsgrenzfläche aller Emulsionen mit FFS führt. Bei der Betrachtung der freien Fettsäuren im Einzelnen kann man erkennen, dass die Zunahme der Gesamtbelegung der Grenzfläche mit FFS hauptsächlich auf die Erhöhung der Grenzflächenbelegung mit ungesättigten FFS zurückzuführen ist, während die Grenzflächenbelegung der gesättigten FFS nahezu unverändert bleibt. Das hängt damit zusammen, dass während der Hydrolyse der Eigelbphospholipide hauptsächlich ungesättigte sn_2-Fettsäuren abgespalten werden (vgl. Kapitel 2.3.2.2).

Somit konnte gezeigt werden, dass die enzymatisch freigesetzten Fettsäuren ebenso wie Proteine und Phospholipide an der Grenzfläche adsorbiert werden, wodurch deren relativ hohe Grenzflächenaktivität (Belitz *et al*., 2005) bestätigt werden kann. Bei der Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase nimmt auch die Grenzflächenbelegung der FFS ab. Dabei ist die Belegung der Grenzfläche mit FFS mit der Phospholipid- und Proteingrenzflächenbelegung der entsprechenden Emulsionen, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in der wässrigen Phase (Bild 4.8 und Bild 4.14), tendenziell vergleichbar. Dieser Vergleich lässt vermuten, dass die FFS nicht einzeln, sondern im Verbund mit Proteinen und Phospholipiden bzw. Lyso-Phospholipiden an der Grenzfläche adsorbiert werden. So vermutete Mine (1997), dass dieser Protein-Lyso-Phospholipide-FFS-Komplex an der Grenzfläche von Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb für deren Hitzestabilität verantwortlich ist. Allerdings blieb die Rolle der FFS in diesem

Komplex unklar. Daher war es wichtig zu untersuchen, ob die FFS auch nach der Erhitzung der Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb an der Grenzfläche vorzufinden waren. Die entsprechenden Ergebnisse sind Bild 4.17 zu entnehmen.

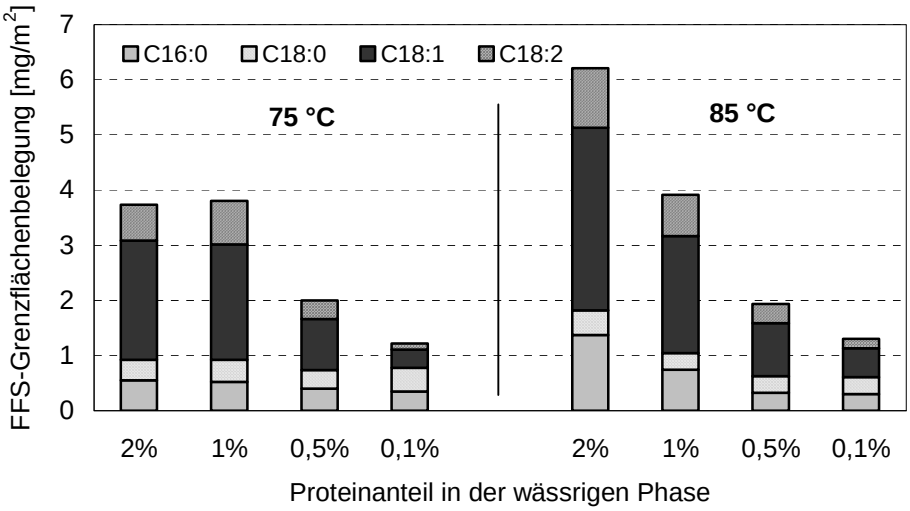


Bild 4.17: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure; C18:2: Linolsäure (ungesättigt).

Insgesamt nimmt die Belegung der Grenzfläche mit FFS in allen Emulsionen nach der Erhitzung bei beiden Temperaturen zu. Dabei bleibt die Belegung mit ungesättigten Fettsäuren nach der Erhitzung bei 75 °C unabhängig vom Proteinanteil in der wässrigen Phase unverändert. Denselben Effekt kann man bei den Emulsionen mit 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil nach der Erhitzung bei 85 °C beobachten. Lediglich in den bei 85 °C erhitzten Emulsionen mit 2 % und 1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase nimmt die Grenzflächenbelegung mit Stearinsäure (18:0), einer gesättigten Fettsäure, um das Doppelte zu. Trotzdem ist die Erhöhung der Gesamtbelegung der Grenzfläche mit FFS hauptsächlich auf die Zunahme des Gehaltes an ungesättigten FFS zurückzuführen. Mit der Reduzierung des Proteinanteils in den Emulsionen nimmt die Gesamtgrenzflächenbelegung mit FFS aller Emulsionen ab. Eine Ausnahme bilden die bei 75 °C erhitzten Emulsionen mit 2 % und 1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase, in denen die Senkung des Proteinanteils zu keiner nennenswerten Veränderung der Grenzflächenbelegung mit FFS führte.

Anhand des Vergleichs der hitzebedingten Änderung der FFS-Grenzflächenbelegung mit den Änderungen der Protein- und Phospholipidgrenzflächenbelegung der entsprechenden Emulsionen (vgl. Bild 4.11 und Bild 4.15) lässt sich vermuten, dass der bereits

beschriebene Protein-Lyso-Phospholipide-FFS-Komplex auch nach der Erhitzung der Emulsionen bestehen bleibt. Die Frage, welche Rolle die FFS im Einzelnen für Hitzestabilität dieses Komplexes spielen, kann allerdings anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden.

4.1.6.4 Struktur der Emulsionsgrenzfläche

Eine Möglichkeit, die Verteilung der Substanzen, die an der Oberfläche der Öltropfen adsorbiert werden, visuell beurteilen zu können, bietet die konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM). Die CLSM-Technik ermöglicht einen optischen Schnitt durch die Emulsion. Dabei erscheint das Innere des Öltropfens schwarz und der Grenzflächenfilm an der Oberfläche des Öltropfens kann angefärbt werden. Durch die selektive Anfärbung der Proteine und der Phospholipide ist man in der Lage, die beiden Substanzen an der Öltropfenoberfläche zu unterscheiden. Bei der in dieser Arbeit angewendeten Anfärbung (siehe auch 3.5.6) erscheinen Proteine grün und Phospholipide rot. Die Ergebnisse der CLSM-Untersuchung der aus unbehandeltem bzw. mit PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen (2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase) mit und ohne Erhitzung sind im Bild 4.18 dargestellt.

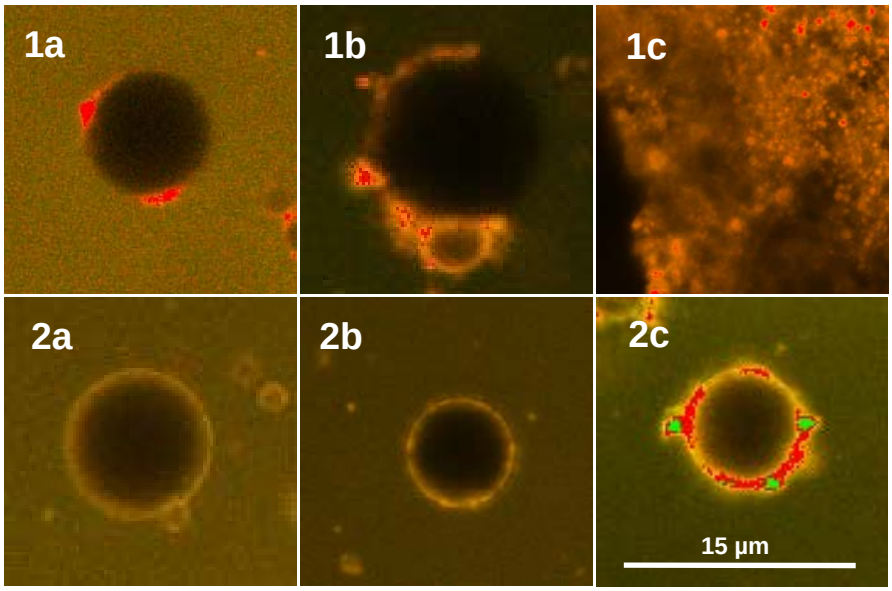


Bild 4.18: CLSM-Aufnahmen von Öltropfen einer O/W-Emulsion mit 30 % Ölanteil und 2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase, hergestellt aus unbehandeltem (1) und PLA_2-behandeltem (2) Eigelb. Vor (a) und nach der Erhitzung bei 75 °C (b) und 85 °C (c). Folgende Substanzen sind markiert: Proteine (grün), Phospholipide (rot); Protein-Phospholipid-Komplex erscheint durch Überlappung von grün und rot als orange.

Betrachtet man zunächst CLSM-Aufnahmen der beiden nicht erhitzten Emulsionen (Bild 4.18 1a und 2a) so fällt auf, dass der Grenzflächenfilm orange ist. Diese Färbung kommt durch eine Überlagerung der roten und grünen Farbmarkierungen zustande und gibt einen Hinweis darauf, dass Proteine und Phospholipide als ein Komplex an der Emulsionsgrenzfläche adsorbiert werden. Das bestätigt die Annahmen aus den Untersuchungen zur Grenzflächenbelegung im vorangegangenen Abschnitt. Allerdings sind zwischen den Emulsionen offensichtliche Unterschiede in der Erscheinung, je nachdem, ob sie mit unbehandeltem oder PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisiert sind, erkennbar. So erscheint der Grenzflächenfilm um den Öltropfen in der Emulsion aus unbehandeltem Eigelb (1a) uneben und bruchstückhaft. Dagegen ist dieser bei der Emulsion aus PLA_2-behandeltem Eigelb (1b) deutlich homogener und gleichmäßiger, wobei auch die Dicke des Filmes im Vergleich zum unbehandelten Eigelb etwas zunimmt. Es sind auch keine Phospholipidaggregate wie in den Emulsionen mit unbehandeltem Eigelb zu erkennen. Vermutlich hängt die Änderung der Struktur des Grenzflächenfilms nach der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 damit zusammen, dass Granulaproteine, die vor der enzymatischen Behandlung des Eigelbs in aggregierter Form an der Grenzfläche adsorbiert werden, durch das Enzym teilweise aufgebrochen werden und sich dadurch besser in den Grenzflächenfilm integrieren können.

Besonders deutlich wird der Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 auf die Grenzflächenstruktur nach der Erhitzung der Emulsionen. Bereits eine Hitzeeinwirkung von 75 °C verursacht eine deutlich sichtbare Destabilisierung des Grenzflächenfilms am Öltropfen in der Emulsion aus unbehandeltem Eigelb (1b). Zum einen sieht man Aggregatbildungen, wodurch es zu einer Zunahme der Dicke des Grenzflächenfilms kommt. Andererseits ist der Grenzflächenfilm an einigen Stellen so dünn, dass er die Auflösungsgrenze der CLSM (ca. 300 nm) unterschreitet und somit auf den CLSM-Aufnahmen nicht mehr sichtbar ist. Dagegen ist der Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex an der Grenzfläche der aus PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsion auch nach der Erhitzung bei 75 °C noch völlig intakt und bedeckt vollständig die Tropfenoberfläche. Erhitzt man die aus unbehandeltem Eigelb hergestellte Emulsion auf 85 °C, so führt dies zu einer Ausflockung der Proteine, die somit als Emulgator nicht mehr zur Verfügung stehen. Verwendet man aber PLA_2-behandeltes Eigelb zur Emulsionsherstellung, so aggregieren die Proteine an der Grenzfläche beim Erhitzen auf 85 °C zwar ebenso, bedecken aber dennoch die Grenzschicht im Verbund mit Lyso-Phospholipiden gleichmäßig und stabilisieren die Emulsion auch bei Hitzeeinwirkung. Das bedeutet, dass der Komplex

aus Proteinen und Lyso-Phospholipiden auch bei hohen Temperaturen intakt bleibt, was auf feste Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Komponenten schließen lässt.

4.1.6.5 Ladung der Emulsionsgrenzfläche

Um das Gesamtbild über den Zustand der Emulsionsgrenzfläche und die Auswirkungen der enzymatischen Modifizierung mit PLA_2 darauf zu vervollständigen, wurde die Ladung der Grenzfläche mittels ζ-Potential bestimmt (Bild 4.19).

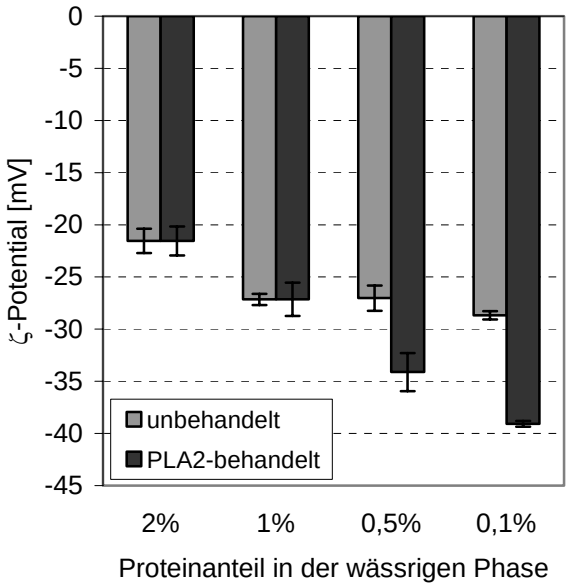


Bild 4.19: ζ-Potential der Emulsionsgrenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Zunächst kann festgestellt werden, dass das ζ-Potential aller Emulsionen im negativen Bereich liegt. Das bedeutet, dass die Grenzflächen der Emulsionen negativ geladen sind. Eine Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase der Emulsion von 2 % auf 1 % führt zu einer geringfügigen Abnahme des ζ-Potentials, d.h. zur Zunahme der negativen Ladung. Allerdings bleibt die Ladung der Grenzfläche bei einer weiteren Herabsetzung der Eigelbkonzentration konstant. In den Emulsionen mit 2 % und 1 % wird die Grenzflächenladung durch die PLA_2-Behandlung des Eigelbs nicht beeinflusst. Die entsprechenden Emulsionen mit dem Proteinanteil von 0,5 % und 0,1 % weisen dagegen eine etwas niedrigere Ladung auf.

Die Ladung der Grenzfläche eigelbstabilisierter Emulsionen hängt im Wesentlichen von der Ladung der an der Grenzfläche adsorbierten Proteine ab (Le Denmat *et al.*, 2000).

Diese können in Abhängigkeit vom isolektrischen Punkt (IP) und Milieubedingungen, wie pH-Wert und Ionenstärke, positiv oder negativ geladen sein (Le Denmat *et al*., 2000). Dabei liegt der IP der Apo-LDL zwischen pH 6,5 und 7,3 (Kojima und Nakamura, 1985), der der Livetine zwischen pH 4,3 und 7 (Ternes, 1989) und der des Phosvitins bei pH 1,9 bis 4,4 (Ternes, 1989). Der IP von Apo-HDL liegt im Bereich von pH 8 bis 9 (Nilsson *et al*., 2007). Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den Milieubedingungen in den Emulsionen (pH 7 und Inonenstärke 0,17 M) weder die Apo-LDL noch die Apo-HDL eine Nettoladung aufweisen und deswegen keinen direkten Einfluss auf den Wert des ζ-Potentials haben. Folglich sind die ebenfalls adsorbierten Livetine und vor allem das Phosvitin, das im neutralen pH-Bereich mit –179 mV eine sehr hohe negative Ladungsdichte besitzt (Anton, 2007c), für die negative Ladung der Grenzfläche verantwortlich. Damit würde sich auch die Herabsetzung des ζ-Potentials nach der Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase der Emulsion erklären. Denn sowohl das Phosvitin als auch die Livetine sind grenzflächenaktiv, werden aber bei einem Überangebot an grenzflächenaktiven Substanzen leicht von der Grenzfläche verdrängt (Mine, 1998a; Anton und Gandemer, 1999). Reduziert man aber den Gehalt an Eigelbproteinen bei gleich bleibendem Ölanteil, so werden auch mehr Phosvitin und Livetine an der Oberfläche der Öltropfen adsorbiert und können dadurch die Ladung der Grenzfläche herabsetzen. Darüber hinaus bewirkt PLA_2 einen Aufbruch der Granulapartikel, der mit Dissoziation von HDL und Phosvitin verbunden ist (Daimer und Kulozik, 2008). Dadurch wird die Adsorption von Phosvitin begünstigt, was schließlich zur Herabsetzung der Gesamtladung der Grenzfläche führt. Inwiefern dies Auswirkungen auf die Stabilität der grenzflächenstabilisierenden Membran in den Emulsionen hat, wird im nächsten Kapitel erläutert.

4.1.6.6 Stabilität des Grenzflächenfilms

Eine Möglichkeit, die Stabilität des grenzflächenstabilisierenden Films zu beurteilen, ist die Bestimmung des extrahierbaren Fettanteils einer Emulsion. Dabei wird die Emulsion mit einem Lösungsmittel (Petroleumbenzin) versetzt. Es gilt, je dichter und stabiler der Grenzflächenfilm ist, desto weniger Lösungsmittel kann dadurch zur dispersen Phase durchdringen und das Fett bzw. das Öl aus dem Öltropfen extrahieren. Wie im Bild 4.20 zu erkennen ist, nimmt der Anteil des extrahierbaren Fettes mit der Reduzierung der Eigelbkonzentration in den Emulsionen zu. Das kann mit der Abnahme der Konzentration an verfügbaren grenzflächenaktiven Substanzen an der Grenzfläche und

der damit verbundenen Reduzierung der Dicke und der Stabilität des Grenzflächenfilms erklärt werden. Die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 bewirkt offensichtlich eine Erhöhung der Stabilität des Grenzflächenfilms, wie man anhand von Emulsionen mit 1 % und 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase erkennen kann. Die Tatsache, dass die Belegung der Grenzfläche mit Proteinen und Phospholipiden nach der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 zurückgeht (vgl. Bild 4.8 und Bild 4.14), verdeutlicht noch einmal, dass nicht nur die Dicke, sondern auch die Struktur des Grenzflächenfilms für dessen Stabilität verantwortlich ist.

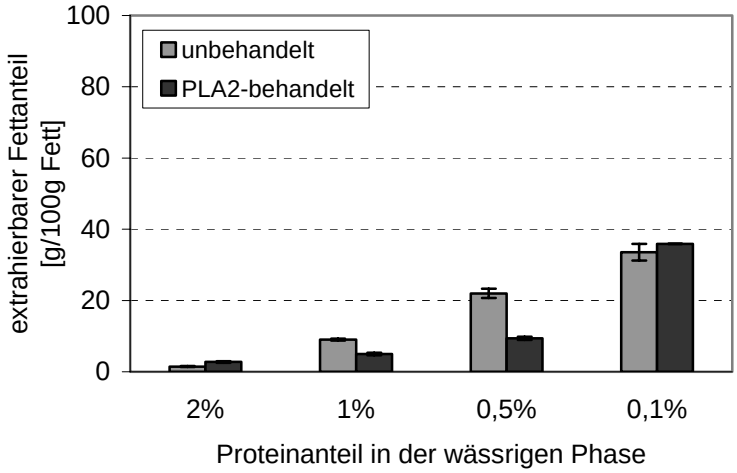


Bild 4.20: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase.

Besonders deutlich wird der positive Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 auf die Stabilität des Grenzflächenfilms bei der Erhitzung der Emulsionen (Bild 4.21).

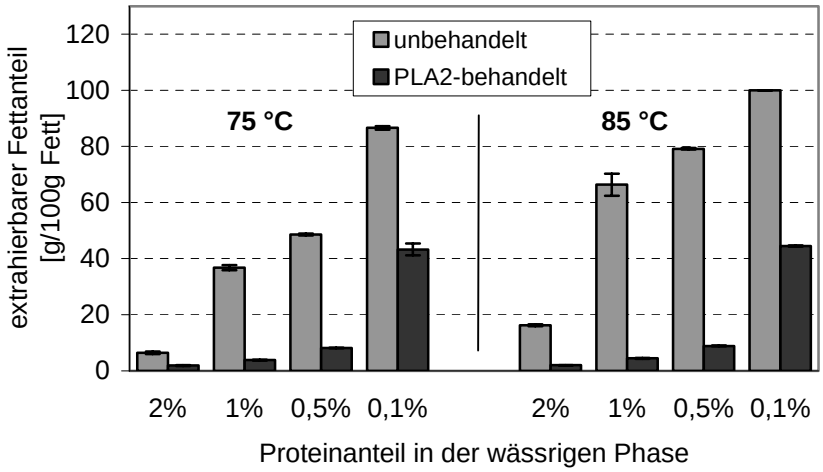


Bild 4.21: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Dabei liegt der extrahierbare Fettanteil der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb (1 % bis 0,1 % Proteinanteil) nach der Erhitzung bei 75 °C zwischen 40 und 85 g/100 g Fett. Der Anteil des extrahierbaren Fettes liegt bei der entsprechenden Emulsion mit 2 % Proteinanteil mit etwa 10 g/100 g Fett darunter. Nach der Erhöhung der Erhitzungstemperatur auf 85 °C steigt der Anteil des extrahierbaren Fettes in den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb deutlich an, was ein Hinweis darauf ist, dass der Grenzflächenfilm die Stabilität der Grenzfläche nicht gewährleisten kann, was letztendlich zum Bruch der Emulsionen führt. Der bei beiden Temperaturen sehr niedrige Anteil des extrahierbaren Fettes in den Emulsionen, die mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisiert worden sind, weist auf die hohe Hitzestabilität des Films hin. Der relativ hohe Anstieg des extrahierbaren Fettanteils in den Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb und 0,1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase hängt mit dem niedrigen Gehalt an verfügbarem grenzflächenaktivem Material zusammen. Zwar bildet der Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex eine stabile Membran aus, dennoch reicht die Konzentration der Proteine und der Phospholipide nicht aus, um die gesamte Grenzfläche vollständig zu stabilisieren.

4.1.7 Diskussion der Mechanismen bezüglich der verbesserten Hitzestabilität der mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierten O/W-Emulsionen

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.6 gezeigt werden konnte, bewirkt die enzymatische Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 eine deutliche Verbesserung der Hitzestabilität der daraus hergestellten O/W-Emulsionen. Obwohl dieser Effekt bereits seit Jahren bekannt ist und in der Lebensmittelindustrie bei der Herstellung hitzestabiler Lebensmittelemulsionen eine wichtige Rolle spielt (Van Dam, 1974; Dutilh und Groger, 1981), waren bisher die Mechanismen, die dazu führen, noch nahezu unerforscht. Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse können nachfolgend die Ursachen für die erhöhte Hitzestabilität der mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierten O/W-Emulsionen diskutiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die enzymatische Modifizierung des Eigelbs mit PLA_2 zur Veränderung der Struktur des öltropfenumgebenden Films der aus diesem Eigelb hergestellten Emulsionen führt. So erscheint dieser Grenzflächenfilm relativ homogen und umschließt gleichmäßig die gesamte Öltropfenoberfläche (Bild 4.18). Es ist anzunehmen, dass durch den partiellen Aufbruch der Granulapartikel (Bild 4.1) diese nicht mehr in aggregierter Form an der

Grenzfläche adsorbiert werden, was den homogeneren Aufbau des Grenzflächenfilms erklärt. Die durch den Aufbruch der Granulapartikel resultierende Freisetzung von HDL und Phosvitin, die nicht mehr in aggregierter Form vorliegen, führt dazu, dass sich diese besser in den Grenzflächenfilm integrieren und aufgrund der verbesserten Flexibilität an der Grenzfläche effektiver ausbreiten können. Dadurch wird auch die gleichmäßigere Bedeckung des Öltropfens realisierbar. Darüber hinaus sind die Lyso-Phospholipide durch die Abspaltung einer Fettsäure durch PLA_2 deutlich hydrophiler als die nicht modifizierten Phospholipide (Stephan, 1999). Aufgrund der höheren Hydrophilität besitzen sie dementsprechend weniger Affinität zur Ölphase, weswegen sie nicht einzeln, sondern bevorzugt im Verbund mit Proteinen an der Grenzfläche adsorbiert werden (Kawai, 2004). Anhand der CLSM-Aufnahmen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass sich der Grenzflächenfilm der Emulsion aus PLA_2-behandeltem Eigelb ausschließlich aus dem Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex zusammensetzt (Bild 4.18, 2a). Dagegen sind im Grenzflächenfilm der Emulsion aus unbehandeltem Eigelb Bereiche erkennbar, die sowohl mit dem Protein-Phospholipid-Komplex als auch mit Phospholipid-Clustern belegt sind (Bild 4.18, 1a). Das hängt damit zusammen, dass Phospholipide, die nicht enzymatisch modifiziert worden sind, aufgrund der höheren Hydrophobizität mehr Affinität zur Ölphase zeigen und deswegen auch eigenständig, d.h. nicht im Verbund mit Proteinen, an der Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbieren. Dies führt zur sichtlichen Inhomogenität des Grenzflächenfilms dieser Emulsionen. Zur höheren Homogenität des Grenzflächenfilms der Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb kann auch die durch die Abspaltung einer Fettsäure reduzierte Größe der Lyso-Phospholipid-Moleküle beitragen. Dabei findet aufgrund der Veränderung der Größe und Struktur der Lyso-Phospholipide und der Freisetzung von Fettsäuren offenbar eine Neuanordnung der Moleküle im Grenzflächenfilm statt, was zur dichteren Packung der Grenzflächenschicht führt. Ähnliche Effekte sind bereits bei der enzymatischen Behandlung von LDL-Mizellen aus dem menschlichen Blutplasma mit PLA_2 beschrieben worden (Hevonoja *et al*., 2000). Tatsächlich konnte bei der Untersuchung des extrahierbaren Fettanteils gezeigt werden, dass die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 eine deutliche Erhöhung der Dichtigkeit und der Stabilität des Grenzflächenfilms der daraus hergestellten Emulsionen bewirkt (Bild 4.46). Somit kann festgehalten werden, dass die höhere Stabilität und die Dichtigkeit des Grenzflächenfilms der aus PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen aus der veränderten Struktur dieses Films resultieren.

Mine (1997) vermutete andererseits, dass die Veränderung der Wechselwirkungen zwischen den an der Emulsionsgrenzfläche adsorbierten Proteinen und Lyso-Phospolipiden während der Erhitzung der Emulsion für deren Hitzestabilität hauptsächlich verantwortlich ist. Er nahm an, dass zwischen den durch die thermische Einwirkung exponierten hydrophoben Seitenketten der Apo-LDL und den Lyso-Phospholipiden sowie den freien Fettsäuren (FFS) feste Komplexe ausgebildet werden. Dabei bilden die Lyso-Phospholipide festere Komplexe mit Proteinen als die nicht modifizierten Phospholipide aus (Mine, 1993). So wird die Hitzestabilität der Apo-LDL durch diese Komplexbildung deutlich erhöht, indem z.B. die hitzebedingte Reduzierung des Anteils an α-Helix-Strukturen ab einer Erhitzungstemperatur von 80 °C fast um die Hälfte reduziert wird (Mine, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der CD-Messung die stabilisierende Wirkung der PLA_2-Behandlung des Eigelbs auf die thermisch bedingte Abnahme des Anteils an α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine nachgewiesen werden (Tabelle 4.2). Darüber hinaus konnte auch hier gezeigt werden, dass dieser stabilisierende Effekt erst bei 85 °C auftritt, wohingegen die Umwandlung der α-Helix-Strukturen in β-Faltblatt der Eigelbproteine bei einer Erhitzung auf 75 °C durch die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 nicht reduziert wird. Da sich die Proteinmoleküle mit Erhöhung der Temperatur während einer thermischen Behandlung immer mehr auffalten, kann angenommen werden, dass die Stabilisierung der Proteinstruktur durch Wechselwirkungen mit Lyso-Phospholipiden erst ab einer gewissen Anzahl an exponierten Proteinseitenketten erfolgt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex an der Öltropfenoberfläche auch nach einer Erhitzung bei 75 °C und 85 °C vollkommen intakt bleibt (Bild 4.18, 2b, c), so dass auch der Grenzflächenfilm bei diesen Temperaturen eine erhöhte Hitzestabilität aufweist (Bild 4.21). Dies kann ebenfalls auf die veränderten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Lyso-Phospholipiden zurückgeführt werden. Auf die Frage, ob bzw. welche Rolle dabei die FFS spielen, die ebenfalls an der Grenzfläche adsorbiert sind (Bild 4.17), wird im Kapitel 5.2 näher eingegangen.

Es ist beschrieben worden, dass für die hitzebedingte Destabilisierung von O/W-Emulsionen auch die Proteine in der kontinuierlichen Phase von entscheidender Bedeutung sind (Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Diese können während der thermischen Behandlung der Emulsion mit den adsorbierten Proteinen Aggregate bilden, indem ihre hitzebedingt aufgefalteten Seitenketten miteinander wechselwirken. Dies kann zusätzlich zur Flockung der Öltropfen bzw. zur Destabilisierung des Grenzflächenfilms beitragen (McCrae, 1999). Wie man in der vorliegenden Arbeit zeigen konnte, nehmen dabei in

den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb die Proteingrenzflächenbelegung (Bild 4.11) und die Dicke des Grenzflächenfilms deutlich zu (Bild 4.18, 1b, c). Bei der Erhitzung der Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb konnten dagegen sowohl die Proteinbelegung der Grenzfläche (Bild 4.11) als auch die Dicke (Bild 4.18, 2b, c) des Grenzflächenfilms merklich reduziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die nicht adsorbierten Proteine und Lyso-Phospholipide ebenfalls in Form von hitzestabilen Komplexen in der kontinuierlichen Phase vorliegen. Dadurch wird auch die hitzebedingte Proteinaggregation und so die Destabilisierung des Emulsionssystems erheblich vermindert.

4.2 Auswirkungen des Zusatzes von Lyso-Phospholipiden auf die Emulgiereigenschaften des Eigelbs

Im Kapitel 4.1 konnte gezeigt werden, dass die verbesserte Hitzestabilität der mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierten Emulsionen auf die Modifzierung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden im Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex an der Emulsionsgrenzfläche zurückzuführen ist. Offen blieb aber die Frage, welchen Beitrag Proteine und Lyso-Phospholipide im Einzelnen zur Verbesserung der Hitzestabilität des Komplexes leisten und ob noch andere Eigelbkomponenten dabei eine Rolle spielen. So wurde vermutet, dass freie Fettsäuren (FFS), die bei der Hydrolyse der Eigelbphospholipide neben den Lyso-Phospholipiden entstehen, ebenfalls in den Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex eingebunden werden und dadurch zur Erhöhung der Hitzestabilität der aus PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen beitragen. Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass Zusätze von aus Soja isoliertem Lysolecithin zu keiner Verbesserung der technologischen Eigenschaften von Eigelb im Vergleich zur *In-situ*-Bildung dieser Verbindungen im Eigelb bei der Behandlung mit PLA_2 führte (Franke und Reimerdes, 2005). Aus diesem Grund wurden die aus dem zuvor mit PLA_2 behandeltem Eigelb extrahierten Lyso-Phospholipide unbehandeltem Eigelb zugesetzt und dessen Emulgiereigenschaften in Hinblick auf die Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen untersucht.

4.2.1 Auswirkungen auf die Emulgiereigenschaften

Der Einfluss des Zusatzes von Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb auf die spezifische Grenzfläche der daraus hergestellten Emulsionen in Abhängigkeit vom

Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion ist im Bild 4.22 dargestellt. Der Gesamtphospholipidgehalt wird in allen Emulsionen konstant gehalten und entspricht dem Phospholipidgehalt der Emulsionen mit einem Proteinanteil von 2 %. Das bedeutet, dass bei der Reduzierung des Proteinanteils (von 1 % auf 0,1 %) der fehlende Anteil an Phospholipiden durch Lyso-Phospholipide ergänzt wird und dadurch kontinuierlich zunimmt. Die genaue Zusammensetzung ist Kapitel 3.5.1.2 zu entnehmen.

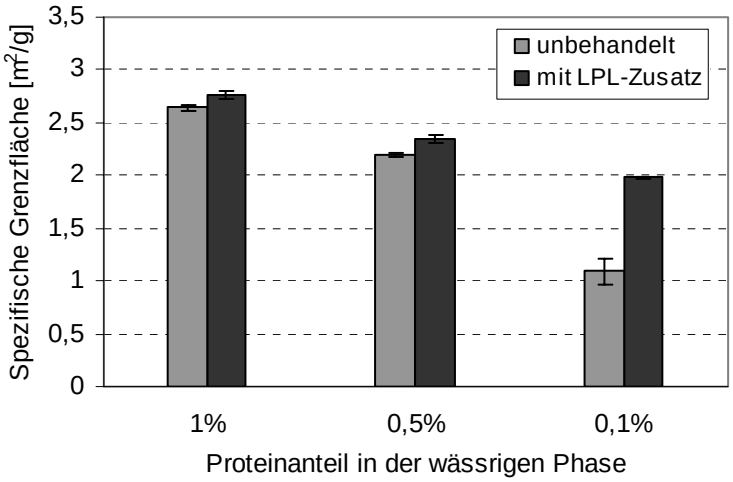


Bild 4.22: Spezifische Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase.

Wie man erkennen kann, hat der Zusatz von Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb keine Auswirkungen auf die spezifische Grenzfläche in Emulsionen mit höherem Proteinanteil (1 % und 0,5 %). Erst wenn der Eigelbgehalt in den Emulsionen auf 0,1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase reduziert wird, führt der Zusatz von Lyso-Phospholipiden zu einer deutlichen Erhöhung der spezifischen Grenzfläche im Vergleich zu den entsprechenden Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb. Das bedeutet, dass nur bei diesen geringen Gehalten an grenzflächenaktiven Substanzen ein deutlicher Beitrag der Lyso-Phospholipide zur Emulgieraktivität des Eigelbs zu erkennen ist.

Es ist bekannt, dass Lyso-Phospholipide mit einem HLB-Wert von 7–10 deutlich hydrophiler als Phospholipide (HLB ca. 3 bis 4) sind und dadurch bessere Grenzflächenaktivität, insbesondere in O/W-Emulsionen, besitzen (Stephan, 1999; Daimer und Kulozik, 2009b). Außerdem liegt der Gesamtgehalt an Phospholipiden in den Emulsionen aus mit Lyso-Phospholipiden versetztem Eigelb im Vergleich zu den Emulsionen, die aus unbehandeltem Eigelb hergestellt wurden, deutlich höher. Aus diesem Grund sollte

man eigentlich einen positiven Einfluss auf die Emulgiereigenschaften des mit Lyso-Phospholipiden versetzten Eigelbs erwarten. Da dieses bei höheren (1 %) und mittleren (0,5 %) Proteinkonzentrationen nicht in dem Maße erkennbar ist (Bild 4.22), wird erneut die Rolle des Protein-Phospholipid-Komplexes für die Emulgiereigenschaften des Eigelbs verdeutlicht. Wird allerdings der Proteingehalt in der Emulsion auf 0,1 % reduziert, so reicht die Konzentration des Protein-Phospholipid-Komplexes nicht mehr aus, um die gesamte Grenzfläche abzudecken. Dadurch werden mehr von den zugesetzten Lyso-Phospholipiden adsorbiert. An dieser Stelle kommt die bereits genannte Grenzflächenaktivität der Lyso-Phospholipide zum Tragen, was zu einer deutlichen Erhöhung der spezifischen Grenzfläche führt.

Die Hitzestabilität der eigelbstabilisierten Emulsionen lässt sich durch den Zusatz von Lyso-Pphospholipiden zum unbehandelten Eigelb allerdings deutlich verbessern, wie man Bild 4.23 entnehmen kann.

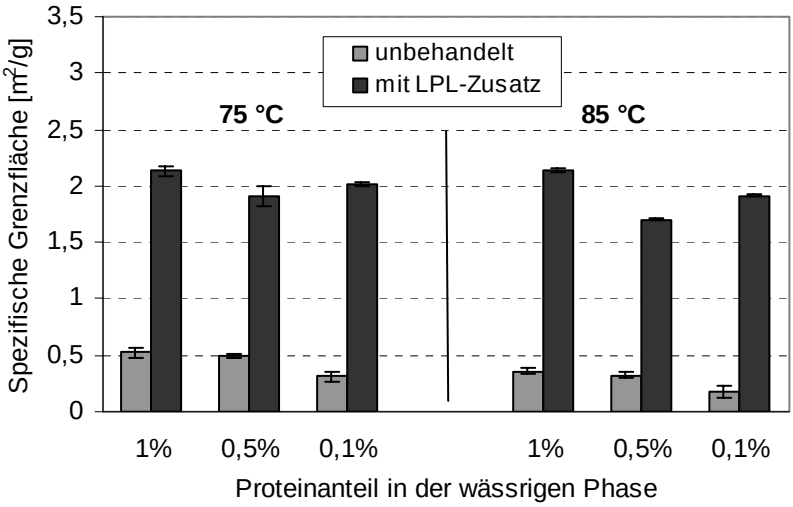


Bild 4.23: Spezifische Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase.

Dabei nimmt der „Schutzeffekt“ der Lyso-Phospholipide auf den Grenzflächenfilm gegenüber Hitzeeinwirkung mit sinkendem Proteingehalt in der wässrigen Phase zu. Während die Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb nicht mehr als intakt angesehen werden können (vgl. Kapitel 4.1.5.1), wird die spezifische Grenzfläche durch die Erhitzung der Emulsionen aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden nur geringfügig beeinflusst. Bei den Emulsionen mit 0,1 % Proteinanteil kann sogar ein vollständiger Erhalt der Grenzfläche nach der Erhitzung bei beiden Temperaturen beobachtet werden. Vergleicht

man die spezifischen Grenzflächen dieser Emulsionen mit denen der bei gleicher Temperatur erhitzten Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb (Bild 4.7), so kann man erkennen, dass durch den Zusatz von Lyso-Phospholipiden eine höhere Hitzestabilität erreicht werden kann.

4.2.2 Auswirkungen auf die Grenzflächenbelegung

4.2.2.1 Proteingrenzflächenbelegung

Der Zusatz von Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb führt zu einer deutlichen Abnahme der Belegung der Emulsionsgrenzfläche mit Proteinen (Bild 4.24).

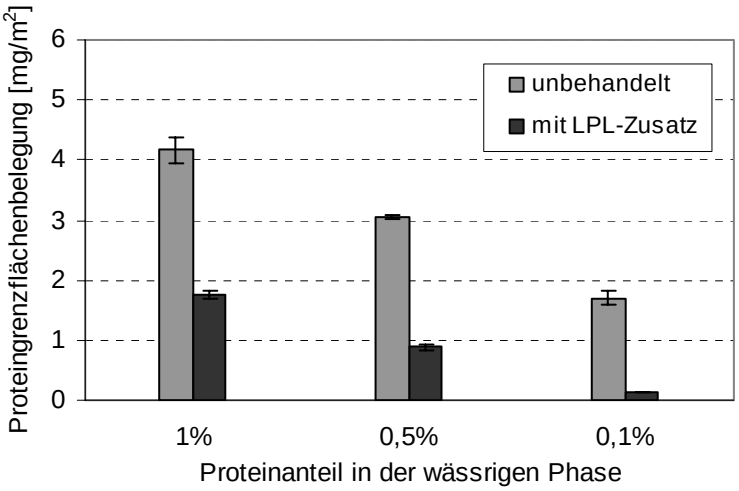


Bild 4.24: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase.

Das kann auf die Verdrängung der Proteine von der Grenzfläche durch die zugesetzten Lyso-Phospholipide zurückgeführt werden. Werden unterschiedliche Emulgatoren, wie in diesem Fall Proteine und Lyso-Phospholipide, für die Stabilisierung einer Substanz verwendet, kann es zur Konkurrenz bzw. zur Verdrängung einer Substanz durch die andere kommen, wobei hier die Grenzflächeneigenschaften der beteiligten Moleküle entscheidend sind (Dickinson *et al*., 1993; Fang und Dalgleish, 1996; Sünder *et al*., 2001; Scherze und Muschiolik, 2001). Zusätzlich ist der Effekt der konkurrierenden Adsorption zwischen ionischen Emulgatoren und Proteinen von der Konzentration des Emulgators abhängig. Dabei wird der Prozess der Verdrängung von weniger grenzflächenaktiven Molekülen, z.B. von Proteinen, durch grenzflächenaktive Substanzen mit einer höheren Grenzflächenaktivität, wie den Lyso-Phospholipiden, von der Grenzfläche bei Steigerung

der Emulgatorkonzentration intensiviert (Nylander, 2004). Dementsprechend nimmt die Proteingrenzflächenbelegung bei der Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase und der damit verbundenen Erhöhung des Anteils an Lyso-Phospholipiden stärker ab, als dies in den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb zu beobachten ist.

Wie sich die Hitzebehandlung der Emulsionen aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden bei 75 °C und 85 °C auf die Proteingrenzflächenbelegung auswirkt, ist Bild 4.25 zu entnehmen.

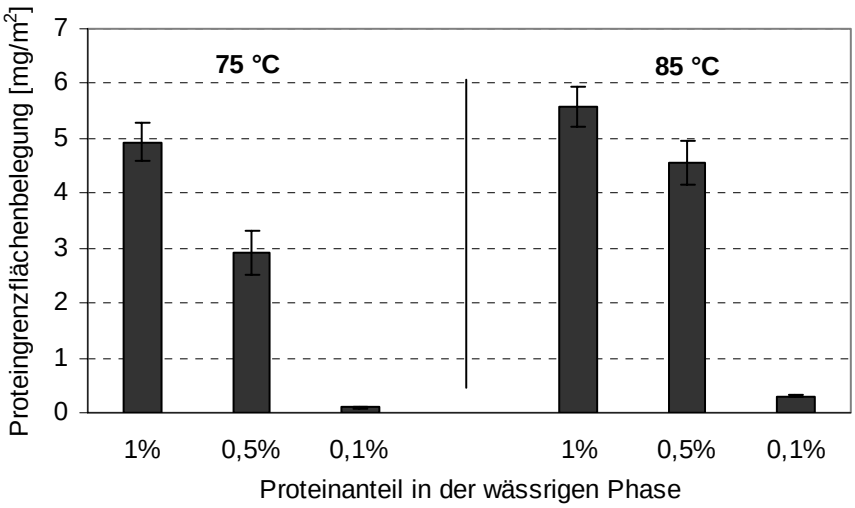


Bild 4.25: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrigen Phase.

Die Proteingrenzflächenbelegung in den Emulsionen mit einem Proteinanteil von 1 % und 0,5 % nimmt sowohl bei 75 °C als auch bei 85 °C deutlich zu. In den Emulsionen mit 0,1 % Proteinanteil ist dagegen keine (bei 75 °C) bzw. nur eine geringfügige (bei 85 °C) Zunahme der Proteingrenzflächenbelegung zu erkennen. Insgesamt nimmt die Grenzflächenbelegung mit der Reduzierung des Proteinanteils in allen Emulsionen ab. Ein direkter Vergleich mit den Emulsionen ohne Zusatz von Lyso-Phospholipiden (unbehandeltes Eigelb) kann wegen des hitzeinduzierten Bruchs der entsprechenden Emulsionen nicht erfolgen. Werden aber entsprechende, mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierte Emulsionen zum Vergleich hinzugezogen (Bild 4.11), so wird deutlich, dass durch den Zusatz von Lyso-Phospholipiden die Beladung der Grenzfläche mit Proteinen nach der Erhitzung der Emulsionen deutlich reduziert wird. Zum einen hängt dies mit der niedrigeren Proteingrenzflächenbelegung in den nicht erhitzten Emulsionen aus Eigelb mit Lyso-

Phospholipide-Zusatz, verglichen mit den entsprechenden Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb zusammen (vgl. Bild 4.8). Somit ist die Proteingrenzflächenbelegung von den Emulsionen aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden auch nach der Erhitzung geringer als bei den Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb. Auf der anderen Seite können bei der Erhitzung von O/W-Emulsionen auch die nicht adsorbierten Proteine zur Zunahme der Proteingrenzflächenbelegung beitragen, indem sie durch exponierte Seitenketten mit den adsorbierten Proteinen wechselwirken und so an den Grenzflächenfilm anhaften. Es wurde zwar beschrieben, dass die Modifizierung der Phospholipide die hitzeinduzierte Auffaltung der Eigelbproteine im Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex verhindert, wodurch auch die Aggregation der Proteine an der Emulsionsgrenzfläche inhibiert wird (Mine, 1997). Allerdings betrifft es nur Lipoproteine des Eigelbs, wie LDL oder HDL. Die wasserlöslichen Livetine, die bevorzugt in der kontinuierlichen Phase der Emulsion verbleiben und relativ hitzeempfindlich sind, aggregieren nach dem hitzeinduziertem Auffalten mit den adsorbierten Proteinen. Zwar wird dabei die Grenzflächenstabilität in den Emulsionen aus PLA_2-behanndeltem Eigelb nicht beeinträchtigt, doch führt dies zur Erhöhung der Proteinbelegung der Grenzfläche. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die zugesetzten Lyso-Phospholipide nicht nur mit den adsorbierten, sondern auch mit den in der kontinuierlichen Phase verbliebenen Proteinen wechselwirken. Dadurch werden die hitzebedingten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen an der Grenzfläche und in der kontinuierlichen Phase verhindert, was auch zur Abnahme der Proteingrenz-flächenbelegung, verglichen mit den entsprechenden Emulsionen aus PLA_2-behandel-tem Eigelb, führen kann.

4.2.2.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung

Die Auswirkungen des Zusatzes von Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb auf die Belegung der Grenzfläche der damit stabilisierten Emulsionen mit Phospholipiden kann Bild 4.26 entnommen werden.

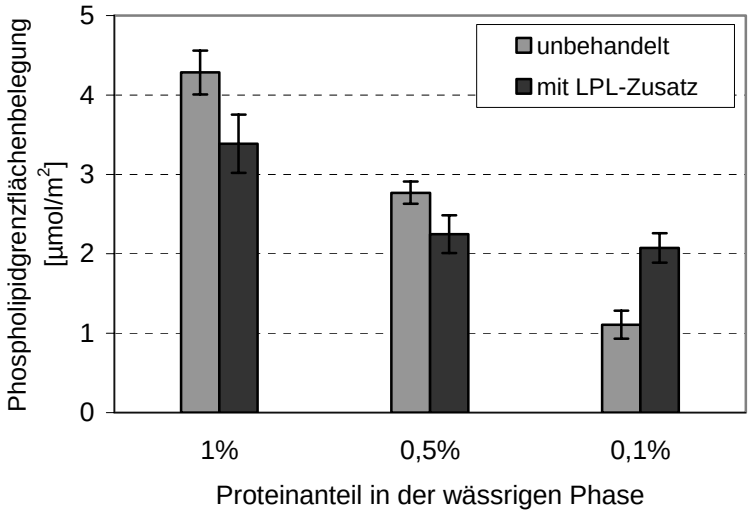


Bild 4.26: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. Die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase.

Es ist zu erkennen, dass trotz des insgesamt deutlich höheren Gehaltes an Phospholipiden in den Emulsionen mit höheren Proteinanteilen (die zweifache bzw. die vierfache Phospholipidkonzentration in der Emulsion mit 1 % bzw. 0,5 %) die Phospholipidgrenzflächenbelegung im Vergleich zu den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb zurückgeht. Allerdings bewirkt eine weitere Reduzierung des Proteinanteils auf 0,1% keine weitere Abnahme der Belegung der Grenzfläche mit Phospholipiden und liegt mit 2 µmol/m^2 deutlich höher als in der entsprechenden Emulsion aus unbehandeltem Eigelb.

Die Zusammensetzung der Phospholipidfraktion an der Grenzfläche (Tabelle 4.4) zeigt, dass die Abnahme der Belegung der Phospholipide auf die Abnahme der Konzentration von PC und PE zurückzuführen ist. Da diese ausschließlich aus dem unbehandelten Eigelb stammen, wird noch einmal die Annahme bestätigt, dass ein großer Teil der Grenzfläche durch den Protein-Phospholipid-Komplex des unbehandelten Eigelbs stabilisiert wird. Die Konzentration von sowohl LPC als auch LPE, die ausschließlich aus den zugesetzten Lyso-Phospholipiden stammen, ist dagegen unabhängig vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die zugesetzten Lyso-Phospholipide nicht im Verbund mit den Lipoproteinen des Eigelbs an der Grenzfläche adsorbiert werden. Zusätzlich zeigt sich, dass, obwohl mit der Reduzierung des Eigelbanteils die Konzentration an Lyso-Phospholipiden stetig zunimmt, die Grenzflächenkonzentration von LPC und LPE in etwa konstant bleibt. Das bedeutet, dass die

Sättigungskonzentration an Lyso-Phospholipiden an der Grenzfläche unabhängig von der Eigelbkonzentration zu sein scheint.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL) in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion

Proteinanteil in der wässrigen Phase	PC	PE	LPC	LPE
unbehandelt				
1 %	7,9 ± 0,44	1,2 ± 0,02	< 0,1	< 0,1
0,5%	4,6 ± 0,31	0,6 ± 0,07	< 0,1	< 0,1
0,1%	1,1 ± 0,05	0,1 ± 0,01	< 0,1	< 0,1
mit LPL-Zusatz				
1 %	3,8 ± 0,21	0,7 ± 0,06	3,0 ± 0,24	1,1 ± 0,09
0,5%	1,0 ± 0,08	0,2 ± 0,01	2,6 ± 0,38	1,1 ± 0,09
0,1%	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	2,6 ± 0,20	1,0 ± 0,12

Werden die Emulsionen bei 75 °C bzw. 85 °C erhitzt, so nimmt die Phospholipidgrenzflächenbelegung in den Emulsionen mit dem Proteinanteil von 1 % und 0,5 % zu (Bild 4.27).

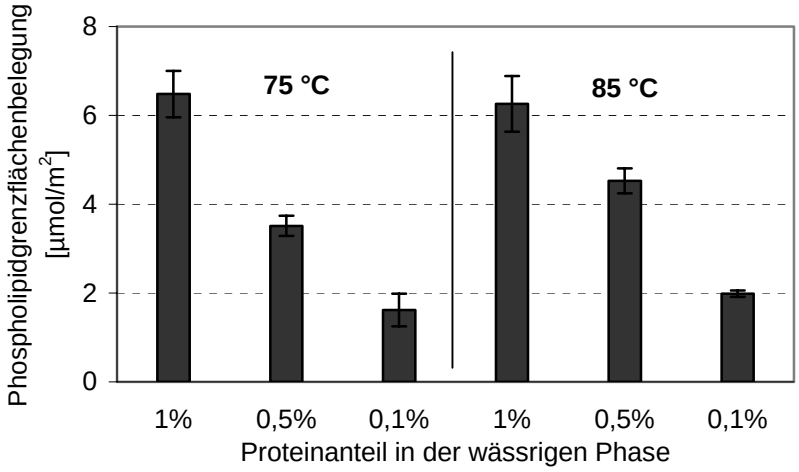


Bild 4.27: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, nach Erhitzung mit 75 °C bzw. 85 °C. Die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase.

Im Gegensatz dazu ist dieser Effekt bei der Hitzebehandlung der Emulsionen mit 0,1 % Proteinanteil nicht festzustellen. Darüber hinaus geht die Phospholipidgrenzflächenbelegung bei Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase zurück, trotz des entsprechend zunehmenden Gesamtphospholipidanteils. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die nicht adsorbierten Lyso-Phospholipide auch nach der Hitzebehandlung in der

kontinuierlichen Phase der Emulsion verbleiben. Unter Beachtung der Zusammensetzung der einzelnen Phospholipide an der Grenzfläche (Tabelle 4.5) kann auch in diesem Fall die Zunahme der Phospholipidgrenzflächenbelegung auf die Konzentrationen von PC und PE aus dem Protein-Phospholipid-Komplex des unbehandelten Eigelbs zurückgeführt werden. Die Konzentrationen von LPC und LPE werden nach der Erhitzung der Emulsionen nur geringfügig verändert.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL) in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C

	Proteinanteil in der wässrigen Phase	PC	PE	LPC	LPE
erhitzt bei 75 °C	1 %	5,4 ± 0,04	0,9 ± 0,17	3,5 ± 0,15	1,4 ± 0,43
	0,5 %	1,6 ± 0,09	0,2 ± 0,02	3,6 ± 0,07	1,2 ± 0,38
	0,1 %	0,2 ± 0,04	< 0,1	2,3 ± 0,50	0,6 ± 0,15
erhitzt bei 85 °C	1 %	5,2 ± 0,27	0,7 ± 0,15	3,5 ± 0,65	1,2 ± 0,36
	0,5 %	1,6 ± 0,06	0,1 ± 0,04	3,4 ± 0,18	1,3 ± 0,12
	0,1 %	0,2 ± 0,03	< 0,1	2,3 ± 0,10	1,0 ± 0,07

4.2.2.3 Belegung der Grenzfläche mit freien Fettsäuren

Die Belegung der Grenzfläche mit freien Fettsäuren (FFS) in den Emulsionen aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden ist Bild 4.28 zu entnehmen.

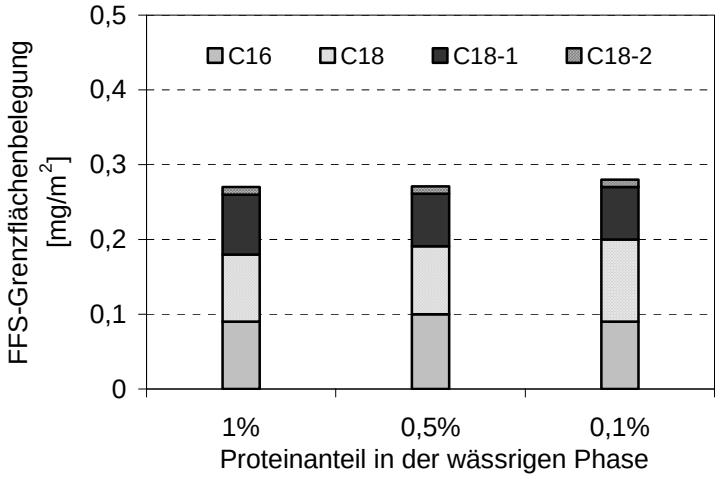


Bild 4.28: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure; C18:2: Linolsäure (ungesättigt).

Die Belegung der Grenzfläche mit FFS insgesamt und vor allem mit ungesättigten FFS bleibt niedrig und ist auch geringer als die FFS-Grenzflächenbelegung der Emulsionen

aus unbehandeltem Eigelb (vgl. Bild 4.16). Das liegt daran, dass die zugesetzten Lyso-Phospholipide keine FFS enthalten. Dieses Ergebnis ist insofern wichtig, als dass, wie bereits eingangs erwähnt, den ungesättigten FFS eine wichtige Funktion für die Hitzestabilität der aus mit PLA_2-behandeltem Eigelb stabilisierten Emulsionen zugeschrieben wird (Mine, 1997). Allerdings konnte hier gezeigt werden, dass Lyso-Phospholipide auch ohne Vorhandensein von zusätzlichen FFS den Grenzflächenfilm gegenüber Hitzeeinwirkung stabilisieren können.

4.2.3 Struktur der Grenzfläche

Die entsprechenden CLSM-Aufnahmen der Emulsionsgrenzfläche sind Bild 4.29 zu entnehmen.

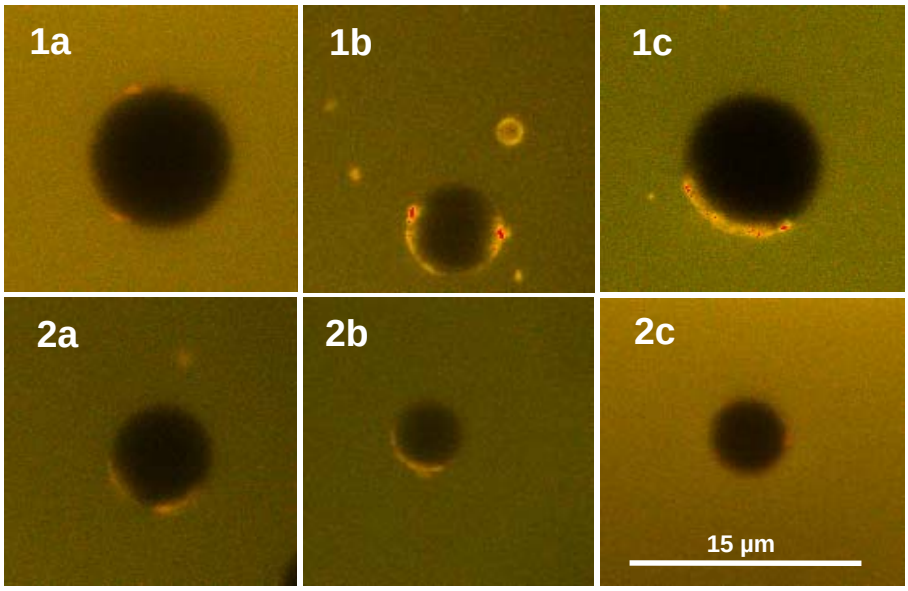


Bild 4.29: CLSM-Aufnahmen der Öltropfengrenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, mit 1 % (1a, b, c) bzw. 0,5 % (2a, b, c) Proteinanteil in der wässrigen Phase. Die Emulsionen wurden zusätzlich bei 75 °C (b) bzw. 85 °C (c) erhitzt. Folgende Substanzen sind markiert: Proteine (grün), Phospholipide (rot); Protein-Phospholipid-Komplex erscheint durch Überlappung von grün und rot als orange.

Wie man anhand der CLSM-Aufnahmen der Grenzfläche erkennen kann (1a und 2a), ist der Grenzflächenfilm an der Öltropfenoberfläche relativ dünn (vgl. dazu Bild 4.18), so dass er mit der Auflösung des CLS-Mikroskops nicht überall erfasst und sichtbar gemacht werden kann. Die Beobachtung stimmt auch mit der ermittelten niedrigen Proteingrenzflächenbelegung (Bild 4.24) überein. Nach der Erhitzung nimmt die Dicke des Films nur unwesentlich zu. Außerdem deutet die Farbe des Grenzflächenfilms (orange) darauf hin, dass diese Zunahme auf die Aggregation des Protein-Phospholipid-Komplexes

zurückzuführen ist. Mit der Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase der Emulsion (2a bis 2c) nimmt auch die Dicke des Grenzflächenfilms nach der Erhitzung, entsprechend der Senkung der Proteingrenzflächenbelegung in diesen Emulsionen ab. Die Aufnahmen verdeutlichen, dass der Zusatz von Lyso-Phospholipiden die Bildung eines dünnen, aber stabilen Grenzflächenfilms induziert.

4.2.4 Diskussion der Hitzestabilität eigelbstabilisierter Emulsionen durch Zusatz von Lyso-Phospholipiden

In den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von aus PLA_2-behandeltem Eigelb isolierten Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb einen deutlich positiven Einfluss auf die Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen hat. Die Frage ist nun, wie sich die Effekte aus der Zusammensetzung des Eigelbs und die Wechselwirkungen der Eigelbproteine mit den zugesetzten Lyso-Phospholipiden erklären lassen.

Wie bereits im Kapitel 2.2.6 ausführlich beschrieben, resultiert der hitzebedingte Bruch von eigelbstabilisierten Emulsionen aus der Destabilisierung des grenzflächenumgebenden Films durch Aggregation der hitzebedingt aufgefalteten Proteine (Kiosseoglou, 2003). Dabei aggregieren sowohl die an den benachbarten Öltropfen adsorbierten als auch die nicht adsorbierten Proteine, die sich in der kontinuierlichen Phase der Emulsion befinden, durch Bildung von beispielsweise Wasserstoff- oder Disulfidbrücken zwischen den exponierten Seitenketten miteinander (Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Allerdings kann die thermisch induzierte Destabilisierung proteinstabilisierter Emulsionen u.a. durch Zusatz von niedermolekularen Emulgatoren verhindert werden (Magdassi *et al.*, 1996; McCrae, 1999; Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). So beschrieben McCrae (1999) sowie Nikiforidis und Kiosseoglou (2007) mehrere mögliche Mechanismen, die zur Erhöhung der Hitzebeständigkeit von O/W-Emulsionen durch Zugabe von Emulgatoren führen.

Einerseits findet bei dem Zusatz des Emulgators eine Verdrängung der adsorbierten Proteine von der Grenzfläche statt. Darüber hinaus können Emulgatoren mit den hauptsächlich an der äußeren Schicht des Grenzflächenfilms adsorbierten Proteinen wechselwirken und durch die Abschirmung der exponierten Seitenketten deren hitzeinduzierte Aggregation an der Oberfläche der Öltropfen verhindern. Wie im Kapitel 4.2.2.1 gezeigt werden konnte, führt die Zugabe von Lyso-Phospholipiden zu eigelbstabilisierten O/W-

Emulsionen ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Proteingrenzflächenbelegung (Bild 4.24). Gleichzeitig nimmt die Konzentration der Lyso-Phospholipide an der Grenzfläche zu (Tabelle 4.4). Daraus resultiert auch eine Abnahme der Dicke des Grenzflächenfilms (Bild 4.29, 1a und 2a). Es kann daher bestätigt werden, dass der Zusatz von Lyso-Phospholipiden die Verdrängung der adsorbierten Proteine von der Grenzfläche verursacht. Darüber hinaus wurde im Kapitel 4.1.7 gezeigt, dass Eigelbproteine und Lyso-Phospholipide hitzestabile Komplexe ausbilden, wodurch auch die Hitzestabilität des Grenzflächenfilms erhöht wird. Somit kann angenommen werden, dass die zugesetzten Lyso-Phospholipide die hitzebedingte Destabilisierung der Emulsionsgrenzfläche auf ähnliche Weise, wie oben beschrieben, wesentlich verhindern.

Andererseits können die zugesetzten Emulgatoren mit den nicht adsorbierten Proteinen in der kontinuierlichen Phase wechselwirken bzw. die exponierten Seitenketten abschirmen. Auf diese Weise wird verhindert, dass die nicht adsorbierten Proteine mit den adsorbierten in Wechselwirkungen treten und damit die Flockung der Öltropfen bzw. eine Destabilisierung des Emulsionssystems verursachen (McCrae, 1999; Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Wie im Bild 4.25 gezeigt werden konnte, nimmt die Proteingrenzflächenbelegung der Emulsionen mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden nach der Erhitzung nur unwesentlich zu. Ferner sind in den CLSM-Aufnahmen keine thermisch bedingten Proteinaggregatbildungen im Grenzflächenfilm zu erkennen (Bild 4.29, 1b, c und 2b, c), wie es beispielsweise in den entsprechenden Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb der Fall ist (Bild 4.18). Folglich findet bei der Zugabe von Lyso-Phospholipiden vermutlich eine Abschirmung der nicht adsorbierten Proteine statt. Dieser Effekt führt dazu, dass die Wechselwirkungen mit den adsorbierten Proteinen und die damit verbundene Destabilisierung des Grenzflächenfilms verhindert werden. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass die freien Fettsäuren bei diesen Stabilisierungsmechanismen keine Rolle spielen (Bild 4.28), wie es z.B. für die *In-situ* Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 diskutiert wird (Mine, 1997). Es ist bekannt, dass die freien Fettsäuren einen bitteren Beigeschmack in Lebensmitteln verursachen und dadurch die Produktqualität mindern können (Jaekel und Ternes, 2009). Daraus resultiert, dass sich der Zusatz von aus PLA_2-behandeltem Eigelb extrahierten Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb zur Herstellung von hitzestabilen eigelbstabilisierten Emulsionen, gegenüber der *In-situ*-Inkubation des Eigelbs mit PLA_2, als vorteilhaft erweisen könnte.

4.3 Beeinflussung der Eigenschaften des Eigelbs durch die Behandlung mit Phospholipase D

Wie in den Kapiteln 4.1 und 4.2 gezeigt wurde, werden durch die Modifikation des Eigelbs sowohl durch die *In-situ*-Behandlung mit PLA_2 als auch durch den Zusatz von aus PLA_2-behandeltem Eigelb isolierten Lyso-Phospholipiden dessen techno-funktionellen Eigenschaften beeinflusst. Insbesondere konnte auf diese Weise die Hitzestabilität der aus dem Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit, die Eigelbphospholipide zu modifizieren, ist die Hydrolyse mit der Phospholipase vom Typ D (PLD), die unter anderem die Abspaltung des Cholins beim PC bzw. des Ethanolamins beim PE katalysiert (De Maria *et al*., 2007). Dabei entstehen Phosphatidsäure (PA) und je nach hydrolysierter Phospholipidfraktion Cholin bzw. Ethanolamin (Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005). Der industrielle Einsatz von PLD beschränkt sich zurzeit auf die Applikation von isolierter PA (Guo *et al*., 2005). Zur direkten Umsetzung der Phospholipide in einer natürlichen Lebensmittelmatrix, wie z.B. Eigelb, lagen bisher keine Ergebnisse vor. Daher wird in diesem Kapitel die enzymatische Modifikation des Eigelbs mit PLD aus *Streptomyces chromofuscus* charakterisiert und die daraus resultierenden Effekte auf dessen techno-funktionelle Eigenschaften untersucht. Insbesondere liegt dabei der Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLD auf die Hitzestabilität der eigelbstabilisierten O/W-Emulsionen im Fokus der Untersuchungen.

4.3.1 Einfluss auf die Zusammensetzung der Phospholipide

Vor der Inkubation mit der PLD wurde das Eigelb mit destilliertem Wasser verdünnt (70/30 w/w). Dies war notwendig, weil die Viskosität des unverdünnten Eigelbs bereits nach einer kurzen Inkubationszeit erheblich zunahm, bis das Eigelb nach etwa 1 h nahezu fest wurde. Dadurch war eine gleichmäßige Verteilung des Enzyms durch Rühren nicht mehr gewährleistet, so dass die Hydrolysevorgänge, die anhand von Änderungen der Konzentration von PC, PE und PA verfolgt wurden, abbrachen. Durch das Verdünnen des Eigelbs konnte die Aktivität des Enzyms deutlich verbessert werden. Die Inkubation erfolgte bei 50 °C, wobei stündlich Proben für die Bestimmung der Phospholipidkonzentration entnommen und nachfolgend gefriergetrocknet wurden. Die Konzentrationen an PC, PE und PA beziehen sich daher auf ein Gramm Trockeneigelb (Bild 4.30).

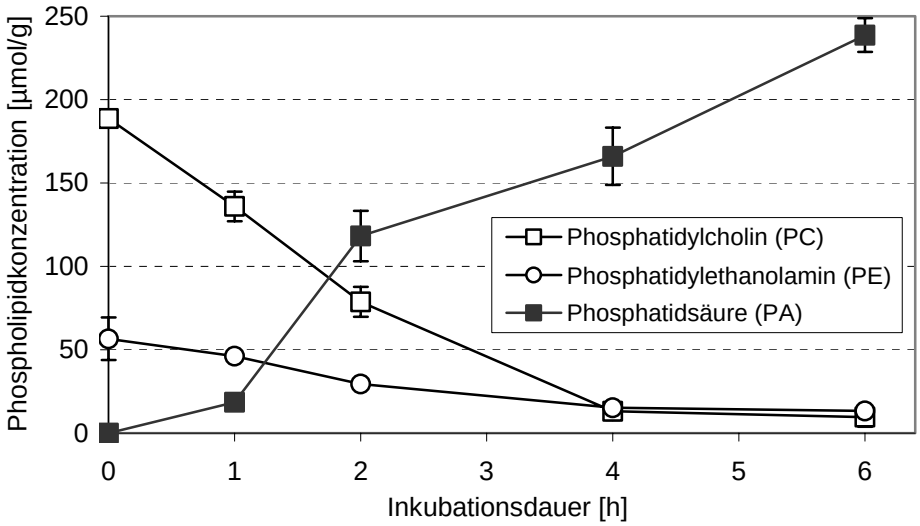


Bild 4.30: Konzentration der Phospholipide im Eigelb während der Inkubation mit Phospholipase D (PLD) bei 50°C. Die Enzymkonzentration beträgt 750 Units pro g Phospholipide. Angaben beziehen sich auf die Eigelbtrockenmasse.

Es ist zu erkennen, dass die Konzentration von PC bereits nach 2 h um etwa 50 % abgenommen hat. Nach 4 h Inkubation konnten nur noch ca. 5 % des im Eigelb ursprünglich vorhandenen PC nachgewiesen werden, wobei sich die PC-Konzentration in den nächsten 2 h nur noch geringfügig änderte. Die Konzentration von PE betrug nach 2 h ebenfalls ca. 50 % der Anfangskonzentration. Die Endkonzentration, die bei etwa 23 % des Anfangswertes liegt, wurde bereits nach 4 h Inkubation erreicht. Entsprechend der Abnahme der Gehalte an PC und PE ist eine Zunahme der Konzentration an PA zu beobachten. Bereits nach 2 h lag die Konzentration von PA mit etwa 118 µmol/g Trockeneigelb über der jeweiligen Konzentration an PC und PE. In den folgenden 4 h nahm die Konzentration an PA stetig zu und betrug nach insgesamt 6 h etwa 238 µmol/g.

Insgesamt stimmt die Endkonzentration von PA nach 6 h Inkubation des Eigelbs mit PLD mit der Anfangskonzentration von PC und PE überein, was eine direkte Umwandlung dieser beiden Phospholipidfraktionen in PA bestätigt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich Eigelb nach leichtem Verdünnen mit Wasser als Substrat für die Hydrolyse der Phospholipide mit PLD eignet.

4.3.2 Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften und die Struktur des Eigelbs

Wie bereits oben beschrieben, stellte sich im verdünnten Eigelb während der Inkubation mit PLD eine viskose Textur ein. Aus diesem Grund wurde das Viskositätsverhalten des verdünnten Eigelbs während der Inkubation mit PLD rheometrisch untersucht. Die

effektive Viskosität des Eigelbs bei einer konstanten Scherrate von 20 s^{-1} während der Inkubation mit PLD ist im Bild 4.31 dargestellt.

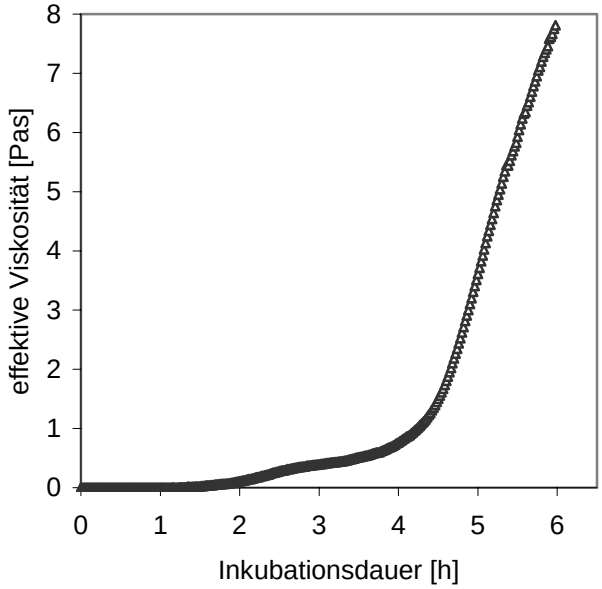


Bild 4.31: Effektive Viskosität des verdünnten Eigelbs (70/30 w/w) während der Inkubation mit Phospholipase D (750 Units/g Phospholipide) bei 50 °C (Scherrate: 20 s^{-1}).

Es ist zu erkennen, dass die erste deutliche Zunahme der effektiven Viskosität des verdünnten Eigelbs zwischen 2 und 4 h Inkubation erfolgt. Ab der vierten Stunde der Inkubation findet ein exponentieller Anstieg der effektiven Viskosität statt.

In der Literatur finden sich keinerlei Hinweise bezüglich des Viskositätsverhaltens von Eigelb während der Behandlung mit PLD. Allerdings wurde eine Zunahme der Viskosität im Eigelb bei Inkubation mit Phospholipase C (PLC) beschrieben (Kumar und Mahadevan, 1970). Dieses Enzym spaltet die polare, wasserlösliche Gruppe (Phosphorylcholin) der Phospholipide ab (Guo *et al*., 2005). Dabei führen die Veränderungen der Struktur der LDL-Mizelle aufgrund von modifizierten Wechselwirkungen zwischen Apo-Proteinen und Phospholipiden an der Oberfläche der Mizelle zum Freilegen gewisser Bereiche des Moleküls. Durch Aggregation der freigelegten Gruppen an benachbarten LDL-Mizellen kommt es zur Ausbildung von Netzwerkstrukturen und damit zur Erhöhung der Viskosität (Kumar und Mahadevan, 1970). Da bei der Hydrolyse der Phospholipide mittels PLD ebenfalls die Kopfgruppe des Phospholipidmoleküls angegriffen wird, treten offenbar vergleichbare Effekte bezüglich Destabilisierung der LDL-Mizellen auf. So vermuteten Kamat *et al*. (1972) und Mine (1997), dass der Protein-Phospholipid-Komplex in der Oberflächenmembran der LDL-Mizelle hauptsächlich durch Wechselwirkungen zwischen

den geladenen Proteinseitenketten und der Kopfgruppe des Phospholipidmoleküls stabilisiert wird (vgl. Bild 2.5). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass durch die Hydrolyse des Phospholipidmoleküls durch PLD diese stabilisierenden Mechanismen beeinträchtigt werden. Das könnte eine Destabilisierung der Struktur der Oberflächenmembran der LDL-Mizelle als Folge haben, wodurch die Apo-Proteine freigelegt werden und durch Aggregation mit den freigelegten Apo-Proteinen benachbarter LDL-Mizellen Netzwerke ausbilden. Durch Immobilisierung des Wassers in das ausgebildete Netzwerk steigt auch die Viskosität des Eigelbs.

Um die Annahme bezüglich der oben beschriebenen Netzwerkausbildung zu verifizieren, wurde das verdünnte Eigelb mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die entsprechenden Aufnahmen des verdünnten Eigelbs vor und nach einer Behandlung mit PLD sind im Bild 4.32 dargestellt. Wie im Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde nach der Fixierung der Strukturen durch Schockgefrieren im Flüssigstickstoff das in den Eigelb-proben vorhandene Wasser mittels Sublimation entfernt. Daher sind in den Aufnahmen vor allem Proteinstränge dargestellt.

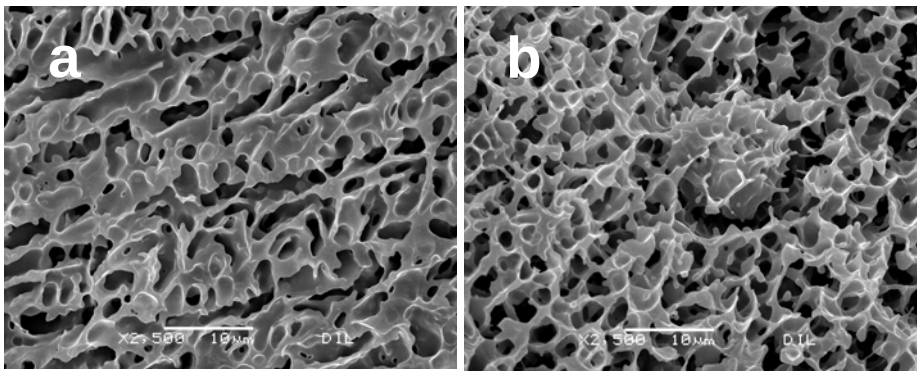


Bild 4.32: REM-Aufnahmen des mit dest. Wasser verdünnten Eigelbs (70/30 w/w). Balkenlänge beträgt 10 µm. a: verdünntes Eigelb vor der PLD-Behandlung; b: verdünntes Eigelb nach der PLD-Behandlung.

Während im unbehandelten Eigelb keine Netzwerkstrukturen zu erkennen sind (Bild 4.32a), besitzt das PLD-behandelte Eigelb deutlich ausgeprägte Proteinnetzwerke (Bild 4.32b).

4.3.3 Einfluss der Behandlung mit Phospholipase D auf die Proteinstruktur des Eigelbs

Der Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLD auf die Sekundärstruktur der Eigelbproteine ist Bild 4.33 zu entnehmen.

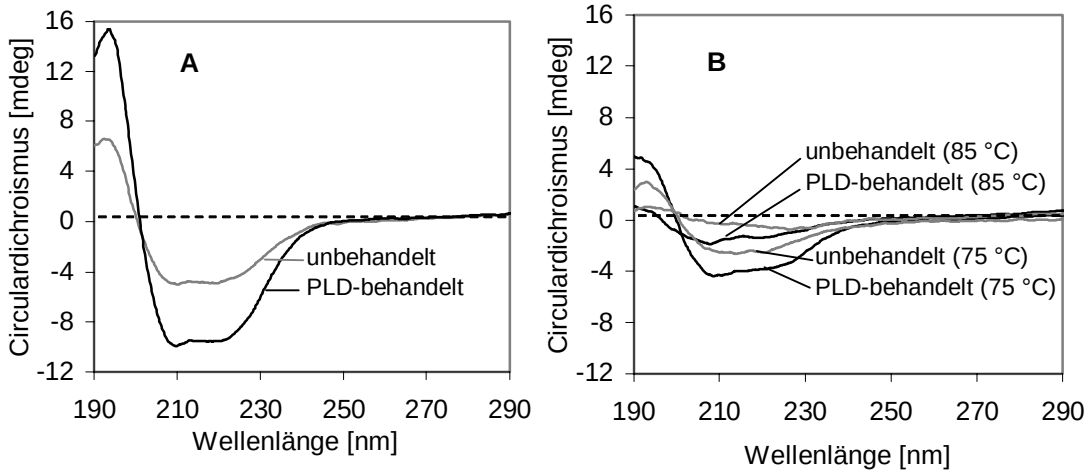


Bild 4.33: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLD-behandelten Eigelbs vor (A) und (B) nach einer Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C.

Anhand der Veränderung des Verlaufs des CD-Spektrums konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs mit PLD auch einen deutlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Eigelbproteine hat. Betrachtet man die Anteile der Sekundärstrukturelemente der Eigelbproteine (Tabelle 4.6), so kann eine erhebliche Zunahme des Anteils an α-Helix-Strukturen von 47,5 % auf 85 % nach der Behandlung des Eigelbs mit PLD festgestellt werden. Dementsprechend findet ein Rückgang des Anteils der β-Faltblatt-Strukturen von 11,4 % auf 1,6 % und der Random-Coil-Strukturen von 24,3 % auf 4,4 % statt.

Tabelle 4.6: Sekundärstrukturanteile der Proteine in unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb vor und nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85°C

Eigelb	Behandlung	Sekundärstrukturanteile [%]			
		α-Helix	β-Faltblatt	β-Turn	Random Coil
unbehandelt	nicht erhitzt	47,5	11,4	16,8	24,3
	erhitzt bei 75 °C	24,9	25,4	17,3	32,4
	erhitzt bei 85 °C	14,5	36,0	15,5	34,0
PLD-behandelt	nicht erhitzt	85,0	1,6	9,0	4,3
	erhitzt bei 75 °C	38,7	16,4	17,9	27,0
	erhitzt bei 85 °C	17,0	36,7	16,7	29,7

Diese deutliche Zunahme an α-Helix-Strukturen im PLD-behandelten Eigelb kann mit der Zunahme des Anteils an PA bei gleichzeitiger Abnahme der PC- und PE-Konzentration in Verbindung gebracht werden. So wurde berichtet, dass durch Wechselwirkungen zwischen Polypeptiden und anionischen Emulgatoren, wie z.B. SDS, die β-Faltblattstrukturen in α-Helix-Strukturen umgewandelt werden können, während ein nichtionischer Emulgator keine Änderung der Sekundärstruktur der Polypeptide bewirkt (Montserret *et al*., 2000). Während der PLD-Inkubation des Eigelbs werden die Zwitterionen PC und PE, die keine Nettoladung besitzen, zum Anion PA umgewandelt. Offenbar findet durch anionische Wechselwirkungen zwischen den Apo-Proteinen des Eigelbs und PA eine Umstrukturierung von β-Faltblatt, β-Turn sowie Random Coil in α-Helix statt.

Wie schon im Kapitel 4.1.2 gezeigt wurde, hat die Erhitzung des Eigelbs einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Eigelbproteine. Die Erhitzung des PLD-behandelten Eigelbs bei 75 °C und 85 °C führt ebenfalls zu einer Veränderung des Verlaufs des CD-Spektrums sowohl im Vergleich zum nicht erhitzten, PLD-behandelten Eigelb als auch zum unbehandelten Eigelb (Bild 4.33 B). Wie man der Tabelle 4.6 entnehmen kann, geht bei beiden Temperaturen der Anteil an α-Helix-Strukturen zurück. Allerdings liegt dieser nach der Erhitzung des Eigelbs bei 75 °C mit 38,7 % immer noch deutlich über dem des unbehandelten Eigelbs. Bei der Erhöhung der Erhitzungstemperatur auf 85 °C nimmt der Anteil an α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine weiter ab. Dabei ist der Anteil an α-Helix-Strukturen im PLD-behandelten Eigelb vergleichbar mit dem Anteil der α-Helix-Strukturen des bei gleicher Temperatur erhitzten unbehandelten Eigelbs. Die Anteile an β-Faltblatt, β-Turn und Random-Coil-Strukturen im bei 85 °C erhitzten PLD-behandelten Eigelb sind ebenfalls mit den im unbehandelten Eigelb vorhandenen Sekundärstrukturanteilen vergleichbar.

Insgesamt führt die hitzebedingte Denaturierung der Proteine zur Veränderung der intramolekularen Wechselwirkungen, was z.B. mit dem Abbau von Wasserstoffbrücken und damit der Abnahme des Anteils an α-Helix-Strukturen verbunden ist. Offenbar trägt die Hydrolyse der Phospholipide des Eigelbs durch PLD zur Stabilisierung der α-Helix-Strukturen und damit zu einer höheren Resistenz gegenüber dem hitzeinduzierten Denaturieren der Eigelbproteine bei. Bestätigt wird diese Annahme durch die stärkere Bandenintensität des CD-Spektrums des bei 75 °C erhitzten PLD-behandelten Eigelbs im Vergleich zum unbehandelten Eigelb (Bild 4.33 B). Betrachtet man allerdings den

relativen Rückgang an α-Helix bei 75 °C und die Tatsache, dass bei 85 °C dieser Stabilisierungseffekt offenbar unwirksam wird, so wäre es auch möglich, dass der hohe Anteil an α-Helix-Strukturen im Eigelb bei 75 °C auf den hohen Anfangswert, d.h. dem Anteil im nicht erhitzten Eigelb, zurückzuführen ist.

4.3.4 Einfluss auf die Grenzflächeneigenschaften

Inwiefern sich die Änderungen der Struktur des Eigelbs sowie der Konformation der Eigelbproteine durch die Behandlung mit PLD auf dessen Grenzflächeneigenschaften auswirken, wird anhand der dynamischen Grenzflächenspannung untersucht (Bild 4.34).

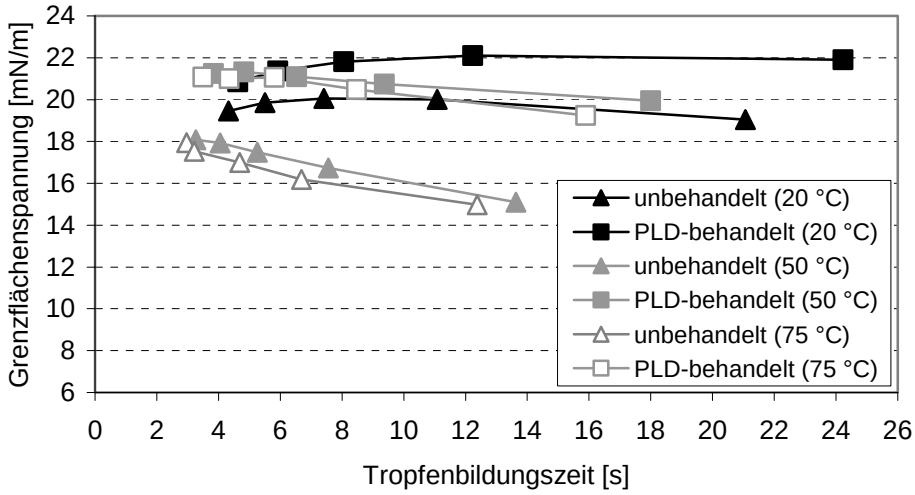


Bild 4.34: Dynamische Grenzflächenspannung zwischen Miglyol und einer Eigelbdispersion (0,5 % Protein) mit unterschiedlich behandeltem Eigelb in Abhängigkeit von Tropfenbildungszeit und Temperatur.

Wie man erkennen kann, hat die Behandlung des Eigelbs mit PLD offenbar keinen Einfluss auf die dynamische Grenzflächenspannung bei 20 °C. Die Erhöhung der Temperatur auf 50 °C und 75 °C führt mit zunehmender Tropfenbildungszeit sogar zu einer Erhöhung der Grenzflächenspannung im Vergleich zum unbehandelten Eigelb. Wie sich die PLD-Behandlung auf die Funktionalität des Eigelbs in Emulsionen auswirkt, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

4.3.5 Einfluss auf die Funktionalität in Emulsionen

Die Emulgiereigenschaften des PLD-behandelten Eigelbs wurden anhand der spezifischen Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil und unterschiedlichen Eigelbkonzentrationen untersucht (Bild 4.35).

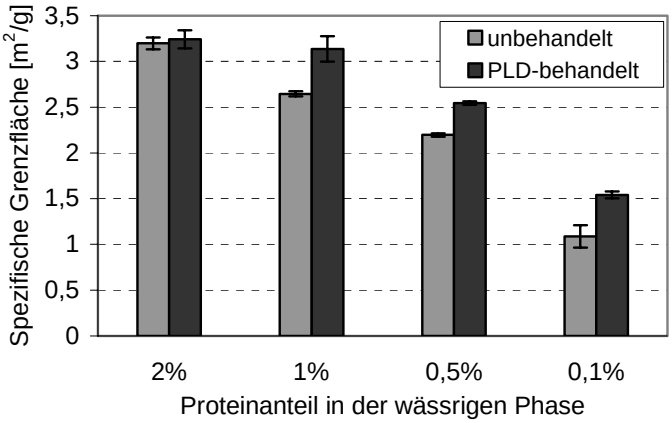


Bild 4.35: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Die spezifische Grenzfläche der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb ist vom Anteil der Proteine in der wässrigen Phase abhängig. Bei der Erhöhung des Proteinanteils von 0,1 % auf 1 % steigt die spezifische Grenzfläche. Allerdings führt die Verdoppelung des Proteinanteils auf 2 % zu keiner weiteren Erhöhung der spezifischen Grenzfläche. Verglichen mit den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb, weisen die Emulsionen, die mit PLD-behandeltem Eigelb stabilisiert sind und einen Proteinanteil von 1 % bis 0,1 % besitzen, eine größere spezifische Grenzfläche und damit höhere Emulgieraktivität auf. Im Gegensatz dazu brachte die PLD-Behandlung des Eigelbs in den Emulsionen mit 2 % Proteinanteil keine Zunahme der spezifischen Grenzfläche, verglichen mit den entsprechenden Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb.

Die verbesserte Emulgieraktivität des PLD-behandelten Eigelbs, die anhand der spezifischen Grenzfläche in den Emulsionen mit 1 % bis 0,1 % Proteinanteil gezeigt wurde, spiegelt die bei der dynamischen Grenzflächenspannung ermittelten Ergebnisse nicht wider (vgl. Kapitel 4.3.4). Allerdings ist die Tropfenbildungszeit bei der Messung der dynamischen Grenzflächenspannung deutlich höher und die Diffusionsgeschwindigkeit der grenzflächenaktiven Substanzen deutlich geringer als bei der Herstellung von Emulsionen mittels Ultra-Turrax. Darüber hinaus ist für die Emulgieraktivität grenzflächenaktiver Substanzen neben der bereits beschriebenen Eigenschaft, schnell zum Öltropfen zu diffundieren, auch die Fähigkeit, die Grenzfläche effektiv zu belegen, d.h. sich der Öltropfenform anzupassen und dadurch soviel Fläche wie möglich zu besetzen, von Bedeutung. Dabei wird durch einen hohen Anteil an α-Helix-Strukturen die Flexibilität der Eigelbproteine deutlich erhöht (Anton *et al*., 2003). Daher kann angenommen werden,

dass durch den erhöhten Anteil der α-Helix-Strukturen im PLD-behandelten Eigelb (vgl. Kapitel 4.3.3) die Flexibilität der Eigelbproteine verbessert wird, so dass die Emulsionsgrenzfläche effektiver stabilisiert werden kann. Auf der anderen Seite spielt auch die Fähigkeit der grenzflächenaktiven Substanzen, die Koaleszenz der Öltropfen während des Emulgierens und während der Lagerung zu reduzieren, eine entscheidende Rolle (Danner, 2005). Die Koaleszenz der Öltropfen kann unter anderem über elektrostatische Abstoßung durch geladene Moleküle im grenzflächenumgebenden Film minimiert werden. So konnten Washington *et al*. (1989) zeigen, dass elektrostatische Abstoßungskräfte in phospholipidstabilisierten Emulsionen durch Zugabe von PA, die bei pH 7 negativ geladen ist, deutlich erhöht werden konnten. Darüber hinaus besaßen diese Emulsionen eine deutlich verbesserte Stabilität im Vergleich zu den mit PC (keine Ladung bei neutralem pH) stabilisierten Emulsionen (Washington *et al*., 1989). Da während der PLD-Behandlung des Eigelbs PC und PE zu PA umgewandelt werden, kann angenommen werden, dass negativ geladene PA-Moleküle an der Emulsionsgrenzfläche adsorbiert werden und so die Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Öltropfen erhöhen. Dadurch werden auch die Koaleszenzvorgänge in den Emulsionen reduziert. Dieser Effekt trägt zusätzlich zur Zunahme der spezifischen Grenzfläche in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb bei (siehe auch Kapitel 4.3.7.3).

Allerdings scheinen diese Effekte (flexiblere Proteine und negativ geladener Grenzflächenfilm) mit der Erhöhung des Eigelbgehaltes in den Emulsionen unwirksam zu werden. So konnte in den Emulsionen mit 2 % Proteinanteil keine Zunahme der spezifischen Grenzfläche nach der Behandlung des Eigelbs mit PLD festgestellt werden. Der Grund dafür liegt vermutlich im Konkurrenzverhalten zwischen den Proteinen und Phospholipiden an der Emulsionsgrenzfläche (Nylander und Ericsson, 1997). Dieser Effekt tritt besonders bei einem Überangebot an grenzflächenaktiven Substanzen, wie es in den Emulsionen mit 2 % Proteinanteil der Fall ist, auf. In den Emulsionen mit reduziertem Anteil an Protein in der wässrigen Phase der Emulsion (1 % bis 0,1 %) ist die Konzentration an Proteinen nicht ausreichend, um die gesamte Grenzfläche zu belegen. Dadurch steigt der Anteil der adsorbierten Phospholipide und damit auch der PA an, wodurch auch die bereits beschriebene elektrostatische Abstoßung erhöht wird. Allerdings wurde im Kapitel 4.1.6 diskutiert, dass die Proteine und die Phospholipide (PC und PE) des Eigelbs nicht einzeln, sondern als Komplex an der Oberfläche der Öltropfen adsorbiert werden. Das würde bedeuten, dass durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD die Proteine und die Phospholipide, insbesondere die gebildete PA, nicht mehr als

Komplex, sondern individuell die Emulsionsgrenzfläche stabilisieren. Auf diese Fragestellung wird im Kapitel 4.3.7 näher eingegangen.

Der Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLD auf die Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase ist im Bild 4.36 dargestellt. Die hitzebedingte Veränderung der spezifischen Grenzflächen der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb sind bereits im Kapitel 4.1.5 ausführlich beschrieben worden.

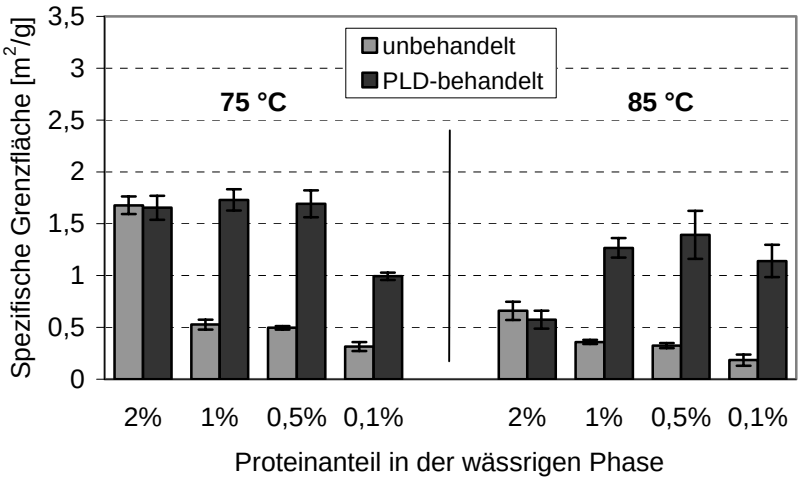


Bild 4.36: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Insgesamt ist bei allen Emulsionen eine Reduzierung der spezifischen Grenzfläche durch die Erhitzung zu erkennen. Allerdings ist die Abnahme der spezifischen Grenzfläche in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit dem Proteinanteil von 1 % bis 0,1 % im Vergleich zu den entsprechenden Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb bei beiden Temperaturen deutlich geringer, was auf eine erhöhte Hitzestabilität hindeutet. Beim Vergleich mit den Emulsionen, die mit dem PLA_2-behandelten Eigelb stabilisiert sind und eine entsprechende Proteinkonzentration aufweisen (Bild 4.7), lässt sich erkennen, dass durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD ein ähnlicher hitzestabilisierender Effekt erreicht wird. Im Gegensatz dazu zeigt die Behandlung des Eigelbs mit PLD in der Emulsion mit 2 % Proteinanteil keinen positiven Einfluss auf deren Hitzestabilität bei beiden Temperaturen, verglichen mit der äquivalenten Emulsion aus unbehandeltem Eigelb.

Die verbesserte Hitzestabilität kann mit der Veränderung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Phospholipiden im Eigelb nach der Behandlung mit PLD in Verbindung gebracht werden. So wird z.B. die thermische Stabilität von β-Lactoglobulin durch Interaktionen mit SDS, einem ionischen Emulgator, deutlich erhöht (Magdassi *et al*., 1996). Von daher kann davon ausgegangen werden, dass durch den ionischen Charakter von PA die Wechselwirkungen zu den Eigelbproteinen insofern verändert werden, dass deren Stabilität gegenüber hitzeinduzierter irreversibler Denaturierung erhöht wird. So ist es möglich, dass die exponierten Seitenketten der Proteine bevorzugt mit den PA-Molekülen wechselwirken, wodurch Wechselwirkungen zu weiteren exponierten Seitenketten und damit die Aggregation der Proteine teilweise verhindert werden. Welche Proteine durch diese Wechselwirkungen im Einzelnen beeinflusst werden, wird im Kapitel 4.3.7 diskutiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Einsatz von PA als Emulgator für O/W-Emulsionen deren Hitzestabilität im Vergleich zu PC und PE deutlich verbesserte, was auf erhöhte elektrostatische Abstoßungen zwischen den Öltropfen zurückgeführt wurde (Chansiri *et al*., 1999). So können vergleichbare Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Öltropfen durch die an der Grenzfläche der Emulsionen aus PLD behandeltem Eigelb adsorbierten PA-Moleküle dazu beitragen, dass diese sich nur in geringem Maße annähern. Auf diese Weise kann die Flockung bzw. die Koaleszenz der Öltopfen verhindert werden.

Der Grund, weshalb diese Verbesserung der Hitzestabilität durch PLD in der Emulsion mit 2 % Proteinanteil nicht nachgewiesen werden konnte, liegt vermutlich in der höheren Konzentration an nicht adsorbierten Proteinen in der kontinuierlichen Phase. Wie bereits beschrieben, kommt es während der thermischen Behandlung proteinstabilisierter Emulsionen zur Destabilisierung des Emulsionssystems. Dabei ist entweder die Flockung oder die Koaleszenz der Öltropfen die Folge (Nikiforidis und Kiosseoglou, 2003). Das hängt mit der Aggregation der durch die Hitzeeinwirkung aufgefalteten Proteine zusammen. Dabei können entweder die adsorbierten Proteine benachbarter Öltropfen oder die nicht adsorbierten Proteine aus der kontinuierlichen Phase der Emulsion mit den adsorbierten Proteinen aggregieren. In diesem Fall spielt die Konzentration der nicht adsorbierten Proteine, die mit der Eigelbkonzentration in der gesamten Emulsion zunimmt, eine entscheidende Rolle. Das bedeutet, je höher die Konzentration der nicht adsorbierten Proteine ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese mit den adsorbierten Proteinen wechselwirken. Darüber hinaus können sie als eine Art „Klebstoff“ zwischen den einzelnen Öltopfen wirken, indem sie mit den

adsorbierten Proteinen zweier oder mehrerer Öltopfen aggregieren, was zu deren Flockung führt. Dadurch werden mehrere Tropfen bei der Messung der Öltropfengrößenverteilung mittels Laserbeugung als ein einziges Partikel erfasst. Dies führt dann ebenso wie die Koaleszenz der Öltopfen zur Herabsetzung der spezifischen Grenzfläche.

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der spezifischen Grenzfläche der Emulsionen nach der Erhitzung durch die Flockung oder durch die Koaleszenz der Öltropfen hervorgerufen wird, wurden die Emulsionen vor der Messung mittels Laserbeugung mit einer 1 %-igen SDS-Lösung versetzt. Durch SDS werden nichtkovalente Bindungen, wie z.B. Wasserstoffbrücken, gespalten. Folglich werden die auf diesen Bindungen basierten Öltropfenaggregate aufgelöst, so dass die tatsächliche Größe einzelner Tropfen bestimmt werden kann (Bild 4.37).

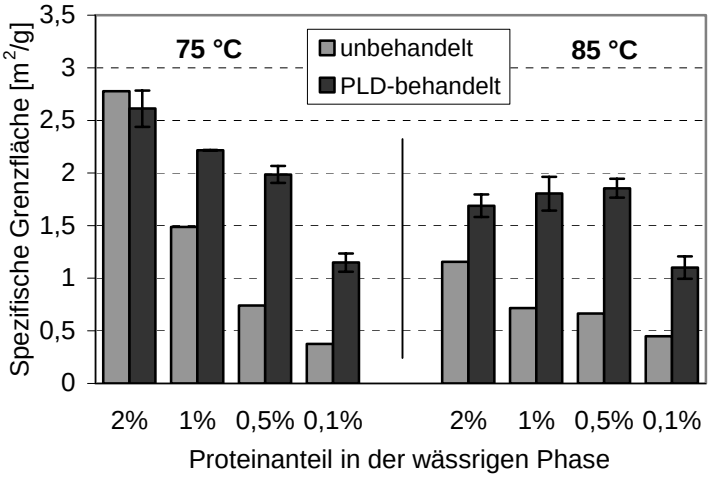


Bild 4.37: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. Die Bestimmung der spezifischen Grenzfläche erfolgte nach Zugabe von SDS in die Emulsionen.

Es lässt sich zunächst erkennen, dass nach der Zugabe von SDS die spezifische Grenzfläche in allen Emulsionen steigt. Dabei nimmt die relative Erhöhung der spezifischen Grenzfläche nach SDS-Zugabe, d.h. der Anteil der hitzeinduzierten Abnahme der spezifischen Grenzfläche, die auf die Flockung und nicht auf die Koaleszenz der Öltropfen zurückzuführen ist, mit der Reduzierung des Proteinanteils ab. Ferner weisen die Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit einem Proteinanteil von 1 % bis 0,1 % auch nach Zugabe von SDS bei beiden Temperaturen höhere spezifische Grenzflächen, verglichen mit den äquivalenten Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb, auf. Dabei scheint die Erhöhung der Temperatur von 75 °C auf 85 °C keinen negativen Einfluss auf die

Stabilität von Emulsionen mit 0,5 % und 0,1 % zu haben. Die Emulsionen mit 2 % Proteinanteil zeigten nach der Erhitzung bei 75 °C zwar eine höhere Hitzestabilität als die Emulsionen mit niedrigeren Proteingehalten, jedoch ergibt sich keine Verbesserung gegenüber der Emulsion aus unbehandeltem Eigelb mit dem gleichen Proteingehalt. Darüber hinaus wird die spezifische Grenzfläche der bei 85 °C erhitzten Emulsion aus PLD-behandeltem Eigelb mit 2 % Proteinanteil durch Zugabe von SDS ebenfalls erhöht. Allerdings weisen die Emulsionen mit niedrigeren Proteineinteilen (1 % und 0,5 %) eine deutlich höhere spezifische Grenzfläche auf. Daraus kann man schlussfolgern, dass die hitzeinduzierte Flockung der Öltropfen in der Emulsion mit 2 % Proteinanteil durch PLD-Behandlung nur geringfügig vermindert werden kann.

4.3.6 Rheologische Eigenschaften

Die im Kapitel 4.3.2 gezeigte Proteinnetzwerkausbildung im Eigelb nach der Behandlung mit PLD müsste auch einen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften der aus solchem Eigelb hergestellten Emulsionen haben. Deswegen wurden auch die Viskositäten der Emulsionen aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb gemessen, die Viskositätsfunktionen mit dem Ansatz nach Ostwald de Waele ausgewertet und mit Hilfe des Konsistenzfaktors K miteinander verglichen. (Bild 4.38).

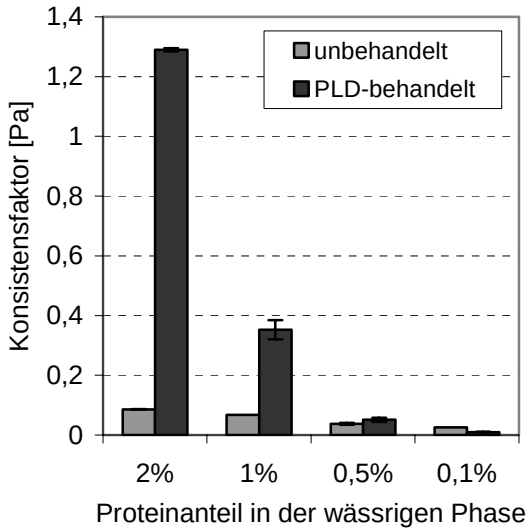


Bild 4.38: Konsistenzfaktor nach Ostwald de Waele von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Tatsächlich führt die PLD-Behandlung des Eigelbs zu einem deutlichen Anstieg des Konsistenzfaktors der daraus hergestellten Emulsionen mit 2 % und 1 % Proteinanteil.

Besonders deutlich ist die Zunahme der Viskosität der Emulsion mit dem Proteinanteil von 2 %. Damit konnte gezeigt werden, dass mit der Reduzierung des Eigelbgehaltes auch der Unterschied zwischen den Viskositäten der Emulsionen aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb abnimmt. So geht die Viskosität der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit sinkendem Proteinanteil merklich zurück. Das hängt damit zusammen, dass bei der Reduzierung des Proteinanteils der Anteil an adsorbierten grenzflächenaktiven Substanzen, vor allem der Proteine, deutlich steigt, so dass der Anteil der in der kontinuierlichen Phase der Emulsion verbliebenen Proteine abnimmt und somit die Ausbildung eines Proteinnetzwerkes deutlich reduziert wird.

4.3.7 Zusammensetzung und Struktur der Emulsionsgrenzfläche

4.3.7.1 Proteingrenzflächenbelegung

Die Belegung der Grenzfläche der O/W-Emulsionen, hergestellt aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion ist im Bild 4.39 dargestellt.

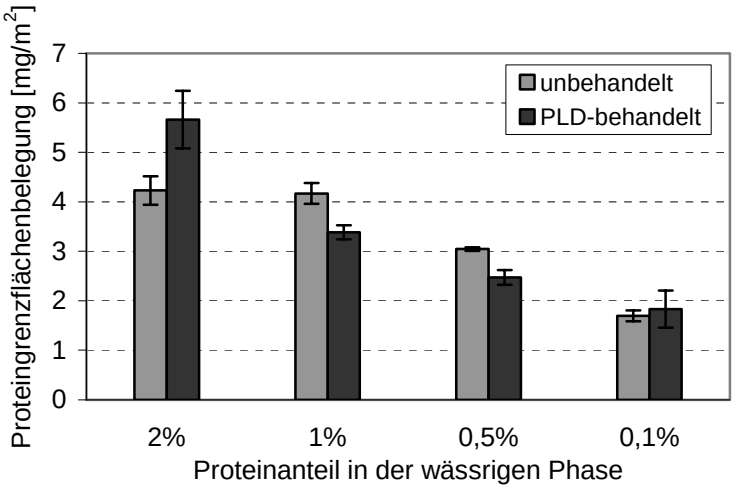


Bild 4.39: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Die Proteingrenzflächenbelegung der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb wurde bereits im Kapitel 4.1.6.1 ausführlich diskutiert. Die Proteingrenzflächenbelegung in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb nimmt mit der Reduzierung des Proteinanteils in der wässrigen Phase der Emulsionen wie erwartet ab. Die Belegung der Grenzfläche mit Proteinen ist in der Emulsion aus PLD-behandeltem Eigelb mit 2 % Proteinanteil höher, verglichen mit der entsprechenden Emulsion aus unbehandeltem Eigelb. Im

Gegensatz dazu führt die PLD-Behandlung des Eigelbs in den Emulsionen mit 1 % und 0,5 % Proteinanteil zu einer Abnahme der Proteingrenzflächenbelegung. In der Emulsion mit 0,1 % Proteinanteil führt die PLD-Behandlung zu keiner Veränderung der Proteingrenzflächenbelegung.

Die Erhöhung der Grenzflächenbelegung in der Emulsion mit 2 % verdeutlicht, dass die Sättigungskonzentration der Proteine an der Grenzfläche nach der Behandlung des Eigelbs mit PLD deutlich höher ist, verglichen mit der entsprechenden Emulsion aus unbehandeltem Eigelb. Insgesamt hängt die höhere Proteingrenzflächenbelegung offenbar mit der Zunahme der Konzentration der nicht adsorbierten Proteine zusammen. Durch Aggregation zwischen den Proteinen aus der kontinuierlichen Phase und den am Grenzflächenfilm adsorbierten Proteinen steigt auch die Gesamtproteingrenzflächenbelegung dieser Emulsion. Wird allerdings die Proteinkonzentration verringert (1 % und 0,5 %), so werden weniger Proteine an die Grenzfläche angekoppelt und die Proteingrenzflächenbelegung geht im Vergleich zu den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb zurück. Wird der Eigelbgehalt in der Emulsion weiter reduziert, so dass der Proteinanteil bei 0,1 % liegt, werden die Grenzflächen beider Emulsionen (unbehandeltes und PLD-behandeltes Eigelb) durch Proteine soweit belegt, dass deutlich weniger Proteine in der kontinuierlichen Phase verbleiben. Damit ergibt sich auch kein Unterschied bezüglich der Proteingrenzflächenbelegung. Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteine ist Bild 4.40 zu entnehmen.

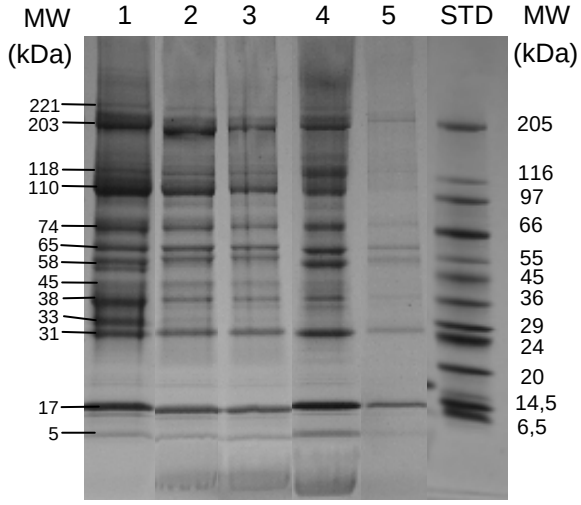


Bild 4.40: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bahn 1: Eigelb; 2–5: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil, MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard.

Die Liste der mittels SDS-PAGE getrennten Proteine mit den dazugehörenden Molekülmassen ist im Kapitel 3.3.2.3 zu finden. Es zeigt sich, dass fast alle Proteine des Eigelbs an der Grenzfläche adsorbiert sind. Ausnahmen bilden Proteine mit Molekülmassen von 33 und 58 kDa, die als β-Livetin bzw. γ-Livetin identifiziert werden können. Obwohl beide Proteine grenzflächenaktiv sind, besitzen sie eine schwächere Affinität zur Grenzfläche gegenüber den anderen Eigelbproteinen und können so leicht verdrängt werden (Aluko und Mine, 1997; Nilsson *et al*., 2006). Insgesamt ergeben sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche zu den aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen (vgl. Bild 4.12).

Inwieweit sich die Erhitzung bei 75 °C und 85 °C auf die Proteingrenzflächen der Emulsionen, die mit PLD-behandeltem Eigelb stabilisiert sind, auswirkt, kann Bild 4.41 entnommen werden.

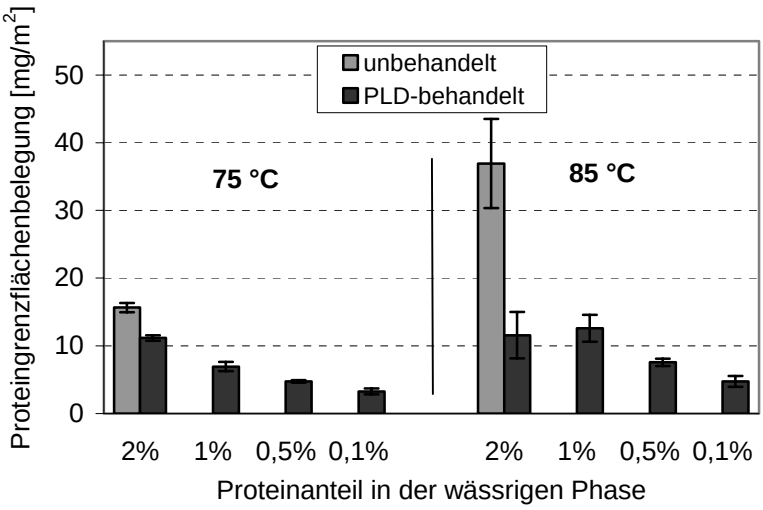


Bild 4.41: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Insgesamt nimmt die Proteingrenzflächenbelegung nach der Erhitzung der Emulsionen zu. Die Proteingrenzflächenbelegung der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb hängt mit der Proteinkonzentration in diesen Emulsionen zusammen. Offenbar aggregieren Teile der Proteine aus der kontinuierlichen Phase der Emulsion mit den adsorbierten Proteinen, was zur Zunahme der Dicke des grenzflächenumgebenden Films und demzufolge auch zur Erhöhung der Proteingrenzflächenbelegung führt. Die Behandlung des Eigelbs mit PLD führt allerdings zu einer deutlichen Verringerung der Proteingrenzflächenbelegung, sowohl im Vergleich zum unbehandelten als auch zum PLA_2-behandelten Eigelb (Bild 4.8). Das bedeutet, dass die Modifizierung der Phospholipide mit PLD

die Aggregation der adsorbierten Proteine mit den nicht adsorbierten deutlich reduziert. Da aber die Auffaltung der adsorbierten Proteine zur erhöhten Aggregation mit den nicht adsorbierten Proteinen führen kann, ist es möglich, dass durch die veränderten Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Phospholipiden im grenzflächenumgebenden Film nach der Modifizierung der Phospholipide mit PLD die Aggregationsvorgänge verhindert werden. Welche Proteine an der Grenzfläche davon betroffen sind, kann anhand der Untersuchung der Zusammensetzung mittels SDS-PAGE analysiert werden. Die Darstellung einer gelektrophoretischen Auftrennung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen, d.h. nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol, was zur Auflösung der Aggregate führt, zeigt keinen Unterschied in der Proteinzusammensetzung nach der Hitzebehandlung (Bild 6.6 im Anhang). Das bedeutet, dass die Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche der Emulsion unverändert bleibt. Ob die einzelnen Proteine hitzeinduzierte Aggregate bilden, kann mittels der nicht reduzierenden SDS-PAGE, d.h. ohne Zusatz von 2-Mercaptoethanol, ermittelt werden. Wie bereits im Kapitel 4.1.6.1 ausführlich beschrieben, führt die hitzeinduzierte Aggregation der Proteine zur Zunahme der Molekülgröße, so dass denaturierte, unlösliche Proteine nicht in der Lage sind, im Gel zu wandern. Demzufolge sind die im SDS-PAGE-Gel nicht mehr sichtbaren Proteine bei entsprechenden Temperaturen hitzelabil. Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen kann somit Auskunft über die Hitzestabilität adsorbierter Eigelbproteine geben (Bild 4.42).

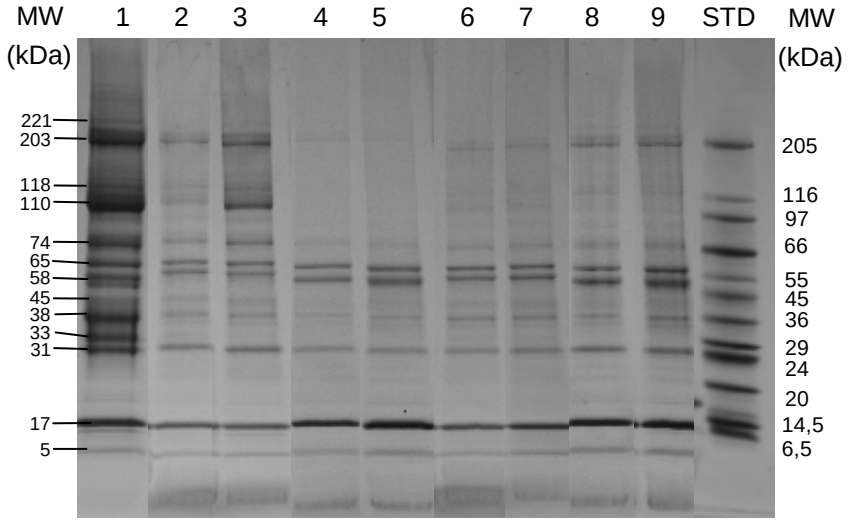


Bild 4.42: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil und nach Hitzebehandlung, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bahn 1: Eigelb; 2–5: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil, nach Erhitzung bei 75 °C; 6–9: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil nach Erhitzung bei 85 °C. MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard.

Die Hitzebehandlung der Emulsionen führt insgesamt zu einer Abnahme der Bandenintensität aller Proben. Zwar nimmt die Bandenintensität der Proteine mit höheren Molekülmassen (von 74 bis 221 kDa) in den Emulsionen mit 2 % und 1 % Proteinanteil nach der Erhitzung bei 75 °C ab (Bild 4.42, Bahn 2 und 3), jedoch sind alle Proteine, die in den entsprechenden nicht erhitzten Emulsionen (Bild 4.40, Bahn 2 und 3) vorhanden waren, auch hier sichtbar. Die Intensität der Proteine im niedrigeren Molekülmassenbereich (5 bis 65 kDa) wird dagegen durch die Erhitzung der Emulsionen nicht beeinträchtigt. Insgesamt ergeben sich bezüglich der Proteinzusammensetzung nach der Erhitzung der Emulsion mit 2 % Proteinanteil keine Unterschiede zur entsprechenden Emulsion aus unbehandeltem Eigelb (Bild 4.12, Bahn 2). In den Bahnen 4 und 5 (bei 75 °C erhitzte Emulsionen mit 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil) sind die Banden im oberen Molekülmassenbereich, die entsprechend Apo-LDL und Apo-HDL darstellen, dagegen entweder kaum sichtbar (203 und 74 kDa) oder vollständig verschwunden (100, 45 sowie 120 kDa). Die Letzteren konnten als Apo-HDL sowie γ-Livetine identifiziert werden. Bahnen 6 bis 9 zeigen ein nahezu gleiches Bandenmuster. Dabei konnte nur die Bande mit der Molekülmasse von 110 kDa, die das mengenmäßig wichtigste Apo-HDL des Eigelbs darstellt, nicht nachgewiesen werden. Dagegen sind die Banden mit 203 kDa (Apo-LDL) deutlich zu erkennen.

Le Denmat *et al*. (1999) untersuchten das Denaturierungsverhalten der Eigelbproteine und stellten fest, dass das Apo-LDL und die Livetine bei pH 7 und einer Ionenstärke von 0,15 M bereits ab einer Temperatur von 70 °C denaturieren. Die Apo-HDL-Fraktion ist dagegen weniger wärmesensitiv und wird erst ab 76 °C beeinträchtigt. Allerdings zeigt sich, dass durch die Modifizierung der Phospholipide mit PLD die Apo-LDL des Eigelbs auch bei 85 °C noch hitzestabil sind, bzw. dass die hitzeinduzierte Aggregation dieser Proteinfraktion minimiert wird. Dagegen wird die Hitzestabilität der mengenmäßig wichtigsten Apo-HDL-Fraktion (110 kDa) durch Behandlung des Eigelbs mit PLD nicht beeinflusst. Darüber hinaus konnten bei der Untersuchung der Zusammensetzung der Proteine der bei 85 °C erhitzten Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb (Bild 4.13, Bahnen 3–6) keine Banden im Bereich von 221 bis 74 kDa detektiert werden. Das bedeutet, dass durch die Modifizierung der Phospholipide mittels PLA_2 die hitzeinduzierte Aggregation von Apo-LDL (203 kDa) nicht verhindert werden kann, wie es durch die Behandlung mit PLD offenbar der Fall ist.

4.3.7.2 Phospholipidgrenzflächenbelegung

Im Bild 4.43 ist der Einfluss der Behandlung des Eigelbs mit PLD auf die Belegung der Grenzfläche der aus diesem Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen mit Phospholipiden in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase dargestellt.

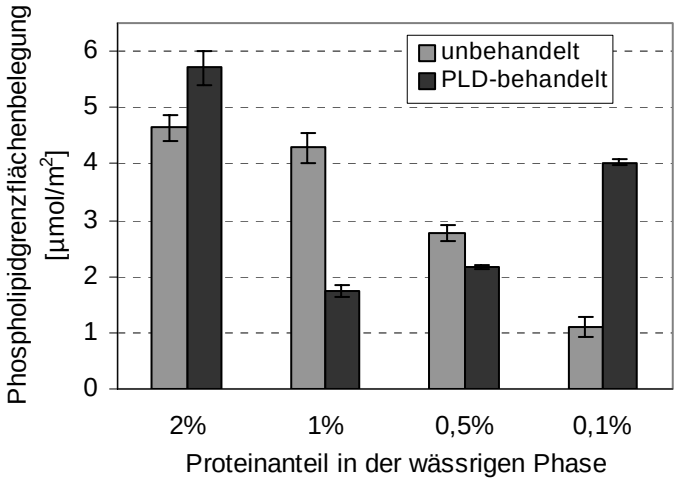


Bild 4.43: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion

Es ergeben sich deutliche Unterschiede in der Phospholipidgrenzflächenbelegung sowohl zwischen den Emulsionen aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb als auch zwischen den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit unterschiedlichen Proteingehalten in der wässrigen Phase. Die Phospholipidgrenzflächenbelegung der aus unbehandeltem Eigelb hergestellten Emulsionen wurde bereits im Kapitel 4.1.6.2 ausführlich diskutiert. Während die Phospholipidgrenzflächenbelegung der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb mit der Reduzierung des Proteinanteils von 1 % auf 0,1 % generell abnimmt, nimmt diese in den entsprechenden Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb zu. Andererseits erfolgt in der Emulsion mit 2 % Proteinanteil ebenfalls eine Steigerung der Phospholipidgrenzflächenbelegung nach Behandlung des Eigelbs mit PLD.

Anscheinend wird die Verringerung des Proteingehaltes in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb durch die Adsorption der Phospholipide an der Grenzfläche kompensiert. Wie in der Tabelle 4.7 zu erkennen ist, wird dabei in den Emulsionen mit 1 %, 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase, bevorzugt PA an der Grenzfläche adsorbiert. In der Emulsion mit 2 % Proteinanteil ist die absolute PA-Konzentration zwar höher als in den anderen Emulsionen, liegt aber etwas unter der Konzentration von PC.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion

Proteinanteil in der wässrigen Phase	PC	PE	PA
unbehandelt			
2 %	9,5 ± 0,61	1,5 ± 0,11	< 0,1
1 %	7,9 ± 0,44	1,2 ± 0,02	< 0,1
0,5 %	4,6 ± 0,31	0,6 ± 0,07	< 0,1
0,1 %	1,1 ± 0,05	0,1 ± 0,01	< 0,1
PLD-behandelt			
2 %	5,1 ± 0,39	1,8 ± 0,01	3,5 ±0,26
1 %	0,1 ± 0,04	0,3 ± 0,02	2,5 ±0,13
0,5 %	0,7 ± 0,03	0,2 ± 0,01	2,4 ±0,01
0,1 %	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	2,4 ±0,01

Die PA-Konzentration an der Grenzfläche bleibt trotz des reduzierten Proteinanteils (1 % bis 0,1 %) in den Emulsionen konstant. Dabei zeigte sich bei den Emulsionen aus unbehandeltem sowie PLA_2-behandeltem Eigelb, dass bei der Verringerung der Proteingrenzflächenbelegung in den Emulsionen auch die Phospholipidgrenzflächenbelegung entsprechend zurückging (vgl. Kapitel 4.1.6.1). Daraus wurde geschlossen, dass die Belegung der Grenzfläche in diesen Emulsionen durch den Protein-Phospholipid-Komplex erfolgt, was auch durch die CLSM-Aufnahmen (vgl. Kapitel 4.1.6.4) bestätigt werden konnte. Die konstante PA-Konzentration an der Grenzfläche trotz einer Reduzierung der Eigelbkonzentration könnte bedeuten, dass PA nicht im Komplex mit Proteinen an der Emulsionsgrenzfläche adsorbiert wird. Die höhere Konzentration von PC an der Grenzfläche der Emulsionen mit 2 % Proteinanteil lässt aber vermuten, dass bei einem Überangebot an Proteinen PA gemeinsam mit PC und PE auch als Komplex adsorbiert werden kann.

Die Erhitzung der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb bei 75 °C und 85 °C führt zur Zunahme der Phospholipidgrenzflächenbelegung im Vergleich zu den nicht erhitzten Emulsionen (Bild 4.44). Jedoch liegt diese bei Emulsionen mit 2 % Proteinanteil deutlich unter der Belegung der Grenzfläche mit Phospholipiden in der entsprechenden Emulsion aus unbehandeltem Eigelb. Besonders deutlich wird dieser Unterschied nach der Erhitzung bei 85 °C.

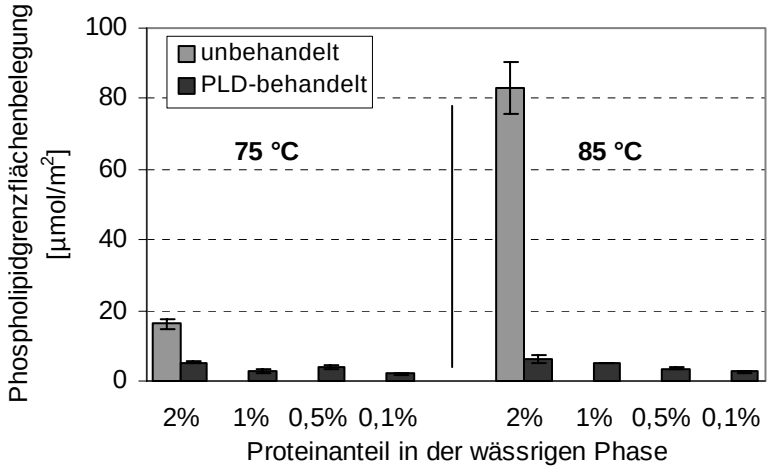


Bild 4.44: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Die geringere Phospholipidgrenzflächenbelegung der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb im Vergleich zu den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb hängt mit der entsprechenden Verringerung der Proteingrenzflächenbelegung (Bild 4.41) zusammen. Dadurch, dass die Aggregation der Proteine nach der Enzymbehandlung des Eigelbs verringert wird, gelangen auch weniger Phospholipide, die als Komplex an Proteine gebunden sind, an die Grenzfläche. Welche Rolle dabei PA spielt, ist aus den Daten in Tabelle 4.8 erkennbar.

Tabelle 4.8: Konzentration von PA an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung bei 85 °C und 75°C

Erhitzungs-temperatur	Proteinanteil in der wässrigen Phase	PA
75 °C	2 %	5,7 ±1,01
	1 %	2,7 ±0,33
	0,5 %	2,7 ±0,29
	0,1 %	1,7 ±0,14
85 °C	2 %	4,3 ±1,40
	1 %	3,0 ±0,18
	0,5 %	2,8 ±0,11
	0,1 %	2,1 ±0,20

Betrachtet man zunächst die Emulsionen mit niedrigem Proteinanteil (1 % bis 0,1 %), die bei 75 °C erhitzt wurden, so kann man erkennen, dass praktisch keine Zunahme der PA-Konzentration im Vergleich zu den nicht erhitzen Emulsionen an der Grenzfläche erfolgt. Dasselbe Ergebnis ist auch bei den Emulsionen mit 1 % bis 0,1 % Proteinanteil nach der Erhitzung bei 85 °C zu beobachten. Dagegen findet in der Emulsion mit 2 % bei beiden

Temperaturen eine Zunahme der PA-Konzentration statt. Da die Proteingrenzflächenbelegung in allen Emulsionen nach der Erhitzung bei beiden Temperaturen zunimmt (Bild 4.41), geht aus den Ergebnissen bezüglich der PA-Konzentration hervor, dass PA sowohl im Komplex mit Proteinen aber auch einzeln an der Grenzfläche adsorbiert werden kann.

4.3.7.3 Ladung der Emulsionsgrenzfläche

Wie bereits diskutiert wurde, lassen sich die verbesserten Emulgiereigenschaften des Eigelbs nach Behandlung mit PLD, u.a. auf die Zunahme der elektrostatischen Abstoßung der Öltropfen in den daraus hergestellten Emulsionen zurückführen. Die elektrostatischen Eigenschaften, d.h. die Ladung der Oberfläche der Öltropfen, können durch das ζ-Potential charakterisiert werden. Im Bild 4.45 sind die ζ-Potentiale der Grenzfläche der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit unterschiedlichen Proteingehalten im Vergleich zu den entsprechenden Emulsionen hergestellt aus unbehandeltem Eigelb dargestellt.

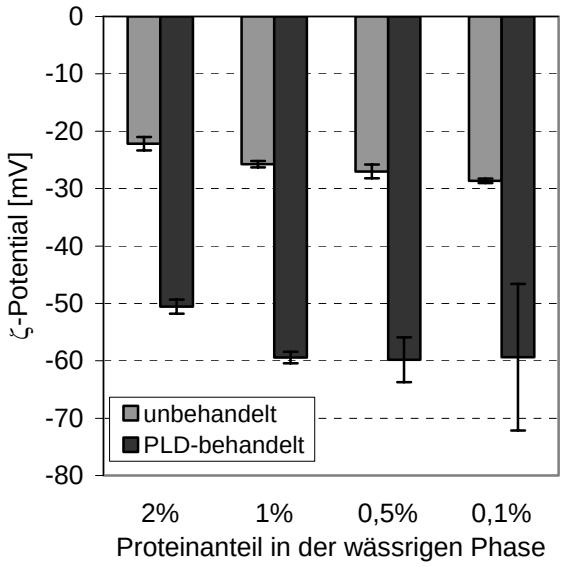


Bild 4.45: ζ-Potential der Emulsionsgrenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Das ζ-Potential in den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb wurde bereits im Kapitel 4.1.6.5 ausführlich diskutiert. Die Behandlung des Eigelbs mit PLD führt zu einer deutlichen Erhöhung der negativen Ladung der Emulsionsgrenzfläche. Dabei ist das ζ-Potential in den Emulsionen mit 1 %, 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil in der wässrigen Phase

untereinander vergleichbar. Außerdem liegt der Wert etwas über dem in den Emulsionen mit 2 % Proteinanteil.

Es ist davon auszugehen, dass die Zunahme der negativen Ladung in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb auf die an der Grenzfläche adsorbierte PA zurückzuführen ist. Die ζ-Potential-Werte in den Emulsionen mit 1 % bis 0,1 % Proteinanteil hängen eng mit der PA-Konzentration an der Grenzfläche in diesen Emulsionen zusammen (Tabelle 4.7). Zwar konnte man in der Emulsion mit 2 % Proteinanteil eine höhere Konzentration an PA nachweisen, doch wurde dabei auch vermutet, dass durch die relativ hohe Belegung der Grenzfläche mit Proteinen in dieser Emulsion ein Teil von PA im Komplex mit Proteinen an die Grenzfläche gelangt. Dadurch werden vermutlich die reaktiven Gruppen von PA durch ionische Wechselwirkungen mit den Proteinseitenketten abgedeckt, so dass sie keinen Beitrag zum Wert des ζ-Potentials leisten können.

4.3.7.4 Stabilität des Grenzflächenfilms

Durch die Bestimmung des extrahierbaren Fettanteils ist die Möglichkeit gegeben, die Stabilität des Grenzflächenfilms zu charakterisieren. Dabei gilt, je dichter und stabiler der Grenzflächenfilm, desto weniger Fett kann extrahiert werden (vgl. Kapitel 4.1.6.6). Die Höhe des extrahierbaren Fettanteils in den Emulsionen aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase ist im Bild 4.46 dargestellt.

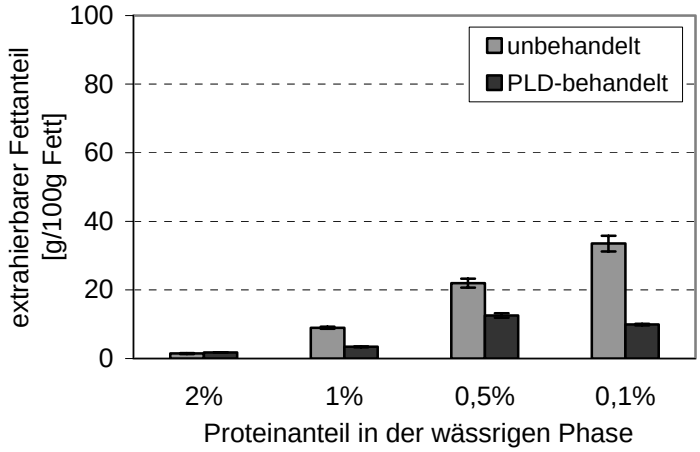


Bild 4.46: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion.

Wie bereits im Kapitel 4.1.6.6 beschrieben und diskutiert, führen die Reduzierung des Proteinanteils in der Emulsion und die damit verbundene Verringerung der Dicke des Grenzflächenfilms zur Erhöhung des extrahierbaren Fettanteils. Zwar nimmt der Anteil des extrahierbaren Fettes in den Emulsionen, die aus PLD-behandeltem Eigelb hergestellt wurden, mit der Reduzierung des Proteingehaltes auch etwas zu, doch ist diese Zunahme deutlich niedriger als in den entsprechenden Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb. Damit konnte die Erhöhung der Dichtigkeit des Grenzflächenfilms in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb bestätigt werden. Wie sich das auf die Stabilität des Grenzflächenfilms nach der Erhitzung der Emulsionen auswirkt, kann Bild 4.47 entnommen werden.

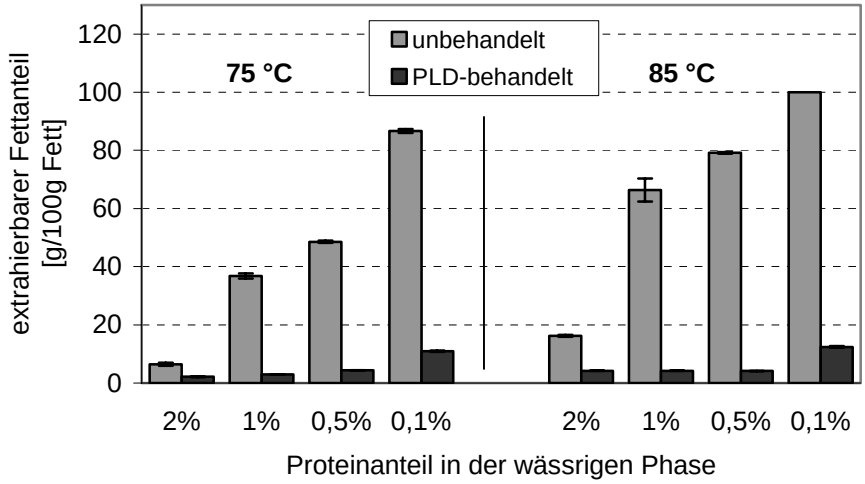


Bild 4.47: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C.

Während der extrahierbare Fettanteil in den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb nach der Erhitzung deutlich zunimmt, führt die Behandlung des Eigelbs mit PLD dazu, dass der Anteil des extrahierbaren Fettes auch nach der Erhitzung der daraus hergestellten Emulsionen sowohl bei 75 °C als auch bei 85 °C nur geringfügig zunimmt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Stabilität des Grenzflächenfilms gegenüber Hitzeeinwirkung nach der Modifizierung der Phospholipide durch PLD deutlich erhöht wird. Darüber hinaus ist die Hitzestabilität des Grenzflächenfilms in den Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb mit dem niedrigerem Proteinanteil (0,5 % und 0,1 %), verglichen mit den entsprechenden Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb (Bild 4.21), bei beiden Temperaturen höher.

4.3.7.5 Struktur der Emulsionsgrenzfläche

Im Bild 4.48 sind CLSM-Aufnahmen der mit PLD-behandeltem Eigelb stabilisierten Emulsionen dargestellt.

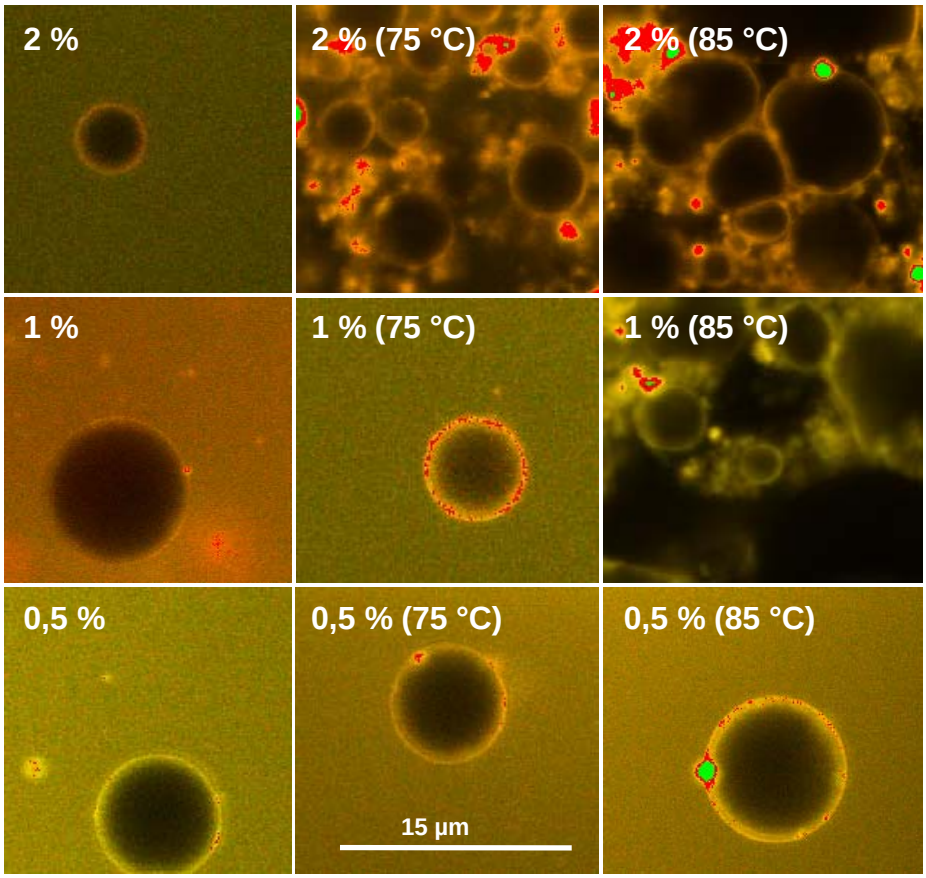


Bild 4.48: CLSM-Aufnahmen der Öltropfengrenzfläche von nicht erhitzten und bei 75 °C bzw. 85 °C erhitzten O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit PLD-behandeltem Eigelb mit 2 %; 1 % und 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase.

Bei der Betrachtung der CLSM-Aufnahmen der Grenzflächen der nicht erhitzten Emulsionen (Bild 4.48, linke Seite) ist zu erkennen, dass diese vollständig von einem gleichmäßigen und homogenen Film umschlossen sind. Beim Vergleich mit den Grenzflächen der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb (Bild 4.18) erscheint der Grenzflächenfilm nach der Behandlung des Eigelbs mit PLD deutlich dichter. Damit kann auch der bereits diskutierte niedrigere Anteil des extrahierbaren Fettes in diesen Emulsionen (Bild 4.46) erklärt werden. Die Orangefärbung des Grenzflächenfilms, die sich aus Überlappung von grün (Proteine) und rot (Phospholipide) ergibt, weist darauf hin, dass die Grenzfläche in allen Emulsionen von einem Protein-Phospholipid-Komplex umgeben ist. In den Emulsionen mit 1 % und 0,5 % Proteinanteil sind außerdem noch einzelne Phospholipid-Cluster (rot), die im Grenzflächenfilm eingebettet sind, erkennbar. Das

würde die Annahme bestärken, dass bei der Reduzierung des Eigelbgehaltes die Grenzfläche sowohl durch den Protein-Phospholipid-Komplex als auch durch einzelne Phospholipide (hauptsächlich PA) stabilisiert wird (vgl. Kapitel 4.3.7.2). Dabei nimmt die Dicke des Grenzflächenfilms mit der Reduzierung des Eigelbgehaltes in den Emulsionen (von 2 % auf 0,5 % Proteinanteil) ab.

Nach der Erhitzung bei 75 °C und 85 °C sind deutliche Unterschiede in der Grenzflächenfilmstruktur der Emulsionen erkennbar. Betrachtet man zunächst nur die bei 75 °C erhitzten Emulsionen mit 2 % Proteinanteil, so kann man sowohl einzelne als auch zusammengelagerte Öltropfen erkennen. Zwischen den Öltropfen sind sowohl aggregierte Protein-Phospholipid-Komplexe als auch einzelne Proteine und Phospholipide sichtbar. Diese aggregieren mit dem an der Grenzfläche adsorbierten Protein-Phospholipid-Komplex und führen so zur Flockung der Öltropfen. Dies würde auch die Abnahme der spezifischen Grenzfläche dieser Emulsionen nach der Erhitzung bei 75 °C erklären (Bild 4.36). Allerdings scheint die Stabilität des Grenzflächenfilms davon nicht negativ beeinflusst zu sein. So ist dieser auch nach der Erhitzung noch völlig intakt und bedeckt die gesamte Öltropfenoberfläche. Demnach führt die Erhitzung dieser Emulsion bei 75 °C zwar zur Flockung der Öltropfen, aber nicht zu dessen Koaleszenz. Die CLSM-Aufnahmen der Grenzfläche der Emulsion mit 2 % Proteinanteil nach Erhitzung bei 85 °C zeigen, dass die Öltropfen zwar vorhanden sind (vgl. dazu auch bei 85 °C erhitzten Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb, Bild 4.18), doch sind sie etwas größer und lagern sich deutlich dichter aneinander. Dadurch erhöht sich das Risiko der Koaleszenz der Öltropfen, wodurch ihre Größe auch zunimmt. Bestätigt wird diese Beobachtung dadurch, dass die spezifische Grenzfläche dieser Emulsion auch nach Zugabe von SDS noch relativ niedrig bleibt (Bild 4.37).

In der Emulsion mit 1 % Proteinanteil sind in den CLSM-Aufnahmen einzelne, d.h. nicht aggregierte Öltropfen erkennbar. Darüber hinaus konnten keine Protein- oder Phospholipid-Aggregate zwischen den Öltropfen beobachtet werden. Wie man deutlich erkennen kann, bleibt der Grenzflächenfilm nach der Erhitzung der Emulsion bei 75 °C völlig intakt. Zusätzlich erscheint dieser, im Vergleich zum Grenzflächenfilm der nicht erhitzten Emulsion, etwas dicker. Außerdem setzt sich der Grenzflächenfilm neben dem Protein-Phospholipid-Komplex auch aus einzelnen Phospholipid-Clustern zusammen. Die Erhitzung der Emulsion auf 85 °C führt allerdings auch bei dieser Emulsion zur Flockung der Öltropfen und zu Aggregatbildungen von Proteinen und Phospholipiden

zwischen den Öltropfen. Gleichzeitig kann eine partiell auftretende Zunahme der Öltropfengröße beobachtet werden, die auf die hitzeinduzierte Koaleszenz dieser hindeutet. Dagegen bleibt der Grenzflächenfilm in den Emulsionen mit 0,5 % Proteinanteil nach der Erhitzung bei beiden Temperaturen vollkommen intakt. Ferner sind keine Aggregatbildungen zwischen den Öltropfen zu beobachten. Dadurch bleibt die Dicke des Films praktisch unverändert. Auch hier kann man erkennen, dass der Grenzflächenfilm zusätzlich zum Protein-Phospholipid-Komplex auch durch einzelne Phospholipid-Cluster stabilisiert wird.

Somit zeigen auch die CLSM-Aufnahmen, dass die Hitzestabilität des Grenzflächenfilms durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD deutlich verbessert wird. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Auswirkung der Erhitzung auf die Emulsionsstruktur vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsionen abhängig ist. So aggregieren die Protein-Phospholipid-Komplexe aus der kontinuierlichen Phase mit dem Grenzflächenfilm und bewirken zunächst eine Flockung der Öltropfen, die bei höheren Temperaturen zu deren Koaleszenz führen kann. Jedoch wird die Koaleszenz durch die PLD-Behandlung des Eigelbs deutlich reduziert. Der Grenzflächenfilm in den Emulsionen mit niedrigem Proteinanteil in der wässrigen Phase wird dagegen durch die Hitzeeinwirkung nur wenig beeinflusst.

4.3.8 Diskussion möglicher Mechanismen, die zur Verbesserung der Emulgiereigenschaften des Eigelbs durch *In-situ*-Behandlung mit PLD führen

In den vorhergehenden Kapiteln konnte erstmals gezeigt werden, dass das Eigelb nach Verdünnung mit Wasser als Substrat für die Inkubation mit PLD aus *Streptomyces chromofuscus* geeignet ist (Bild 4.30). Die enzymatische Hydrolyse von PC und PE im Eigelb resultiert in einer Zunahme des Gehaltes an PA. Diese Modifikation der Eigelbphospholipide führt dabei zu einer signifikanten Verbesserung der techno-funktionellen Eigenschaften des Eigelbs. Zum einen konnte die Emulgieraktivität des Eigelbs, im Vergleich zum unbehandelten Eigelb, erhöht werden (Bild 4.35). Auf der anderen Seite wurde auch die Hitzestabilität der entsprechenden Emulsionen deutlich verbessert (Bild 4.36 und Bild 4.37). Nachfolgend sollen die möglichen molekularen Mechanismen, die eine derartige Verbesserung im Eigelb bewirken, diskutiert werden.

In erster Linie können die veränderten techno-funktionellen Eigenschaften des Eigelbs auf die Bildung von PA, die im Gegensatz zu zwitterionischen PC und PE in neutralen pH-Bereichen negativ geladen ist (Washington, 1989), zurückgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die PA an der Emulsionsgrenzfläche verstärkt adsorbiert wird (Tabelle 4.7), wobei diese sowohl im Komplex mit Eigelbproteinen als Protein-Phospholipid-Komplex als auch individuell die Grenzfläche bedeckt (Bild 4.48). Die Adsorption von PA an der Grenzfläche führt zu einer deutlichen Erhöhung der negativen Ladung der Grenzfläche, was anhand des ζ-Potentials nachweisbar war (Bild 4.45). Durch die Ladung der Grenzfläche nimmt die elektrostatische Abstoßung der Öltropfen in der Emulsion zu (Washington, 1989). Dadurch kann vermutlich die Koaleszenz der Öltropfen während des Emulgiervorganges oder während der Lagerung der Emulsionen verringert werden, was auch zur größeren spezifischen Grenzfläche beiträgt (Danner, 2005). Bezüglich der Emulgieraktivität des Eigelbs spielen die Eigelbproteine allerdings, verglichen mit den Phospholipiden, eine deutlich dominierendere Rolle (Kiosseoglou, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass durch Modifikation der Phospholipide mit PLD der Anteil an α-Helix-Strukturen signifikant erhöht wird (Bild 4.33). Nach Anton *et al*. (2003) verbessern die α-Helix-Strukturen die Flexibilität der Eigelbproteine, wodurch sie in der Lage sind, sich der Form der Öltropfen optimal anzupassen und diese somit effektiv, d.h. vollständig zu bedecken. Wie man anhand der CLSM-Aufnahmen (Bild 4.48) zeigen konnte, führt die erhöhte Flexibilität der Eigelbproteine nach Behandlung mit PLD zu einer homogeneren und gleichmäßigeren Belegung der Öltropfen. Auch die Stabilität des Grenzflächenfilms konnte im Vergleich zum unbehandelten Eigelb erhöht werden (Bild 4.46).

Für die verbesserte Hitzestabilität der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb sind vermutlich zwei Mechanismen verantwortlich. Zum einen spielen die veränderten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Phospholipiden, insbesondere PA, eine Rolle. So kann beispielsweise die Stabilität von Proteinen gegenüber Hitzeeinwirkung durch Wechselwirkungen mit dem ionischen Emulgator SDS verbessert werden (Magdassi *et al.*, 1995). Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die hitzebedingte Abnahme des Anteils an α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine bei beiden Temperaturen durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD zurückgeht (Bild 4.33 B). Daher kann angenommen werden, dass durch die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Eigelbproteinen und den negativ geladenen PA die Stabilität der Proteine gegenüber thermisch induzierter Aggregation erhöht wird. Dadurch konnte die Destabilisierung des Grenzflächenfilms in den Emulsionen signifikant herabgesetzt werden. Andererseits wurde

auch gezeigt, dass O/W-Emulsionen, die mit PA stabilisiert sind, eine deutlich höhere Hitzestabilität aufweisen als entsprechende Emulsionen mit PC oder PE als Emulgator (Chansiri *et al*., 1999). Dieser Effekt wurde dabei auf die erhöhte elektrostatische Abstoßung der Öltropfen zurückgeführt. Demzufolge spielt auch die Erhöhung der negativen Ladung der Grenzfläche und die damit verbundene stärkere Abstoßung der Öltropfen untereinander eine Rolle für die höhere Hitzestabilität der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb. Dadurch wird das Annähern der Öltropfen teilweise verhindert, so dass die hitzeinduzierte Aggregation zwischen den adsorbierten Proteinen benachbarter Öltropfen und die mögliche Destabilisierung des Grenzflächenfilms minimiert werden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass sowohl die veränderten ionischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und PA als auch die erhöhten Abstoßungskräfte zwischen den Öltropfen durch die negativ geladene Grenzfläche für die verbesserte Hitzestabilität eigelbstabilisierter O/W-Emulsionen nach der Modifizierung des Eigelbs mit PLD verantwortlich sind.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Mechanismen aufzuklären, die für die Erhöhung der Hitzestabilität der eigelbstabilisierten O/W-Emulsionen nach der enzymatischen *In-situ*-Inkubation des Eigelbs mit Phospholipase A_2 (PLA_2) verantwortlich sind. Des Weiteren wurde der Einsatz von Phospholipase D (PLD), eines Enzyms, das bisher nicht in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird, zur Modifizierung des Eigelbs beschrieben. Dabei wurden zum einen die Hydrolysevorgänge und Strukturänderungen während der Behandlung des Eigelbs mit beiden Enzymen charakterisiert und zum anderen die Auswirkungen auf dessen Emulgiereigenschaften, insbesondere bezüglich der Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen, untersucht. Das besondere Augenmerk lag dabei auf der Analyse der Zusammensetzung, der Struktur, der Ladung und der Stabilität des Grenzflächenfilms dieser Emulsionen.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass während der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 aus Schweinepankreas sowohl Phosphatidylcholin (PC) als auch Phosphatidylethanolamin (PE) relativ schnell zu Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) und Lyso-Phosphatidylethanolamin (LPE) hydrolysiert werden. Bereits nach 4 h wird ein Hydrolysegrad von etwa 90 % erreicht. Dies verdeutlichte die leichte Zugänglichkeit der Phospholipide für das Enzym in der Eigelbmatrix. Die enzymatische Hydrolyse der Phospholipide mit PLA_2 bewirkt eine Strukturänderung der Eigelbmatrix, wie anhand der partiellen Auflösung der Granulapartikel nachgewiesen werden konnte. Durch den Aufbruch der Granulapartikel wird die Emulgieraktivität des Eigelbs nach der Behandlung mit PLA_2 verbessert, was vermutlich auf die Freisetzung der Granulaproteine Phosvitin und HDL zurückzuführen ist. So führte die enzymatische Modifizierung des Eigelbs zu einer deutlichen Herabsetzung der dynamischen Grenzflächenspannung, die bei der Erhöhung der Tropfenbildungszeit und der Temperatur noch weiter abnahm.

Des Weiteren wurden die Emulgiereigenschaften des Eigelbs vor und nach der Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 anhand der daraus hergestellten O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil und vier verschiedenen Eigelbkonzentrationen untersucht. Die Charakterisierung der Emulgieraktivität des Eigelbs erfolgte anhand der spezifischen Grenzfläche der Emulsionen. Es konnte keine Zunahme der spezifischen Grenzfläche und damit keine

Verbesserung der Emulgieraktivität des Eigelbs nachgewiesen werden. Das liegt offenbar an der deutlich kürzeren Tropfenbildungszeit während des Emulgierens verglichen mit den Tropfenbildungszeiten bei der Messung der dynamischen Grenzflächenspannung und der damit veränderten Adsorption der grenzflächenaktiven Substanzen des Eigelbs. Die Untersuchung der Zusammensetzung und der Struktur des Grenzflächenfilms der eigelbstabilisierten O/W-Emulsionen zeigte, dass Proteine und Phospholipide als Komplex an der Öltropfenoberfläche adsorbiert werden. Auch bei der Verwendung des PLA_2-behandelten Eigelbs blieb der Protein-Phospholipid-Komplex bzw. der Protein-Lyso-Phospholipid-Komplex bestehen. Allerdings führte der Einsatz eines PLA_2-modifizierten Eigelbs zur Veränderung der Struktur des Grenzflächenfilms. Dabei erschien dieser auf den Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (CLSM) deutlich homogener und gleichmäßiger. Offenbar führt der partielle Aufbruch der Granulapartikel dazu, dass die Granulaproteine nicht mehr in aggregierter Form vorliegen, so dass sie sich besser in den Grenzflächenfilm integrieren und aufgrund von verbesserter Flexibilität an der Grenzfläche effektiver ausbreiten können. Dabei nimmt die Protein- und die Phospholipidgrenzflächenbelegung der Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb ab. Zudem konnte bei der Untersuchung des extrahierbaren Fettanteils gezeigt werden, dass die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 eine deutliche Erhöhung der Dichtigkeit und der Stabilität des Grenzflächenfilms der daraus hergestellten Emulsionen bewirkt. Offenbar findet aufgrund der Veränderung der Größe und der Struktur der Lyso-Phospholipide und der Freisetzung von Fettsäuren durch die Hydrolyse der Phospholipide mit PLA_2 eine Neuanordnung der Moleküle im Grenzflächenfilm statt, was zur dichteren Packung der Grenzflächenschicht führt. Ähnliche Effekte wurden bereits bei der Veränderung der Membranstruktur von LDL-Mizellen nach der enzymatischen Modifizierung mit PLA_2 beobachtet (Hevonoja *et al*., 2000).

Die enzymatische Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 bewirkt eine deutliche Erhöhung der Hitzestabilität bei einer thermischen Behandlung der daraus hergestellten O/W-Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. Zum einen spielt dabei die Veränderung der Struktur des Grenzflächenfilms eine wichtige Rolle, wobei der Grenzflächenfilm durch die dichtere Packung weniger hitzelabil ist. Andererseits ist die Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lyso-Phospholipiden während der Erhitzung von entscheidender Bedeutung (Mine, 1997). Zwar wurde die Sekundärstruktur der Eigelbproteine durch die Wechselwirkungen mit Lyso-Phospholipiden nicht beeinflusst, doch konnte mittels Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie gezeigt werden, dass die thermisch bedingte

Abnahme des Anteils der α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine während der Erhitzung bei 85 °C deutlich reduziert wird. Die Erhitzung der Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb führte zu einer deutlichen Zunahme der Protein- und der Phospholipidgrenzflächenbelegung. Durch die Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 konnte dagegen sowohl die Belegung mit Proteinen und Phospholipiden als auch die Dicke des Grenzflächenfilms merklich reduziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die nicht adsorbierten Proteine und Lyso-Phospholipide ebenfalls in Form von hitzestabilen Komplexen in der kontinuierlichen Phase vorliegen. Dies führt dazu, dass die Wechselwirkungen mit den adsorbierten Proteinen und damit deren Aggregation während der thermischen Behandlung der Emulsion teilweise verhindert werden (McCrae, 1999).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich auch durch den Zusatz von Lyso-Phospholipiden zum Eigelb eine Erhöhung der Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen erreichen lässt. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welchen Beitrag Proteine und Lyso-Phospholipide im Einzelnen zur Verbesserung der Hitzestabilität des Protein-Lyso-Phospholipid-Komplexes leisten und ob auch die freien Fettsäuren dabei eine Rolle spielen. Dafür wurden die aus dem zuvor mit PLA_2 behandelten Eigelb extrahierten Lyso-Phospholipide dem unbehandelten Eigelb zugesetzt und dessen Emulgiereigenschaften insbesondere in Hinblick auf die Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen analysiert. Der Zusatz von Lyso-Phospholipiden führte zur Erhöhung der spezifischen Grenzfläche in den Emulsionen mit niedrigerer Eigelbkonzentration. Darüber hinaus verdrängten die zugesetzten Lyso-Phospholipide die adsorbierten Proteine von der Grenzfläche, so dass die Proteingrenzflächenbelegung und auch die Dicke des Grenzflächenfilms herabgesetzt wurden. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Lyso-Phospholipiden zum unbehandelten Eigelb einen deutlich positiven Einfluss auf Hitzestabilität der daraus hergestellten Emulsionen hat. Dies hängt zum einen mit der bereits beschriebenen Verdrängung der Proteine von der Grenzfläche zusammen. Zum anderen findet offenbar bei der Zugabe von Lyso-Phospholipiden eine Abschirmung der durch Temperatureinwirkung exponierten Seitenketten der nicht adsorbierten Proteine statt, so dass die hitzebedingte Aggregation mit den adsorbierten Proteinen vermindert wird. Ähnliche Effekte wurden bei der Zugabe von Polysorbat zu eigelbstabilisierten Emulsionen beschrieben (Nikiforidis und Kiosseoglou, 2007). Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass die freien Fettsäuren bei diesen Stabilisierungsmechanismen keine Rolle spielen, wie es z.B. für die *In-situ*-Behandlung des Eigelbs mit PLA_2 diskutiert wird (Mine, 1997).

Im dritten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass sich Eigelb als Substrat für die *In-situ*-Inkubation mit der Phospholipase D (PLD) eignet, bei der die Esterbindung an der Phosphat-Gruppe des Phospholipidmoleküls unter Ausbildung der Phosphatidsäure (PA) und eines Alkohols gespalten wird. Nach 4 h Inkubation wurden etwa 95 % bzw. 73 % der im Eigelb ursprünglich vorhandenen PC und PE in PA umgewandelt. Die Behandlung mit PLD führt zu Ausbildung von Proteinnetzwerken im Eigelb. Die damit verbundene Strukturänderung der Eigelbmatrix bewirkt eine erhebliche Viskositätszunahme. Aus diesem Grund war eine Verdünnung des Eigelbs mit Wasser vor der Enzymzugabe erforderlich. Auch die Sekundärstruktur der Eigelbproteine wird erheblich beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD der Anteil an α-Helix-Strukturen deutlich steigt, wobei der Anteil an β-Faltblatt gleichzeitig zurückgeht. Die Strukturveränderungen haben auch Auswirkungen auf das Emulgierverhalten des PLD-modifizierten Eigelbs. Zum einen werden die rheologischen Eigenschaften der aus PLD-behandeltem Eigelb hergestellten O/W-Emulsionen beeinflusst, wobei auch hier eine erhöhte Viskosität und damit festere Konsistenz messbar war. Zum anderen besitzt ein mit PLD behandeltes Eigelb, insbesondere in Emulsionen mit niedrigerer Eigelbkonzentration, eine deutlich höhere Emulgieraktivität gegenüber dem Einsatz eines unbehandelten Eigelbs. In erster Linie sind die veränderten Emulgiereigenschaften des Eigelbs auf die Bildung von PA zurückzuführen, die im Gegensatz zu zwitterionischen PC und PE im neutralen pH-Bereich anionisch ist. Die Adsorption von PA, die sowohl im Komplex mit Eigelbproteinen als auch individuell die Grenzfläche bedeckt, führt zu einer deutlichen Erhöhung der negativen Ladung der Grenzfläche, was anhand des ζ-Potentials nachweisbar war. So wird durch die erhöhte elektrostatische Abstoßung das Annähern und somit die Flockung der Öltropfen minimiert. Zudem kann die Erhöhung des Anteils an α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine durch Wechselwirkungen mit PA zur Verbesserung der Flexibilität der Proteine führen. Dadurch sind diese besser in der Lage, sich der Form der Öltropfen anzupassen und deren Oberfläche effektiver zu bedecken (Anton *et al.*, 2003). Wie man anhand der CLSM-Aufnahmen zeigen konnte, führt die Behandlung des Eigelbs mit PLD zu einer homogeneren und gleichmäßigeren Belegung der Öltropfen in den daraus hergestellten Emulsionen. Auch die Dichtigkeit und die Stabilität des Grenzflächenfilms konnten im Vergleich zu den Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb deutlich erhöht werden.

Die unter Verwendung eines mit PLD behandelten Eigelbs hergestellten Emulsionen weisen ebenfalls eine erhöhte Hitzestabilität bei Temperaturen von 75 °C und 85 °C auf. Zum einen spielen dabei die veränderten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Phospholipiden, insbesondere PA, eine Rolle. Offenbar wird die Stabilität der Proteine gegenüber thermisch induzierter Aggregation durch ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen PA erhöht. So geht die hitzebedingte Abnahme des Anteils an α-Helix-Strukturen der Eigelbproteine bei beiden Temperaturen durch die Behandlung des Eigelbs mit PLD deutlich zurück. Ferner spielen auch die Erhöhung der negativen Ladung der Grenzfläche und die damit verbundene stärkere Abstoßung der Öltropfen untereinander eine wichtige Rolle für die höhere Hitzestabilität der Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb. Durch die zunehmende Abstoßung der Öltropfen werden Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Proteinen benachbarter Öltropfen und die damit verbundene mögliche Destabilisierung des Grenzflächenfilms minimiert.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der Erhöhung der Hitzestabilität der eigelbstabilisierten Emulsionen durch die *In-situ*-Inkubation des Eigelbs mit PLA_2 und PLD bzw. durch den Zusatz von Lyso-Phosholipiden zum unbehandelten Eigelb unterschiedliche Stabilisierungsmechanismen zugrunde liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Möglichkeiten zur Verbesserung der Emulgiereigenschaften von Eigelb erarbeitet wurden. Zum einen konnte ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Vorgänge, die für die hitzestabilisierende Wirkung einer PLA_2- bzw. PLD-Behandlung des Eigelbs verantwortlich sind, geleistet werden. Zum anderen wurde mit der PLD ein Enzym vorgestellt, das bis jetzt in der Lebensmittelindustrie noch nicht eingesetzt wird. Somit könnten die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse den Einsatz von PLD im Lebensmittelbereich, aber auch deren kommerzielle und großtechnische Produktion vorantreiben.

6 Anhang

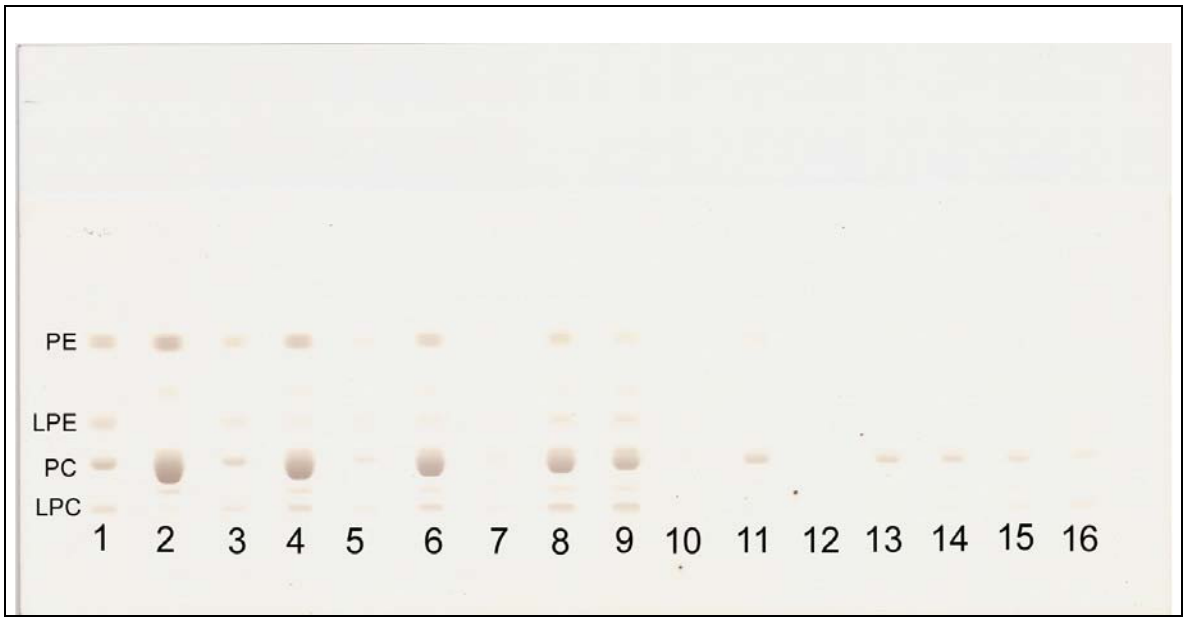


Bild 6.1: Dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide. Änderung der Phospholipidkonzentration während der enzymatischen Inkubation des Eigelbs mit PLA_2. Banden: (2): unbehandeltes Eigelb (Probe 1:5 verdünnt); (4): nach 2 min Inkubation (Probe 1:5 verdünnt); (6): 10 min (Probe 1:5 verdünnt); (8): 30 min (Probe 1:5 verdünnt); (9): 60 min (Probe 1:5 verdünnt); (11-16): die jeweiligen 1:50 Verdünnungen (sonst gleiche Reihenfolge). Standards: (1): 250 µg/ml; (3):125 µg/ml; (5):62,5 µg/ml; (7):31,3 µg/ml; (10): 15,6 µg/ml; (12):7,8 µg/ ml.

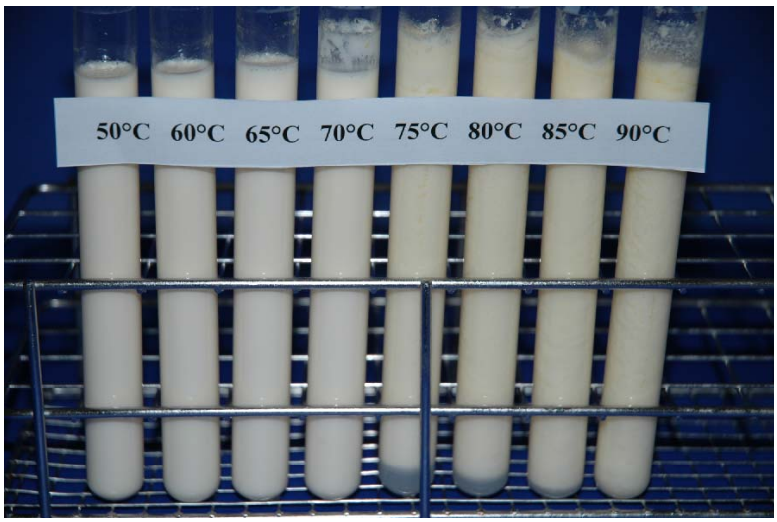


Bild 6.2: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem Eigelb (2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase) erhitzt bei unterschiedlichen Temperaturen.

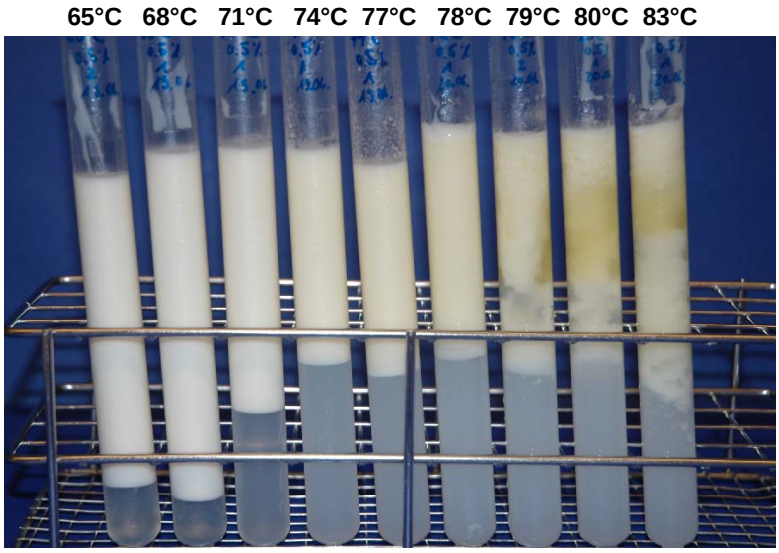


Bild 6.3: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem Eigelb (0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase) erhitzt bei unterschiedlichen Temperaturen.

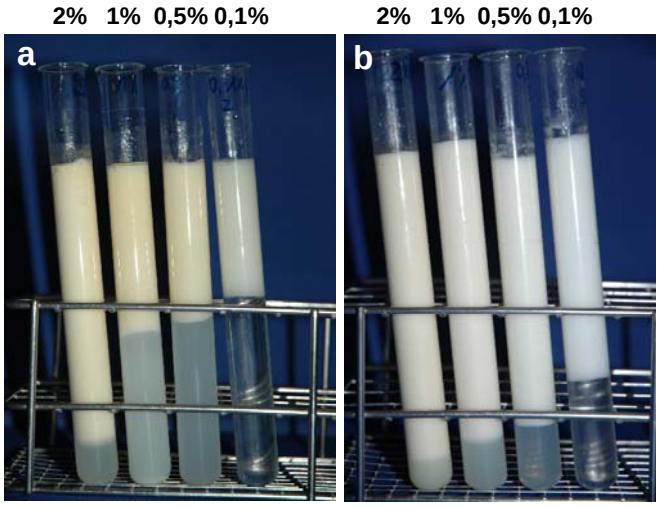


Bild 6.4: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem (a) und PLA_2-behandeltem Eigelb (unterschiedliche Proteinanteile in der wässrigen Phase) erhitzt bei 75 °C.

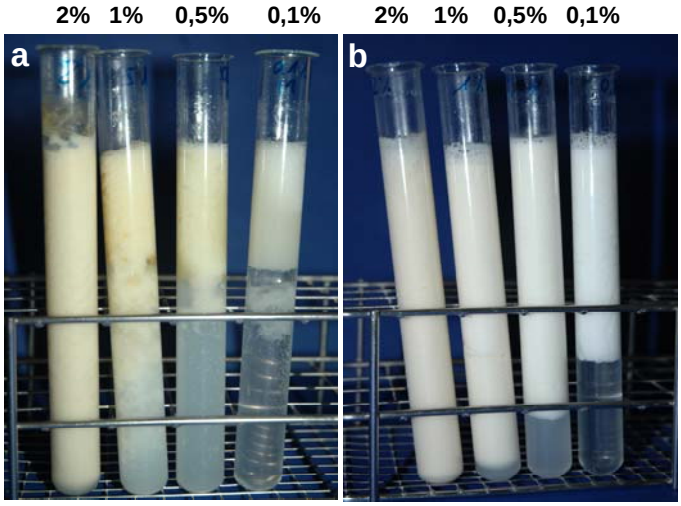


Bild 6.5: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem (a) und PLA_2-behandeltem Eigelb (unterschiedliche Proteinanteile in der wässrigen Phase) erhitzt bei 85 °C.

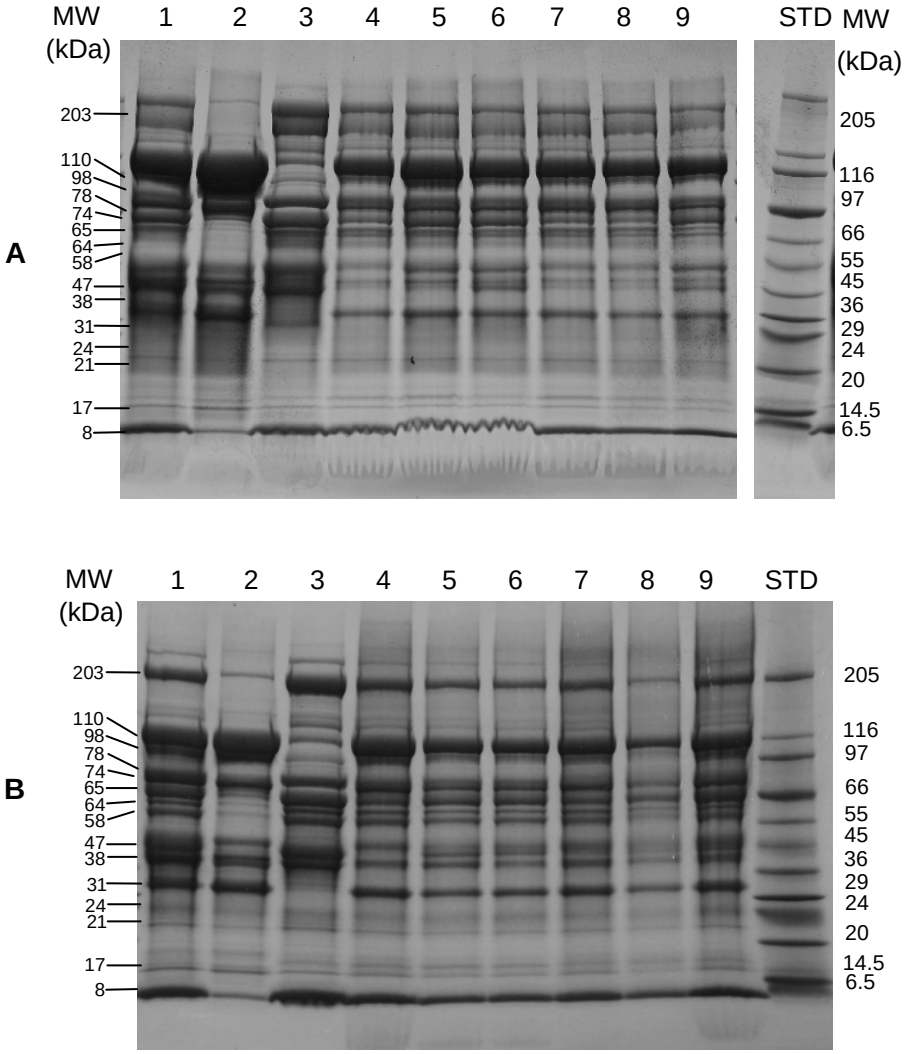


Bild 6.6: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Hitzebehandlung in Abhängigkeit vom Proteinanteil, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde **unter reduzierenden** Bedingungen durchgeführt. MW:Molekülmasse; kDa:Kilodalton; STD:Standard.

A: Bahn 1: Eigelb; Bahn 2: Granula; Bahn 3: Plasma; Bahnen 4 bis 6: disperse Phasen der Emulsion mit 2 % Proteinanteil, ohne Erhitzung (4), erhitzt bei 75 °C (5); erhitzt bei 85°C (5); Bahnen 7 bis 9: disperse Phasen der Emulsion mit 1 % Proteinanteil, ohne Erhitzung (7), erhitzt bei 75 °C (8); erhitzt bei 85°C (9).

B: Bahn 1: Eigelb; Bahn 2: Granula; Bahn 3: Plasma; Bahnen 4 bis 6: disperse Phasen der Emulsion mit 0,5 % Proteinanteil, ohne Erhitzung (4), erhitzt bei 75 °C (5); erhitzt bei 85°C (5); Bahnen 7 bis 9: disperse Phasen der Emulsion mit 0,1 % Proteinanteil, ohne Erhitzung (7), erhitzt bei 75 °C (8); erhitzt bei 85°C (9).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Waldemar Buxmann
geboren:	am 12. März 1978 in Tschljabinsk/UdSSR
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Adresse:	Koppelstr. 2a, 49610 Quakenbrück

Ausbildung

09/1985 bis 03/1992	Mittelschule in Kustanaj/UdSSR/GUS
06/1992 bis 06/1993	Hauptschule-Nette in Dortmund
07/1993 bis 06/1998	Heinrich Heine-Gymnasium in Dortmund Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
11/1998 bis 08/1999	Wehrdienst in Rennerod und Gießen (Ausbildung zum Sanitäter)
10/1999 bis 02/2007	Studium der Lebensmitteltechnologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn Abschluss: Diplom-Ingenieur
09/2003 bis 11/2003	Aufenthalt an der Russian Academy of Science, Institute of Biochemical Physics, Moskau, Russland

Beruf

seit 03/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik (DIL e.V.), Quakenbrück

Publikationsliste

Artikel

Buxmann, W., Bindrich, U., Heinz, V., Knorr, D. und Franke, K. (2009) Influencing emulsifying properties of egg yolk by enzymatic modification with phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus*, Part 1: Technological properties of incubated egg yolk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (in press)

Buxmann, W., Bindrich, U., Strijowski, U., Heinz, V., Knorr, D. und Franke, K. (2009) Influencing emulsifying properties of egg yolk by enzymatic modification with phospholipase D, Part 2: Structural changes of egg yolk due to incubation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (in press)

Buxmann, W., Bindrich, U. und Franke, K. (2009) Influencing egg yolk functionality by enzymatically modified phospholipids. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Food Rheology and Structure*, Fischer, P., Polland, M. und Windhab, E.J. (Hrsg.), Laboratory of Food Process Engineering Institute of Food Science and Nutrition, 526-527, ISBN 978-3-905609-43-1

Buxmann, W., Kießling, M. und Reimerdes, E.H. (2008) Verbesserte Eigelbfunktionalität durch enzymatische Phospholipid-Modifikation. In: *Proceedings: Symposium Funktionelle Lebensmittel* 2007, Buckenhüskes, H.J. und Melisch, P. (Hrsg.). DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt (2008)

Poster

Buxmann, W., Bindrich, U. und Franke, K. (2009) Influencing egg yolk functionality by enzymatically modified phospholipids. *5th International Symposium on Food Rheology and Structure*, Institute of Food Science and Nutrition, 15.-18. Juni 2009, Zürich, Schweiz

Buxmann, W. und Töpfl, S. (2008) Impact of egg yolk structure and functionality after enzymatic modification with phospholipase A_2. *4th Innovative Foods Centre Conference FIESTA 2008*, 17.–18. September 2008, Brisbane, Queensland, Australien

Buxmann, W., Franke, K., Bindrich, U. (2008) Verbesserte Eigelbfunktionalität durch Phospholipid-Modifikation mit Phospholipasen A_2 und D. *66. FEI-Jahrestagung*, 2.-3. September 2008, Hohenheim

Buxmann, W., Franke, K. und Kießling, M. (2007) Verbesserte Eigelbfunktionalität durch enzymatische Phospholipid-Modifikation. *GeFFoST-Tagung Lebensmittelwissenschaften im Fokus, Lipide und Lipoide - Proteine und Enzyme,* 5.-6. November 2007, Frankfurt am Main

Buxmann, W., Kießling, M. und Reimerdes, E.H. (2007) Verbesserte Eigelbfunktionalität durch enzymatische Phospholipid-Modifikation. *Symposium Funktionelle Lebensmittel,* 28.-29. Juni, 2007, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Vorträge

Buxmann, W. und Franke, K. (2008) Verbesserung der Eigelbfunktionalität durch enzymatische Phospholipid-Modifikation. Gehalten bei der *DLG Fachtagung Eier und Eitechnologie*, 14.-15. April 2008 in Leinfelden-Echterdingen

Buxmann, W., Bindrich, U. und Franke, K. (2009) Auswirkungen der enzymatischen Modifikation der Phospholipide des Eigelbs mit Phospholipase D auf die Funktionalität. Gehalten beim *Jahrestreffen des ProcessNet-Fachausschusses „Lebensmittelverfahrenstechnik“*, 23.-25. März 2009 am NRC Nestlé Research Center in Lausanne, Schweiz

Buxmann, W., Bindrich, U. und Franke, K. (2009) Neue Möglichkeiten für verbesserte Emulgiereigenschaften von Eigelb. Gehalten beim *GDL-Kongress Lebensmittel-technologie*, 23.-24. Oktober 2009 in Lemgo

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden.

Quakenbrück, 29.10.2009

Bilderverzeichnis

Bild 2.1: Destabilisierungsmechanismen von O/W-Emulsionen (modifiziert nach Danner, 2005). . 6

Bild 2.2: Schematische Darstellung der räumlichen Orientierung von Phosphatidylcholin an dem Grenzflächenbereich Öl/Wasser. R_1: Glycerophosphatidylcholin-Rest; R_2: Stearin-, R_3: Ölsäure-Rest (modifiziert nach Ternes, 2008). 9

Bild 2.3: Schematische Darstellung der Adsorption flexibler Proteine an der Öl/Wasser-Grenzfläche (Friberg, 1988; Myers, 1991). 12

Bild 2.4: Zusammensetzung des Eigelbs (alle Angaben bezogen auf die Eigelbtrockenmasse). LDL: Low-Density-Lipoprotein; LDLG: Low-Density-Lipoprotein der Granulafraktion; HDL: High-Density-Lipoprotein (Acker und Ternes *et al.,* 1994). 19

Bild 2.5: Struktur und Zusammensetzung einer LDL-Mizelle im Eigelb. a) Aufnahme mit Transmissionselektronenmikroskopie; b) schematischer Aufbau (A: Apo-LDL; B: Phospholipide; C: Triacylglyceride) (modifiziert nach Kamat *et al.*,1972 ; Anton *et al*., 2003; Ternes, 2008)..... 21

Bild 2.6: Strukturen und Konformationen von wichtigen Fettsäuren des Eigelbs (modifiziert nach Belitz *et al.*, 2005)..... 25

Bild 2.7: Zusammensetzung der Glycerophospholipide (modifiziert nach Yilmaz, 2005). 26

Bild 2.8: Spaltstellen von Phospholipasen am Phospholipidmolekül. PLA_1: Phospholipase A_1; PLA_2: Phospholipase A_2; PLB: Phospholipase B; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; R_1 und R_2: Alkylreste; R_3: Alkohol (modifiziert nach Belitz *et al*., 2005)..... 34

Bild 2.9: PLD-katalysierte Hydrolyse (A) und Transphosphatidylierung (B) von Phospholipiden. R_1 und R_2: gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste; X_1OH und X_2OH: Kopfgruppen- bzw. Substratalkohol (modifiziert nach Ulbrich-Hofmann *et al*., 2005; Haufe, 2006). 38

Bild 3.1: Fraktionen des Plasmas nach der Zentrifugation. 51

Bild 3.2: Reduzierende SDS-PAGE der entfetteten Granulaproteine. (1a) Granula; (2a) HDL-Fraktion; (3a) Phosvitin (selbst isoliert), gefärbt mit Coomassie-Blau-Färbelösung. (1b) Granula; (2b) HDL-Fraktion; (3b) Phosvitin (selbst isoliert), das selbe Gel mit Zusatz von 0,1 M $Al(NO_3)_3$ zur Coomassie-Blau-Färbelösung.); Std.: Molekulargewichtsmarker; MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton. Die entsprechenden Bezeichnungen sind in der Tabelle (rechts) dargestellt..... 56

Bild 3.3: Reduzierende SDS-PAGE der entfetteten Plasmaproteine. (1) Plasma; (2) LDL-Fraktion des Plasmas; (3) α,- β- und γ-Livetin-Fraktion des Plasmas. Std.: Marker; MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton. Die entsprechenden Bezeichnungen sind in der Tabelle (rechts) dargestellt. 56

Bild 3.4: Temperatur-Zeitlauf während der Wärmebehandlung der Modellemulsion (90 °C Wasserbadtemperatur)..... 62

Bild 4.1: REM-Aufnahmen von Eigelb (1) sowie dessen Fraktionen Granula (2) und Plasma (3) vor (a) bzw. nach (b) enzymatischer Behandlung des Eigelbs mit PLA_2. Länge des Balkens: 5 µm. 73

Bild 4.2: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLA_2-behandelten Eigelbs. 75

Bild 4.3: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLA_2-behandelten Eigelbs nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C. 77

Bild 4.4: Dynamische Grenzflächenspannung zwischen Miglyol und einer wässrigen Eigelbdispersion (0,5 % Proteinanteil) mit unterschiedlich behandeltem Eigelb in Abhängigkeit von Tropfenbildungszeit und Temperatur. 79

Bild 4.5: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb mit 30 % Ölanteil und 2 % bzw. 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur. 81

Bild 4.6: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 82

Bild 4.7: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 84

Bild 4.8: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 85

Bild 4.9: Zusammensetzung der Proteine in unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem (PLA_2-beh.) Eigelb sowie der dispersen (disp.) und der kontinuierlichen (kont.) Phasen der daraus hergestellten O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil und 2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase. Bahn 1: unbeh. Eigelb; 2: PLA_2-beh. Eigelb; 3: disp. Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 4: disp. Phase der Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb; 5: kont. Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 6: kont. Phase der Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb. SDS-PAGE wurde nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa:Kilodalton; STD: Standard. 86

Bild 4.10: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (in der dispersen Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, hergestellt mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2–5: Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb jeweils mit 2 % (Bahn 2); 1% (3); 0,5 % (4) und 0,1 % (5) Proteinanteil in der wässrigen Phase; 6–9: Emulsionen aus PLA_2-behandeltem Eigelb jeweils mit 2 % (6); 1% (7); 0,5 % (8) und 0,1 % (9) Proteinanteil in der wässrigen Phase. SDS-PAGE wurde nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard. 87

Bild 4.11 Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 88

Bild 4.12: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (disperse Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Hitzebehandlung bei 75 °C, hergestellt aus unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem (PLA_2-beh.) Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2: Emulsion aus unbeh. Eigelb, 2 % Proteinanteil; 3: Emulsion aus PLA_2-beh. Eigelb, 2%; 4: Emulsion aus unbeh. Eigelb, 2 %, 75°C; 5–8: Emulsionen aus PLA_2-beh. Eigelb, erhitzt bei 75 °C, jeweils mit 2% (Bahn 5); 1 % (6); 0,5 % (7) und 0,1 % (8). SDS-PAGE wurde ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (nicht reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard. 89

Bild 4.13: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche (disperse Phase) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Hitzebehandlung bei 85 °C, hergestellt mit unbehandeltem (unbeh.) bzw. PLA_2-behandeltem

(PLA_2-beh.) Eigelb. Bahn 1: unbehandeltes Eigelb; 2: disperse Phase der Emulsion aus unbeh. Eigelb; 3–6: disperse Phase der Emulsionen aus PLA_2-beh. Eigelb mit 2 % (3); 1 % (4); 0,5 % (5); 0,1% (6). SDS-PAGE wurde ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol durchgeführt (nicht reduzierend). MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard. 90

Bild 4.14: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 91

Bild 4.15: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 92

Bild 4.16: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem (links) bzw. PLA_2-behandeltem (rechts) Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. Fettsäuren sind im Einzelnen: C16:0: Palmitinsäure (gesättigt); C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure (ungesättigt); C18:2: Linolsäure (ungesättigt). 94

Bild 4.17: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure; C18:2: Linolsäure (ungesättigt). 95

Bild 4.18: CLSM-Aufnahmen von Öltropfen einer O/W-Emulsion mit 30 % Ölanteil und 2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase, hergestellt aus unbehandeltem (1) und PLA_2-behandeltem (2) Eigelb. Vor (a) und nach der Erhitzung bei 75 °C (b) und 85 °C (c). Folgende Substanzen sind markiert: Proteine (grün), Phospholipide (rot); Protein-Phospholipid-Komplex erscheint durch Überlappung von grün und rot als orange. 96

Bild 4.19: ζ-Potential der Emulsionsgrenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 98

Bild 4.20: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. 100

Bild 4.21: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 100

Bild 4.22: Spezifische Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase. 105

Bild 4.23: Spezifische Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase. 106

Bild 4.24: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase. 107

Bild 4.25: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion, nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C, die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrigen Phase. 108

Bild 4.26: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL), in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. Die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase. 110

Bild 4.27: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase, nach Erhitzung mit 75 °C bzw. 85 °C. Die Phospholipidkonzentration in den Emulsionen beträgt überall 1,6 % bezogen auf die wässrige Phase. 111

Bild 4.28: Grenzflächenbelegung mit freien Fettsäuren (FFS) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase. C18:0: Stearinsäure (gesättigt); C18:1: Ölsäure; C18:2: Linolsäure (ungesättigt). 112

Bild 4.29: CLSM-Aufnahmen der Öltropfengrenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden, mit 1 % (1a, b, c) bzw. 0,5 % (2a, b, c) Proteinanteil in der wässrigen Phase. Die Emulsionen wurden zusätzlich bei 75 °C (b) bzw. 85 °C (c) erhitzt. Folgende Substanzen sind markiert: Proteine (grün), Phospholipide (rot); Protein-Phospholipid-Komplex erscheint durch Überlappung von grün und rot als orange. 113

Bild 4.30: Konzentration der Phospholipide im Eigelb während der Inkubation mit Phospholipase D (PLD) bei 50°C. Die Enzymkonzentration beträgt 750 Units pro g Phospholipide. Angaben beziehen sich auf die Eigelbtrockenmasse. 117

Bild 4.31: Effektive Viskosität des verdünnten Eigelbs (70/30 w/w) während der Inkubation mit Phospholipase D (750 Units/g Phospholipide) bei 50 °C (Scherrate: 20 s^{-1}). 118

Bild 4.32: REM-Aufnahmen des mit dest. Wasser verdünnten Eigelbs (70/30 w/w). Balkenlänge beträgt 10 µm. a: verdünntes Eigelb vor der PLD-Behandlung; b: verdünntes Eigelb nach der PLD-Behandlung. 119

Bild 4.33: CD-Spektren des unbehandelten sowie PLD-behandelten Eigelbs vor (A) und (B) nach einer Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C. 120

Bild 4.34: Dynamische Grenzflächenspannung zwischen Miglyol und einer Eigelbdispersion (0,5 % Protein) mit unterschiedlich behandeltem Eigelb in Abhängigkeit von Tropfenbildungszeit und Temperatur. 122

Bild 4.35: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 123

Bild 4.36: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 125

Bild 4.37: Spezifische Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. Die Bestimmung der spezifischen Grenzfläche erfolgte nach Zugabe von SDS in die Emulsionen. 127

Bild 4.38: Konsistenzfaktor nach Ostwald de Waele von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 128

Bild 4.39: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 129

Bild 4.40: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bahn 1: Eigelb; 2–5: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil, MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard. 130

Bild 4.41: Proteingrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLA_2-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 131

Bild 4.42: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil in Abhängigkeit vom Proteinanteil und nach Hitzebehandlung, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bahn 1: Eigelb; 2–5: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil, nach Erhitzung bei 75 °C; 6–9: disperse Phasen der Emulsionen mit 2 %; 1 %; 0,5 % und 0,1 % Proteinanteil nach Erhitzung bei 85 °C. MW: Molekülmasse; kDa: Kilodalton; STD: Standard. 132

Bild 4.43: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion 134

Bild 4.44: Phospholipidgrenzflächenbelegung in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 136

Bild 4.45: ζ-Potential der Emulsionsgrenzfläche in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 137

Bild 4.46: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion. 138

Bild 4.47: Extrahierbarer Fettanteil in O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit unbehandeltem bzw. PLD-behandeltem Eigelb, in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung der Emulsionen bei 75 °C und 85 °C. 139

Bild 4.48: CLSM-Aufnahmen der Öltropfengrenzfläche von nicht erhitzten und bei 75 °C bzw. 85 °C erhitzten O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, stabilisiert mit PLD-behandeltem Eigelb mit 2 %; 1 % und 0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase. 140

Bild 6.1: Dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide. Änderung der Phospholipidkonzentration während der enzymatischen Inkubation des Eigelbs mit PLA_2. Banden: (2): unbehandeltes Eigelb (Probe 1:5 verdünnt); (4): nach 2 min Inkubation (Probe 1:5 verdünnt); (6): 10 min (Probe 1:5 verdünnt); (8): 30 min (Probe 1:5 verdünnt); (9): 60 min (Probe 1:5 verdünnt); (11-16): die jeweiligen 1:50 Verdünnungen (sonst gleiche Reihenfolge). Standards: (1): 250 µg/ml; (3):125 µg/ml; (5):62,5 µg/ml; (7):31,3 µg/ml; (10): 15,6 µg/ml; (12):7,8 µg/ ml. . 150

Bild 6.2: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem Eigelb (2 % Proteinanteil in der wässrigen Phase) erhitzt bei unterschiedlichen Temperaturen. 150

Bild 6.3: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem Eigelb (0,5 % Proteinanteil in der wässrigen Phase) erhitzt bei unterschiedlichen Temperaturen. 151

Bild 6.4: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem (a) und PLA_2-behandeltem Eigelb (unterschiedliche Proteinanteile in der wässrigen Phase) erhitzt bei 75 °C. 151

Bild 6.5: O/W-Emulsionen stabilisiert mit unbehandeltem (a) und PLA_2-behandeltem Eigelb (unterschiedliche Proteinanteile in der wässrigen Phase) erhitzt bei 85 °C. 152

Bild 6.6: Zusammensetzung der Proteine an der Grenzfläche von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil nach Hitzebehandlung in Abhängigkeit vom Proteinanteil, hergestellt mit PLD-behandeltem Eigelb. SDS-PAGE wurde **unter reduzierenden** Bedingungen durchgeführt. MW:Molekülmasse; kDa:Kilodalton; STD:Standard..... 153

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: HLB-Wert und technische Anwendung von Emulgatoren (Friberg, 1997; Belitz *et al.*, 2005) 10

Tabelle 2.2: Phospholipide des Eigelbs (Ternes, 2008) 26

Tabelle 3.1: Bedingungen bei der Inkubation des Eigelbs mit PLA_2 47

Tabelle 3.2: Bedingungen bei der Inkubation des Eigelbs mit PLD 48

Tabelle 3.3: Rf-Werte von LPC, PC, LPE, PA und PE 50

Tabelle 3.4: Laufbedingungen der SDS-PAGE 54

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus unbehandeltem sowie PLA_2-behandeltem Eigelb 60

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus unbehandeltem Eigelb nach Zusatz von Lyso-Phospholipiden in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion .. 61

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der O/W-Emulsionen aus PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion 61

Tabelle 3.8: Faktoren zur Umrechnung der Massenprozente von Fettsäuremethylestern zu freien Fettsäuren 67

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der Phospholipide während der Inkubation des Eigelbs mit PLA_2 bei 35 °C. Die Enzymkonzentration beträgt 1000 Units pro g Phospholipide. Die Phospholipidkonzentration ist in µmol/g Trockeneigelb angegeben. PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; LPC: Lyso-Phosphatidylcholin; LPE: Lyso-Phosphatidylethanolamin. 71

Tabelle 4.2: Sekundärstrukturanteile der Proteine im unbehandelten und PLA_2-behandelten Eigelb vor und nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85 °C 76

Tabelle 4.3: Verhältnis der Massen (w/w) zwischen den Proteinen und Phospholipiden an der Grenzfläche in O/W-Emulsionen mit unterschiedlichem Proteingehalt in der wässrigen Phase, hergestellt aus unbehandeltem und PLA_2-behandeltem Eigelb 93

Tabelle 4.4: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL) in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion 111

Tabelle 4.5: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus Eigelb ohne (unbehandelt) und mit Zusatz von Lyso-Phospholipiden (LPL) in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung bei 75 °C und 85 °C 112

Tabelle 4.6: Sekundärstrukturanteile der Proteine in unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb vor und nach Erhitzung bei 75 °C bzw. 85°C 120

Tabelle 4.7: Zusammensetzung und Konzentration der Phospholipide an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus unbehandeltem und PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion 135

Tabelle 4.8: Konzentration von PA an der Grenzfläche (in µmol/g) von O/W-Emulsionen mit 30 % Ölanteil, aus PLD-behandeltem Eigelb in Abhängigkeit vom Proteinanteil in der wässrigen Phase der Emulsion nach Erhitzung bei 85 °C und 75°C 136

Literaturverzeichnis

Abe, Y., Itoh, T. und Adachi, S. (1982) Fractionation and characterization of hen's egg yolk Phosvitin. *Journal of Food Science*, 47, 1903-1907

Acker, L. und Ternes, W. (1994) Chemische Zusammensetzung des Eies, In: *Ei und Eiprodukte*. Ternes, W., Acker, L. und Scholtyssek, S. (Hrsg.), (1994), Berlin, Hamburg: Paul Parey.

Adlercreutz, D., Budde, H. und Wehtje, E. (2002) Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology & Bioengineering*, 78, 403–411

Aluko R.E., Keeratiurai, M. und Mine Y. (1998) Competitive adsorption between egg yolk lipoproteins and whey proteins on oil-in-water interfaces. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 351–358.

Aluko, R.E. und Mine, Y. (1998) Characterisation of oil-in-water emulsions stabilised by hen's egg yolk granules. *Food Hydrocolloids*, 12, 203-210

Anbarci, A. (1987) Der kontinuierliche Emulgierprozeß unter Berücksichtigung mechanischer und emulgatorspezifischer Aspekte, Technische Hochschule Karlsruhe, Dissertation

Anderson, T.A., Levitt, D.G. und Banaszak, L.J. (1998) The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure*, 6, 895-909

Anton, M. (2007b) High-density Lipoproteins (HDL) or Lipovitellin Fraction. In: *Bioactive Egg Compounds*. Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M. und Schade, R. (Hrsg.), (2007) Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Anton, M. (2007c) Phosvitin. In: *Bioactive Egg Compounds*. Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M. und Schade, R. (Hrsg.), (2007) Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Anton, M. (2007a) Low-density Lipoproteins (LDL) or Lipovitellenin Fraction. In: *Bioactive Egg Compounds*. Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M. und Schade, R. (Hrsg.), (2007) Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrondo, M., Beauma, V., David-Brian, E. und Rabesona, H. (2003) Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83 (2), 175-183

Anton, M. und Gandemer, G. (1997) Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *Journal of Food Science*, 62 (3), 484 – 487

Anton, M. und Gandemer, G. (1999) Effect of pH on interface composition and on quality of oil-in-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 351-358

Anton, M., Le Denmat, M., Beaumal, V. und Pilet, P. (2001) Filler effects of oil droplets on the rheology of heat-set emulsion gels prepared with egg yolk and egg yolk fractions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 137-147

Anton, M., Beaumal, V. und Gandemer, G. (2000a) Adsorption at the oil-water interface and emulsifying properties of native granules from egg yolk: effect of aggregated state. *Food Hydrocolloids*, 14, 327-335

Anton, M., Le Denmat, M. und Gandemer, G. (2000b) Thermostability of hen egg yolk granules: contribution of native structure of granules. *Journal of Food Science*, 65, 581-584

Bade, M. (2005) Untersuchungen zur Stabilisierung von komplexen Aromadestillaten unter Nutzung eines kombinierten Emulgier-Sprühtrocknungs-Prozesses. *Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Landtechnik/Lebensmitteltechnik*, VDI Verlag, Düsseldorf

Belitz, H.-D. (1963), Proteine des Eidotters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 119 (3), 201-210

Belitz, H.-D. (1965), Eidotterproteine und ihre Spaltprodukte IV. Mitteilung Aminosäuren-sequenzen im Phosvitin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 127 (6), 341-352

Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle P. (2005) *Lehrbuch der Lebensmittelschemie*. 5., überarb. Aufl. Berlin, Heidelberg, New-York: Springer- Verlag

Böhm, G., Muhr, R. und Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, 5 (3), 191-195

Brown, E.M. (1984) Interactions of β-Lactoglobulin and α-Lactalbumin with lipids: a review. *Journal of Dairy Food Science*, 67, 713-722

Burley, R.W. und Vadehra, D.V. (1989) In:*The avian egg: Chemistry and biology*. New York: John Wiley & Sons Inc.

Burley, R.W. und Cook, W.H. (1961) Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents [alpha]- and [beta]-lipovitelins. *Canadian Journal of Biochemical Physiology*, 39, 1295-1307

Buxmann, W, Kießling, M. und Reimerdes, E.-H. (2008) Verbesserte Eigelbfunktionalität durch enzymatische Phosspholipid-Modifikation. In: *Proceedings: Symposium Funktionelle Lebensmittel 2007*, Buckenhüskes, H.J., Melisch, P. (Hrsg.), DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt

Cardenas-Valera A. (1995) Graft copolymers as stabilizers for oil-in water emulsions Part 2, Preperation of emulsions and the factors affecting their stability. *Colloids surfaces A.: Physicochemical and Engineering Aspects*, 97 (1-12), 1995

Causeret, D., Matringe, E. und Lorient, D. (1991) Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *Journal of Food Science*, 56 (6), 1532-1536

Causeret, D., Matringe, E. und Lorient, D. (1992) Mineral cations affect microstructure of yolk granules. *Journal of Food Science*, 57 (6), 1323-1326

Chang, C.M., Powrie, W.D. und Finnema, O. (1977) Microstructure of egg yolk. *Journal of Food Science*, 42 (5), 1193-1200

Chansiri, G., Lyons, R.T., Patel, M.V. und Hem, S.L. (1999) Effect of Surface Charge on the Stability of Oil/Water Emulsions during Steam Sterilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 454-458

Chung, S. und Ferrier, L.K. (1992) pH and sodium chloride effects on emulsifying properties of egg yolk Phosvitin. *Journal of Food Science*, 57, 40-42

Clausen, K. (2001) Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 333–340

Courthaudon, J.L., Dickinson und E., Dalgleish, D.G. (1991) Competitive adsorption of b-casein and non-ionic surfactants in oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 145, 390-395

Daimer, K. und Kulozik, U. (2009a) Impact of a thermal treatment at different pH on the adsorption behaviour of untreated and enzyme-modified egg yolk at the oil-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (in press)

Daimer, K. und Kulozik, U. (2009b) Oil-in-water emulsion properties of egg yolk: Effect of enzymatic modification by phospholipase A2. *Food Hydrocolloids*, 23, 1366-1373

Daimer, K. und Kulozik, U. (2008) Impact of a Treatment with Phospholipase A2 on the Physicochemical Properties of Hen Egg Yolk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 4172-4180

Damodaran, S. und Xu, S. (1996) The role of electrostatic forces in anomalous adsorption behavior of phosvitin at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178, 426-435

Danner, T. (2005) Grundlagen der Tropfenkoaleszenz. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*. Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg (2005)

D'Arrigo, P. und Servi, S. (1997) Using phospholipases for phospholipid modification. *Trends in Biotechnology*, 15, 90-96

Davis, C. und Reeves, R. (2002) High value opportunities from the chicken egg. In: *Kingston: Rural Industries Research & Development (RIRDC)*

Descalzo, A.M., Insani, E.M. und Pensel, N.A. (2003) Light-scattering detection of phospholipids resolved by HPLC. *Lipids*, 38, 999-1003

De Maria, L., Vind, J., Oxenboll, K.M., Svendsen, A. und Patkar, S. (2007) Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 290-300

Dickinson, E. und McClements (Hrsg.) (1995) *Advances in food colloids*. London, Blackie Academic & Professional

Dickinson, E. und Stainsby, G. (Hrsg.) (1988) *Advances in Food emulsions and foams*. London, New York, Elsevier applied science

Dickinson, E. und Iveson, G. (1993) Adsorbed films of beta-lactoglobulin + lecithin at the hydrocarbon-water and triglyceride-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 6, 533-541

Dickinson, E., Hunt, J.A. und Dalgleish, D.G. (1991) Competitive adsorption of Phosvitin with milk proteins in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 4, 403-414

Dickinson, E., Owuso, R.K., Tan, S. und Williams, A. (1993) Oil- soluble Surfactants Have Little Effect on Competitive Adsorption of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin in Emulsions. J*ournal of Food Science*, 58, 295-298

Dickinson, E. und Tanai, S. (1992) Protein displacement from the emulsion droplet surface by oil-soluble and water-soluble surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 179-183

Dixon, D.K. und Cotterill, O.J. (1981) Electrophoretic and chromatographic changes in egg yolk proteins due to heat. *Journal of Food Science*, 46, 981-983

Dutilh, C.E. und Groger, W. (1981) Improvement of product attributes of mayonnaise by enzymic hydrolysis of egg yolk with phospholipase A2. J*ournal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 451-458

Egger, D., Wehtje, E. und Adlercreutz, D. (1997) Characterization and optimization of phospholipase A2-catalyzed synthesis of phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1343, 76-86

El Kirat, K., Duprès, V. und Dufrêne, Y.F. (2008) Blistering of supported lipid membranes induced by Phospholipase D, as observed by real-time atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 276-282

Fang, Y., Dalgleish und D.G., (1996) Competitive adsorption between dioleoylphosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 59-64

Folch, J., Lees, M. und Sloane Stanley, G.H., (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509

Ford, L.D., Borwankar, R., Pechak, D. und Schwimmer, B. (2004) Dressings and Sauces. In: *Food Emulsions.* Friberg, S.E, Larsson, K. und Sjöblom,J. Fourth Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 4.Auflage

Franke, K. und Reimerdes. E.H. (2005) Untersuchung zu den Wechselwirkungen von Zusammensetzung und Struktur von Eigelb bezüglich der technologischen Eigenschaften. Quakenbrück, Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., AiF-Projektantrag

Franke, K. und Tscheuschner, H.-D. (1995) Auswertung rheologischer Messungen. *Süsswaren*, 39 (5), 44-47

Franzen, J., Kuo, I. und Bobik, C. (1970) The temperature stability of egg yolk high density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200, 566-569

Friberg, S.E, Larsson, K. und Sjöblom, J. (Hrsg.) (2004) Food Emulsions. Fourth Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 4.Auflage

Friberg, S.W. (1997) Emulsion Stability. In: *Food Emulsions.* Friberg, S.E. und Larsson, K. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York,Basel, (1997) 3. Auflage

Geng, D., Chura, J. und Roberts, M.F. (1998) Activation of phospholipase D by phosphatidic acid. Enhanced vesicle binding, phosphatidic acid-Ca2+ interaction, or an allosteric effect? *Journal of Biological Chemistry*, 273, 12195-12202.

Gerhards, Ch. (2005) Einführung in die Rheologie von Emulsionen. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*. Schubert, H (Hrsg.), Behrs, Hamburg (2005)

Ghomashchi, F., Lin, Y., Hixon, M. S., Yu, B. Z., Annand, R., Jain, M. K. und Gelb, M. H. (1998) Interfacial recognition by bee venom phospholipase A2: insights into nonelectrostatic molecular determinants by charge reversal mutagenesis. *Biochemistry*, 37, 6697-710

Goddard, E.D. und Ananthapadmanabhan, K.P. (1993) Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins, Boca Raton, Florida: CRC Press

Guilmineau, F., Krause, I. und Kulozik, U. (2005) Efficient analysis of egg yolk proteins and their thermal sensitivity using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing and nonreducing conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9329-9336

Guilmineau, F. und Kulozik, U. (2006a) Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 1: Effect of the heating time. *Food Hydrocolloids*, 20, 1105-1113

Guilmineau, F. und Kulozik, U. (2006b) Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 2: Effect of the environmental conditions. *Food Hydrocolloids*, 20, 1114-1123

Guilmineau, F. und Kulozik, U. (2007) Influence of a thermal treatment on the functionality of hens egg yolk in mayonnaise. *Journal of Food Engineering*, 78, 648-654

Guo, Z., Vikbjerg , A. F. und Xu, X. (2005) Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances*, 23, 203-259

Hartee, E.F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427

Haufe, S (2006) Untersuchungen zur Struktur und Faltung der Phospholipase D aus Weißkohl. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Hegenauer, J., Ripley, L. und Nace, G. (1977) Staining acidic phosphoproteins (phosvitin) in electrophoresis gel. *Analytical Biochemistry*, 78, 308-311

Hegg, P.-O., Martens, H. und Lofqvist, B. (1978) The protective effect of sodium dodecylsulphate on the thermal precipitation of conalbumin. A study on thermal aggregation and denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 245-260

Helmerich, G. (2004) Struktur- Wirkungswechselwirkungen von Phospholipiden bei Backwaren. München, Technische Universität, Fakultät für Chemie, Dissertation

Helmerich, G. und Köhler, P. (2002) Einfache dünnschichtchromatographische Quantifizierung von Phospholipiden. *Getreide, Mehl und Brot*, 57, 195-197

Hevonoja, T., Pentikäinen, M.O. Hyvönen, M.T. und Kovanen, P.T. (2000) Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modifed LDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 189-210

Hirche, F. und Ulbrich-Hofmann, R. (2000) The interdependence of solvent, acceptor alcohol and enzyme source in transphosphatidylation by phospholipase D. *Biocatalysis and Biotransformations*, 18, 343-353

Holbrook, P.G., Pannell, L.K. und Daly, J.W. (1991) Phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine occurs with P-O bond cleavage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084, 155-158

Imamura, S. und Horiuti, Y. (1979) Purification of Streptomyces chromouscus Phospholipase D by Hydrophobic Affinity Chromatography on Palmitoyl Cellulose. *Journal of Biochemistry*, 85, 79-95

Itoh, T., Abe, Y. und Adachi, S. (1983) Comparative studies of the α- and β-phosvitin from hen's egg yolk. *Journal of Food Science*, 48, 1755-1757

Itoh, T., Kubo, M. und Adachi, S. (1986) Isolation and characterization of major apoproteins from hen's egg yolk granule. *Journal of Food Science*, 51, 1115-1117

Jaekel, T. und Ternes, W. (2009) Changes in rheological behaviour and functional properties of hen's egg yolk induced by processing and fermentation with phospholipases, International. *Journal of Food Science & Technology*, 44, 567-573

Janssen, M.J., Verheij, H.M., Slotboom, A.J. und Egmond, M. R. (1999). Engineering the disulphide bond patterns of secretory phospholipases A2 into porcine pancreatic isozyme. Theeffects on folding, stability and enzymatic properties. *European Journal of Biochemistry*, 261, 197-207

Jolivet, P., Boulard, C., Beaumal, V., Chardot, T. und Anton, M. (2006) Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4424-4429

Jong, C. de und Badings, H.T. (1990) Determination of free Fatty Acids in Milk and Cheese. *Journal of High Resolution Chromatography (HRC)*, 13, 94-98

Kamat, V.B, Lawrencea, G. A., Barratta, M.D., Darkea, A., Lesliea, R.B., Shipleya G.G., Stubbsa, und Stubbsa, J.M. (1972) Physical studies of egg yolk low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids*, 9, 1-25

Kawai, S. (2004) Characterization of diacylglycerol oil mayonnaise emulsified using phospholipase A2-treated egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 993-998

Kessler, H.G. (1996) Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Molkereitechnik, Freising-Weihenstephan: Verlag A. Kessler

Kiosseoglou, V. (2003) Egg yolk protein gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 365-370

Kiosseoglou, V. (2004) Interactions and competitive adsorption effects in egg-based products. *World's Poultry Science Journal* , 60, 311-320

Kiosseoglou, V. und Sherman, P. (1983) The influence of egg yolk lipoproteins on the rheology and stability of O/W emulsions and mayonnaise. 3. The viscoelastic properties of egg yolk films at the groundnut oil-water interface. *Colloid and Polymer Science*, 261, 520-526

Kojima, E. und Nakamura, R. (1985) Heat gelling properties of hen's egg yolk low density lipoprotein (LDL) in the presence of other protein. *Journal of Food Science*, 50 (1), 63-66

Kölbel, K. (2006) Dynamik einer lokalen Strukturregion von Phospholipase A2 aus Schweinepankreas und ihr Einfluss auf die Stabilität des Enzyms. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Kumar, S.A. und Mahadevan, S. (1970) Physicochemical Studies on the Gelation of Hen's Egg Yolk Delipidation of Yolk Plasma by Treatment with Phospholipase-C and Extraction with Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 666-670

Kunz, B. (1993) *Lexikon der Lebensmitteltechnologie*. Springer Verlag, Berlin

Kurihara, K. und Katsuragi, Y. (1993) Specific inhibitor for bitter taste. *Nature*, 365, 213 - 214

Le Denmat, M., Anton, M. und Beamal, M. (2000) Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14, 539-549

Le Denmat, M., Anton, M. und Gandemer, G. (1999) Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. J*ournal of Food Science*, 64, 194-197

Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S. und Hough, E. (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure*, 8, 655-667

Leiros, I., McSweeney ,S. und Hough, E. (2004) The reaction mechanism of phospholipase D from Streptomyces sp. Strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *Journal of Molecular Biology*, 339, 805-820.

Lerchner, A. (2004) Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung von Phospholipase D aus Schlafmohn (Papaver somniferum L.) und Weißkohl (Brassica oleracea var. capitata). Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Li-Chan, E.C.Y, Powrie, W.D. und Nakai, S. (1995) The chemistry of eggs and egg products. In: Egg science and technology. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (Hrsg.), Binghampton: Food Products Press

Lu, C.-L. und Baker, R.C. (1987) Effect of pH and food ingredients on the stability of egg yolk phospholipids and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *Journal of Food Science*, 52 (3), 613-616

Mackie, A.R., Gunning, A.P., Ridout, M.J., Wilde, P.J. und Morris, V.J. (2001) Orogenic displacement in mixed β-lactoglobulin /β-casein films at the air/water interface. *Langmuir*, 17, 6593-6598.

Mackie, A.R., Gunning, A.P., Wilde, P.J. und Morris, V.J. (1999) The orogenic displacement of protein from the air/water interface by competitive adsorption. J*ournal of Colloid and Interface Science*, 210, 157-166

Magdassi, S., Vinetsky, Y. und Relkin, P., (1996) Formation and structural heat-stability of β-lactoglobulin/surfactant complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 6, 353-362

Malmsten, M. (1995) Protein Adsorption at Phospholipid Surfaces. Journal for Colloid and Interface Science. 172 (1), 106-115

Markert, Y. (2004) Gewinnung und gentechnische Modifizierung einer rekombinanten Phospholipase A2 zur industriellen Anwendung. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. und Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87, 206-210

Martin, S.F., DeBlanc, T.L. und Hergenrother, P.J. (2000) Determination of the Substrate Specificity of the Phospholipase D from Streptomyces chromofuscus via an Inorganic Phosphate Quantitation Assay. *Analytical Biochemistry*, 278, 106-110

Martinet, V., Beaumal, V., Dalgalarrondo, M. und Anton M. (2002) Emulsifying properties and adsorption behaviour of egg yolk lipoproteins (LDL and HDL) in oil-in-water emulsions. In: *Food emulsions and dispersions*. Anton, M. (Hrsg.), Research Signpost: Trivandrum 103–116

Martinet, V., Saulnier, P., Beaumal, V., Courthaudon, J.L. und Anton, M. (2003) Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 185-194

Mc Bee, L.E. und Coterill, O.J. (1979) Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of Food Science*, 44, S.656-667

McClements, D.J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 305-313

McCrae, C.H. (1999) Heat stability of milk emulsions: phospholipid- protein interactions. *International Dairy Journal*, 9, 227-231

Mel'nikov, S. (2002) Effect of pH on the adsorption kinetics of egg yolk at the. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 265-275

Miller, R., Fainerman, V. B., Makievski A. V., Kräger, J. und Wüstneck, R. (2000) Adsorption characteristics of mixed monolayers of a globular protein and a non-ionic surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 161 (1), 151-157

Mine, Y. und Keeratiurai, M. (2000) Selective displacement of caseinate proteins by hens egg yolk lipoproteins at oil-in-water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 1-11

Mine, Y. (1997) Structural and functional changes of hen's egg yolk low-density lipoproteins with Phospholipase A2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4558-4563

Mine, Y. (1998a) Emulsifying characterization of hens egg yolk proteins in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 12, 409-415

Mine, Y. (1998b) Adsorption behavior of egg yolk low-density lipoproteins in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 46, 36-41

Mine, Y., Chiba, K. und Tada, M. (1993) Effect of phospholipids on conformational change and heat stability of ovalbumin. Circular dichroism and nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 157-161

Mine, Y. (2002) Recent advances in egg protein functionality in the food system. *Word's Poultry Science Journal*, 58, 31-39

Mine, Y., Kobayashi, H., Chiba, K. und Tada, M. (1992) 31P NMR study on the interfacial adsorptivity of ovalbumin promoted by lysophosphatidylcholine and free fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1111-1115

Mizutani, R. und Nakamura, R. (1984) Emulsifying properties of egg yolk low density lipoprotein (LDL): comparison with bovine serum albumin and egg lecithin. *LWT - Food Science and Technology*, 17, 213-216

Mizutani, R. und Nakamura, R. (1987) Emulsifying Properties of a Complex between Apoprotein from Hen's Egg Yolk Low Density Lipoprotein and Egg Yolk Lecithin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1115-1119

Montserret, R., McLeish, M.J., Böckmann, A., Geourjon, C. und Penin, F. (2000) Involvement of Electrostatic Interactions in the Mechanism of Peptide Folding Induced by Sodium Dodecyl Sulfate Binding. *Biochemistry*, 39, 8362-8373

Mustranta, A., Forssell, P. und Poutanen, K. (1995) Comparision of Lipases and Phospholipases in the Hydroysis of Phospholipids. *Process Biochemistry*, 30, 393-401

Myers, D. (1991) *Polymers at interfaces, Surfaces, interfaces and colloids*, VHC Publishers New York, 283-297, 1991

Nakai, S., Li-Chan, E. und Hayakawa, S. (1986) Contribtion of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung,* 30, 327-336

Nakamura, R., Fukano, T. und Taniguchi, M. (1982) Heat-induced gelation of hens' egg yolk low density lipoprotein (LDL) dispersion. *Journal of Food Science*, 47, 1449-1453

Nielsen, P.M. (2000) Producing cheese for products such as pizza, involves treating cheese milk or its fraction with phospholipases and producing cheese from cheese milk which is also obtained by reversing process. Novozymes A/S, Denmark. *PCT International Patent WO2000/54601*

Nieuwenhuyzen, W. van und Szuhaj, B.F. (1998) Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Fett/Lipid*, 100, 282-291

Nikiforidis, C.V. und Kiosseoglou, V. (2007) The role of Tween in inhibiting heat-induced destabilization of yolk-based emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21, 1310-1318

Nilsson, L., Osmark, P., Fernandez, C., Andersson, M. und Bergenstahl, B. (2006) Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6881-6887

Nilsson, L., Osmark, P., Fernandez, C. und Bergenstahl, B. (2007) Competitive adsorption of proteins from total hen egg yolk during emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6746-6753

Novozymes A/S (2002) Lecitase® Ultra/Lecitase 10L. Bagsvaerd (DEN), Produktkatalog Novozymes A/S (Hrsg.).

Nylander, T. und Ericsson, B. (1997) Interactions: Proteins and Lipids. In: *Food Emulsions*, Friberg, S.E. und Larsson, K. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York,Basel, 3. Auflage

Nylander, T. (2004) Interactions between Proteins and Polar Lipids. In: *Food Emulsions,* Friberg, S.E, Larsson, K. und Sjöblom, J., Fourth Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 4.Auflage

Oberle, V. (1999), Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf die Eigenschaften biologischer und Modellmembranen. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Pardun H. (1989) Pflanzenlecithine - Wertvolle Hilfs- und Wirkstoffe? *Fat Science Technology*, 91, 45-58.

Parkinson, E.L. und Dickinson, E. (2004) Inhibition of heat-induced aggregation of β-lactoglobulin-stabilized emulsions by very small additions of casein. *Colloids and Surfaces*, 39, 23-30

Pisch-Heberle, S. (2000) Untersuchungen zur Stabilisierung von Membranproteinen mit ungewöhnlichen Phospholipiden Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Dissertation

Plückthun, A. und Dennis, E.A. (1981) Phospholipase A2 hydrolysis of phospholipids: Use of 31P NMR to study the hydrolysis, acyl migration, regiospecific synthesis and solubilization of phospholipids. In: *Phosphorus Chemistry*, ACS Symposium Series, 171, 591-594

Pohl, M. (2005) Grenzflächeneigenschaften. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*, Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg

Powrie, W.D. und Nakai, S. (1986) The chemistry of eggs and egg products. In: *Egg science and technology,* Stadelman, W.J. und Cotteril, O.J. (Hrsg.), Avi Publishing, Westport

Saitou, C., Ouchi, K. und Ohta, S. (1992) Process for modifying the properties of egg yolk, Kaisha, JP: Kyowa Hakko Kogyo KK, *Patent US 5080911*

Sato, H., Yoshikane, E., Watanabe,T., Takano, K., Nagashima, T. und Kozima, T.T. (1998) Analysis of the Molecular Structure of *Streptomyces chromofuscus*-derived Phospholipase D. *Food Preservation Science,* 24 (5), 309-314

Schäffner, I. (2001). Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D-Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea var. capitata*). Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation

Schrma, S.K. und Dalgleish, D.G. (1993) Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1407-1412

Scherze, I. und Muschiolik, G. (2001) Effects of various whey protein hydrolysates on the emulsifying and surface properties of hydrolysed lecithin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21 (1-3), 107-117

Schubert, H. (2005a) Physikalisch-chemische Grundlagen der Stabilität von O/W-Emulsionen. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*, Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg

Schubert, H. (2005b) Einführung in die Emulgiertechnik Grundlagen der Tropfenkoaleszenz. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*, Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg

Schubert, H. (2000c) Physikalisch-chemische Grundlagen der Stabilität von O/W-Emulsionen. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*, Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg

Schuchmann, H.P. (2005) Emulgieren und Schäumen. In: *Lebensmittelverfahrens-technik*, Schuchmann, H.P. und Schuchmann, H., WILEY-VCH Verlag, Weinheim

Scott, D.L. und Sigler, P.B. (1994a) The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A2. *Advances in Inorganic and Biochemistry*, 10, 139-155

Scott, D.L. und Sigler, P.B. (1994b). Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Advances in Inorganic and Biochemistry*, 45, 53-88.

Shenton, A.J. (1979) Membrane composition and performance of food emulsions. University of London, PhD. Thesis

Shimbo, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. und Ina, K. (1993) Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1946-1948

Six, D.A. und Dennis, A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488, 1-19

Stang, M. (1998) Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf

Stephan, A. (1999) Entwicklung und Beeinflussbarkeit des Flavors von Sojalecithinen. Hamburg, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, Dissertation

Stieglitz, K.A., Seaton, B. und Roberts, M.F. (2001) Binding of proteolytically processed phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* to phosphatidylcholine membranes facilitates vesicle aggregation and fusion. *Biochemistry*, 40, 13954-13963

Sünder, A. und Muschiolik, G. (2001) Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein–phospholipid mixtures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, (1-3), 75-85

Suzuki, S., Yamatoya, H., Sakai, M., Kataoka, A., Furushiro, M. und Kudo, S. (2001) Oral administration of soybean lecithin transphosphatidylated phosphatidylserine improves memory impairment in aged rats. *Journal of Nutrition*, 131, 2951–2956

Taborsky, G. (1974) Phosphoproteins. *Advances in protein chemistry*, 28, 1-210

Ternes, W., Acker, L. (1994) Funktionelle Eigenschaften des Eigelbs. In: *Ei und Eiprodukte*, Ternes, W., Acker, L. und Scholtyssek, S. (Hrsg.), Berlin, Hamburg: Paul Parey.

Ternes, W. und Acker, L. (1994) Mikrostruktur und mikrostrukturelle Veränderungen des Eiinhalts. In: *Ei und Eiprodukte*, Ternes, W., Acker, L. und Scholtyssek, S. (Hrsg.), Berlin, Hamburg: Paul Parey.

Ternes, W. (2008) Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung. 2. überarb. und aktual. Aufl. Hamburg: Behr,

Ternes, W. (1989) Characterisation of water soluble egg yolk proteins with isoelectric focusing. J*ournal of Food Science*, 54, 3, 764-765

Tesch, S. (2002) Charakterisieren mechanischer Emulgierverfahren: Herstellen und Stabilisieren von Tropfen als Teilschritte beim Formulieren von Emulsionen. *Berichte aus der Verfahrenstechnik.* Aachen: Shaker Verlag

Timmermann, F. (2005) Emulgatoren: Aufbau und Wirkungsweise. In: *Emulgiertechnik Grundlagen Verfahren und Anwendungen*, Schubert, H. (Hrsg.), Behrs, Hamburg

Tscheuschner, H-D. (1996) Physiko-chemische Grundlagen disperser Lebensmittel-stoffe. In: *Grundzüge der Lebensmitteltechnik*, Tscheuschner, H-D. (Hrsg.), 2.Auflage, Behr's, Hamburg,

Tsutsui, T. (1988) Functional properties of heat-treated egg yolk Low Density Lipoprotein. *Journal of Food Science*, 53 (4), 1103-1106

Tsutsui, T. und Obara, T. (1982) Hydrophobic components in delipidated granule of egg yolk. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 2587-2589

Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H. und Lazdunski, M. (1999). On the diversity of secreted phospholipase A2 cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (44), 31195– 31202.

Van Dam, A.F. (1974) Stabilised emulsions comprising phospholipo-protein. London, *Patent 1525929*

Virto, C., Svensson, I. und Adlercreutz, P. (2000) Hydrolytic and transphosphatidylation activities of phospholipase D from savoy cabbage towards lysophosphatidyl-choline. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106, 41-51

Washington, C., Chawla, A., Christy, N. und Davis, S.S. (1989) The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 54, 191-197

Wagner, K. und Brezesinski, G. (2007) Phospholipase D Activity Is Regulated by Product Segregation and the Structure Formation of Phosphatidic Acid within Model Membranes. *Biophysical Journal*, 93, 2373-2383

Wakamuto, T., Sato, Y. und Saito, Y. (1982) Determination of Main Mineral Contents in Hen's Egg Yolk Fractions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 577-578

Walstra, P. und de Roos, A.L. (1993) Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Reviews International*, 9, 503-525

Watanabe, K. (1982) Structural proteins of the hens' egg. *II. New Food Industry*, 24, 16

Woodward, S.A. und Cotterill, O.J. (1987) Texture profile analysis, expressed serum, and mircrostructure of heat-formed egg yolk gels. *Journal of Food Science*, 52, 68-74

Yamamoto, I., Konto, A., Handa, T. und Miyajima, K. (1995) Regulation of phospholipase D activity by neutral lipids in egg-yolk phosphatidylcholine small unilamellar vesicles and by calcium ion in aqueous medium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1233, 21-26

Yamamoto, T., Junja L.R, Hajime, H. und Kim, M. (Hrsg.) (1996) *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*, Boca Raton, Fl.: CRC Press LLC

Yamamoto, Y. und Araki, M. (1997) Effects of lecithin addition in oil or water phase on the stability of emulsions made with whey proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1791-1795.

Yang, H. und Roberts, M.F. (2002) Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca2+-dependent phospholipase D. *Protein Science*, 11, 2958-2968

Yilmaz, E. (2005) Entwicklung phytosphingosinhaltiger, positiv geladener Nanoemulsionen zur dermalen Applikation. Berlin, Freie Universität, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Dissertation