

D. Schumacher
L.W. Kroh

Zum Einfluß von Maillard-Reaktionsprodukten auf Enzymreaktionen

The influence of maillard reaction products on enzyme reactions

Zusammenfassung Im vorliegenden Artikel werden zunächst ausgewählte Kenntnisse zur Maillard-Reaktion *in vivo* vorangestellt, wobei Glycosylierungsreaktionen von verschiedenen Geweben sowie das Auffinden verschiedener Intermediate und Folgeprodukte der Maillard-Reaktion skizziert werden. Einen besonderen Schwerpunkt bildet der Einfluß von MRP auf die Verdauung. MRP werden in unterschiedlichem Maße resorbiert und ausgeschieden und beeinflussen demzufolge den Organismus in vielfältiger Weise. Die Wechselwirkungen definierter MRP, glycosylierter Proteine und Melanoidine mit Glycosidasen und Proteasen werden beschrieben. Die dadurch ausgelösten Effekte sind sowohl vom untersuchten Enzym als auch vom eingesetzten MRP abhängig. Im Organismus

kommt den α -Dicarbonylverbindungen (Ketoaldehyde), wie sie auch als Schlüsselverbindungen im Verlauf der Maillard-Reaktion auftreten, eine besondere Bedeutung zu. Die Möglichkeiten der Umsetzung dieser Verbindungen durch Reductasen wird vorgestellt.

Struktur und Aktivität von Enzymen werden durch die Maillard-Reaktion dieser Funktionsproteine mit reduzierenden Kohlenhydraten beeinflusst. Durch kovalente Modifizierung proteingebundener Aminosäuren sowie durch inter- und intramolekulares cross linking kann sich die Enzymaktivität verändern. Schließlich wird der Einsatz von Enzymen und monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von definierten MRP angesprochen.

Summary In this article current knowledge about the Maillard reaction *in vivo* is described first, especially the glycosylation reactions of various tissues and the identification of different final products and intermediates of Maillard reaction.

The influence of MRP on digestion is of significant importance. These products are absorbed in different ways and are excreted in various amounts. Hence, the organism is variably influenced by MRP.

The influence of defined MRP, of glycosylated proteins and of melanoidines on glycosidasen and

proteases is described. The effects produced depend on the enzyme and on the used MRP. Reactive α -dicarbonyl compounds play an important role in the organism. Further possible reactions of these compounds caused by reductases are discussed.

The protein structure of enzymes is changed by Maillard reaction. Thereby the enzyme activity is influenced by covalent modifications of different amino acids and by inter- and intramolecular crosslinking.

Finally, the use of enzymes and monoclonal antibodies for detection of MRP is discussed.

Schlüsselwörter Maillard-Reaktionsprodukte – Glycosylierung, enzymatischer Abbau – Melanoidine – Verdauungsenzyme

Key words Maillard reaction products – glycosylation – enzymatic degradation – melanoidins – digestive enzymes

Abbreviation index AGE = Advanced Glycosylation Endproducts, Endprodukte der Glycosylierung · HMW = High Molecular Weight, Produkte mit hohem Molekulargewicht · LMW = Low Molecular Weight, Produkte mit niedrigem Molekulargewicht · MRP = Maillard Reaction Products, Produkte der Maillard-Reaktion

Eingegangen: 21. August 1995
Akzeptiert: 22. März 1996

Prof. Dr. L. W. Kroh (✉)
D. Schumacher
Institut für Lebensmittelchemie
der Technischen Universität Berlin
TIB 4/3-1
Gustav-Meyer-Allee 25
13355 Berlin

Einleitung

Maillard-Reaktionsprodukte (MRP) sind das Ergebnis einer Vielzahl von Folge- und Parallelreaktionen zwischen Aminosäuren bzw. Proteinen und reduzierenden Zuckern. Die Art und Geschwindigkeit dieser nichtenzymatischen Bräunungsreaktion wird sensibel durch die Qualität und Quantität der Edukte sowie durch die Parameter des Reaktionsmilieus wie Temperatur, pH-Wert oder a_w -Wert beeinflusst. Die Maillard-Reaktion tritt während der Lebensmittelproduktion, Lebensmittellagerung, aber auch im lebenden Organismus auf. Dabei bewirken die MRP differenzierte physiologische und metabolische Effekte und können in sehr unterschiedlichem Maße enzymatische Reaktionen beeinflussen. Aus ernährungsphysiologischer Sicht verursacht die Maillard-Reaktion vor allem unerwünschte Wirkungen wie beispielsweise die Herabsetzung der Bioverfügbarkeit von Nähr- und Mineralstoffen durch Veränderung der Resorption (3, 81), Wachstumsinhibierungen (86), Organveränderungen, Änderungen von Enzymaktivitäten, Mutagenität (94, 102, 96) und letztlich auch Kanzerogenität (106). Zu den erwünschten physiologischen Wirkungen zählen cholesterinsenkende (79, 67) und antioxidative Wirkungen der MRP. In diesem Zusammenhang ist auf grundlegende Arbeiten über physiologische und ernährungsphysiologische Aspekte der Maillard-Reaktion von Ledl et al. (57), Finot (25), Dyer et al. (19), Erbersdobler et al. (22) und Schleicher (82) zu verweisen. Damit rücken zunehmend auch Probleme der Maillard-Reaktion *in vivo* in den Mittelpunkt des Interesses (56), womit auch den Untersuchungen zur Beeinflussung von enzymatischen Reaktionen durch MRP eine besondere Bedeutung zukommt. Schwerpunktmäßig werden im vorliegenden Artikel folgende Themen angesprochen: die enzymatische Abbaubarkeit von Substraten nach deren Veränderung durch die Maillard-Reaktion, z.B. infolge Glycosylierung, der Einfluß der MRP auf die Aktivität ausgewählter Enzyme, die Veränderung der Enzymproteinstruktur durch Beteiligung an der Maillard-Reaktion und eine damit verbundene Beeinflussung der Enzymaktivität und schließlich ausgewählte Nachweise von MRP mit Hilfe von Enzymen.

Die Maillard-Reaktion *in vivo*

In jüngerer Zeit haben Untersuchungen zur Maillard-Reaktion *in vivo*, vor allem wegen ihrer Auswirkungen auf Enzyme, besondere Bedeutung erlangt, so daß zu Beginn dieses Beitrages kurz auf die Reaktion im biologischen System eingegangen werden soll. Im menschlichen Körper beispielsweise kann die Maillard-Reaktion bei Temperaturen um 37°C über die gesamte Lebenszeit ablaufen. D-Glucose oder andere reduzierende Zucker, wie z.B. D-Ribose, reagieren mit freien Aminogruppen der Proteine unter intermediärer Bildung von N-Glycosiden und

nachfolgender Amadori-Umlagerung zu den relativ stabilen 1-Amino-1-deoxyketosen (1) (vgl. Abb. 1). Diese Reaktion wird als nichtenzymatische Glycosylierung (Glucosilierung) bezeichnet und ist im medizinischen Sprachgebrauch auch als „Fructosylierung“ oder „Glycation“ bekannt.

Im Proteinverband werden vor allem freie ε -Aminogruppen von Lysinresten, beim Hämoglobin beispielsweise auch die Aminogruppen des N-terminalen Valins der β -Kette (52), glycosyliert. Im allgemeinen kann eine relative Spezifität des Glycosylierungsortes beobachtet werden, die mit der Basizität der N-Verbindung und mit sterischen Effekten erklärt werden kann. Bei Gewebeproteinen hängt der Glycosylierungsgrad von der Saccharidkonzentration in den Zellen (57) bzw. dem Zutritt von D-Glucose zu den Proteinen und reaktiven freien Aminogruppen ab. Im gesunden Organismus beträgt die Blutglucosekonzentration in der Regel 5 mmol/l, kann aber z.B. bei Diabetes mellitus bis auf Werte von 30 mmol/l ansteigen. Dies ist unter anderem die Voraussetzung dafür, daß bei einer Reihe von langlebigen Proteinen wie Augenlinsenproteinen (69, 6, 15, 26) oder Kollagen (27, 57, 58), aber auch Hämoglobin (51, 6, 93, 9, 5), Albumin (85, 92), Erythrozytenmembranprotein (84), Lipoproteinen (17, 83, 107) und Immunglobulin G (57) nichtenzymatische Glycosylierungsreaktionen nachgewiesen werden konnten.

Nach den Ergebnissen von Ledl und Schleicher (57) korrelieren die Glycosylierungsgrade verschiedener Gewebe gut miteinander, und Patienten mit einer hohen Glycosylierung der Sehnenproteine weisen ebenso hohe Glycosylierungsraten anderer Gewebe auf. Ebenso stimmt der mittlere Blutglucosespiegel in der Regel gut mit dem Glycosylierungsgrad der Gewebe überein.

Als Carbonylkomponente reagieren außer D-Glucose auch andere Saccharide wie D-Fructose, D-Xylose, D-Threose (74), D-Ribose, Glycerinaldehyd und phosphorylierte Zucker (70). Pentosen und D-Fructose zeigen oft eine höhere Reaktivität der Vernetzung zwischen den Proteinen als D-Glucose (10, 70).

Die Konzentration an Amadori-Verbindungen (1, vgl. Abb. 1), den ersten stabilen Intermediaten der frühen Phase der Maillard-Reaktion, bleibt während der Alterung des Menschen in etwa konstant. Dies bedeutet, daß Amadori-Verbindungen entweder reversibel wieder in ihre Ausgangsstoffe gespalten werden können oder aber bei stetiger Bildung in kontinuierliche Abbaureaktionen einmünden. Als Folgeprodukte dieser Verbindungen (1) werden α -Dicarbonylverbindungen (1-, 3- und 4-Deoxyosulosen) gebildet, die im Organismus u.a. in Pyrrolin (Pyrrolaldehyd) (2) (35), Carboxymethyllysin (3) (2), Carboxymethylhydroxylysin (4) (19), Carboxylactyllysin (5) (19) und Pentosidin (6) (90) umgewandelt werden. In Abb. 2 ist eine Auswahl der *in vivo* nachgewiesenen, relevanten Verbindungen mit ihren chemischen Strukturen angegeben. Während die Derivate der Carboxyllysine (3-5) aus

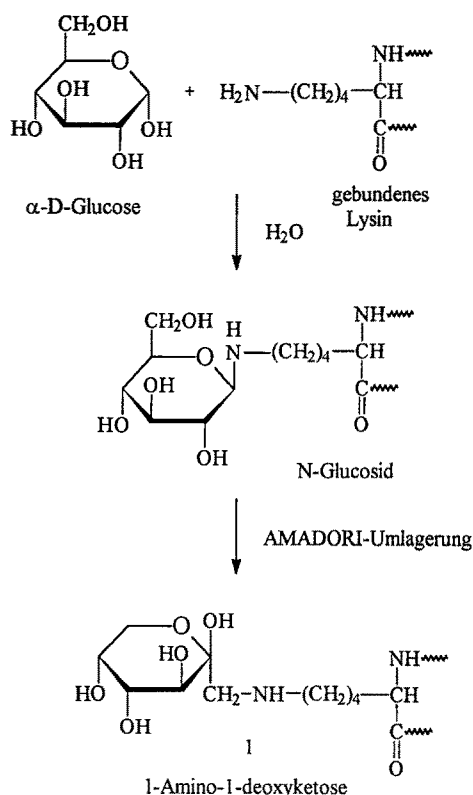


Abb. 1 Glycosylierung von proteingebundenem Lysin durch D-Glucose.

der oxidativen Spaltung von Amadori-Verbindungen des Lysins mit D-Glucose hervorgehen können, läßt sich die Struktur des Pentosidins (6) durch eine Quervernetzung (cross-linking) von proteingebundenem Lysin und Arginin mit einem Zucker (bevorzugt Pentosen) oder Zuckerderivaten erklären (69).

Als irreversible Folgeprodukte entstehen sogenannte AGE-Produkte (advanced glycosylation endproducts), die einen Komplex verbrückter hochmolekularer und häufig fluoreszierender Proteine darstellen.

Von praktischer Bedeutung ist die *in-vivo*-Hemmung der Bildung dieser AGE-Produkte durch Aminoguanidin $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ (8, 14, 13). Beispielsweise wird die Bildung von AGE-Hämoglobin durch Aminoguanidin signifikant inhibiert (66), aber auch die Verringerung der Albuminurie durch Aminoguanidin konnte gezeigt werden (41).

Fluoreszierende Verbindungen wurden auch bei der Reaktion von Nucleinsäuren oder Nucleotiden mit reduzierenden Zuckern beobachtet (70, 58, 36), auf die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden soll.

Einfluß von Maillard-Reaktionsprodukten auf die Verdauung

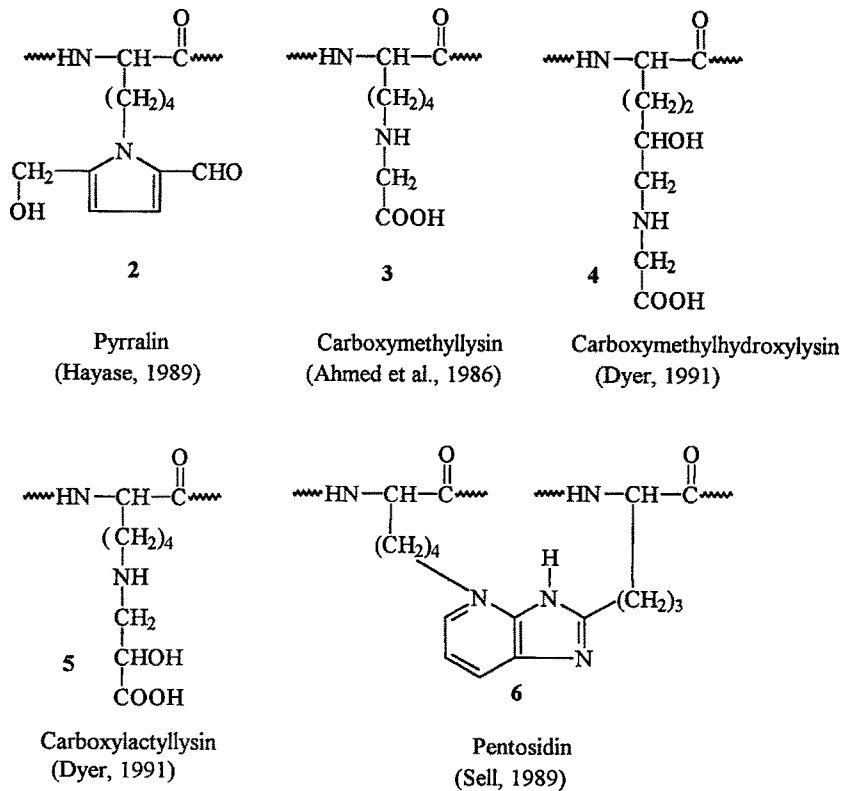
Resorption von Maillard-Reaktionsprodukten

Die in der frühen Phase der Maillard-Reaktion gebildeten Amadori-Verbindungen werden im Vergleich mit Aminosäuren nur langsam resorbiert (91, 20, 21). Untersuchungen an Ratten zeigten, daß die Resorptionsgeschwindigkeit von freien Fructosylaminosäuren in der Reihenfolge ϵ -Fructosyllysin, Fructosylmethionin, α -Fructosyllysin abnimmt (21). Fructosylleucin wird nur zu 60 % und Fructosyltryptophan sogar nur zu 10 % von Ratten resorbiert (91). Der Hauptteil an freien Fructosylaminosäuren wird dabei über das Colon aufgenommen und zu 60-70 % (ϵ -Fructosyllysin) unverändert über den Urin und zu 8-10 % (ϵ -Fructosyllysin) über die Faeces ausgeschieden. Eine Ansammlung von Fructosylaminosäuren in Muskelzellen ist sehr gering, schon höher ist ihre Aufnahme in der Leber (21). Caseingebundenes ϵ -Fructosyllysin wird vom Humanorganismus zu 2,7 % über den Urin und zu 1 % über die Faeces als monomeres ϵ -Fructosyllysin ausgeschieden (62). Vergleichsweise dazu scheiden Ratten caseingebundenes ϵ -Fructosyllysin zu 9,7 % über den Urin und zu 1,5 % über die Faeces aus. Der Verbleib des restlichen ϵ -Fructosyllysins ist nicht völlig geklärt. Es ist jedoch bekannt, daß ϵ -Fructosyllysin von Mikroorganismen im Intestinaltrakt gespalten werden kann (100, 91, 62). Daneben wird ϵ -Fructosyllysin unter physiologischen Bedingungen zu Carboxymethyllysin, Glucoson, 3-Deoxyhexosulose sowie einer Reihe von Pentosen und Tetrosen abgebaut (108). Die Resorption von Amadori-Verbindungen wird damit durch verschiedene Faktoren wie ihre Konstitution, ihre Bindung an Proteine und durch die Art des resorbierenden Organismus beeinflusst.

5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF), ein typisches Abbauprodukt der Zucker infolge Karamelisierung oder Maillard-Reaktion, wird von Ratten vollständig resorbiert und nach Oxidation zu 5-Hydroxymethylfuran-2-carbonsäure restlos über den Urin ausgeschieden (23).

Niedermolekulare Reaktionsprodukte der Finalphase (low molecular weight products, LMW) der Maillard-Reaktion (dialysierbare Melanoidine) werden von Ratten teilweise resorbiert, (40 % nach (77) und 23-30 %) nach (24), jedoch nicht vollständig mit dem Urin ausgeschieden, so daß es nach Finot (25) zu einer Ansammlung im Körper kommen kann. Die Menge an resorbierten LMW-Melanoidinen ist stark von den Edukten und den Reaktionsbedingungen bei ihrer Bildung abhängig.

Hochmolekulare Melanoidine (high molecular weight products, HMW) dialysieren nicht, können aber nach ihrer Löslichkeit unterschieden werden. Schon aus Untersuchungen von Nair et al. (71) geht hervor, daß sowohl lösliche als auch unlösliche HMW-Melanoidine aus der Umsetzung zwischen Lysin und D-Glucose (24 h, 100 °C) von Ratten nicht resorbiert und vollständig über

Abb. 2 Proteingebundene
Maillard-Produkte aus *in-vivo*-
Reaktionen.

die Faeces ausgeschieden werden. Die undialysierbaren HMW-Melanoidine aus der Umsetzung von Glycin mit D-Glucose (7 h, 100 °C) wurden zu 79,6 % im Faeces und zu 1,8 % im Urin von Ratten nachgewiesen (37). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch Finot (25), der bei Fütterungsversuchen mit HMW-Melanoidinen aus der Reaktion zwischen Casein und D-Glucose, eine Ausscheidung von 2-6 % über den Urin und von 90-93 % über die Faeces der Ratten ermittelte. Für die Resorption der HMW-Melanoidine sind demnach neben den Reaktionsbedingungen der Maillard-Reaktion (T, pH, aw) auch die Edukte der Umsetzung von entscheidender Bedeutung.

Durch die Aufnahme von HMW-Melanoidinen ist außerdem eine Reduzierung der Resorption von Mineralien (23) und von Cholesterol (67) bekannt.

Weitere physiologische Effekte, die mit der Aufnahme von HMW-Melanoidinen (Glycin/D-Glucose, 0,1 mol Na₂CO₃, 96 h, 90 °C) verbunden sind, betreffen die Verringerung der gastrointestinalen Transitzeit von Nährstoffen, die auf die bevorzugte hydrophile Eigenschaft der Melanoidine zurückgeführt wird und sich im Anstieg des Wassergehaltes der melanoidinhaltigen Ausscheidungsprodukte zeigte (31). Darüber hinaus verursachten nicht-dialysierbare Glycin/D-Glucose-Melanoidine aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Magen eine mit der Verfestigung des Mageninhaltes einhergehende Gelbildung als akuten Effekt. In dessen chronischer Folge traten dann Nekrose und eine Verarmung an Epithelzellen der Mu-

cosamembran auf, die schließlich eine Reduktion der Magen-Oberfläche bewirkten (67, 31).

Einfluß der Maillard-Reaktionsprodukte auf Glycosidasen

Nach ersten Untersuchungen zur Beeinflussung von glucanspaltenden Enzymen durch MRP konnte nachgewiesen werden, daß Glycosidasen durch Amadori-Verbindungen gehemmt werden. So unterliegt beispielsweise α -Glucosidase einer kompetitiven Hemmung durch die Amadori-Verbindung Fructosyl-L-tryptophan (60).

Systematische Untersuchungen an oligomeren Amadori-Verbindungen zeigten, daß die Aktivitäten von α -Glucosidase und Glucoamylase durch Fructosyl- und Maltosylglycin kompetitiv gehemmt werden. Die gleichen Amadori-Verbindungen (Fructosyl- und Maltosylglycin) hatten dagegen keinen Einfluß auf die Aktivität von α -Amylase (aus Schweinepankreas). Die N-glucosidische Bindung des Fructosylglycins wird durch die untersuchten Enzyme α -Glucosidase, Glucoamylase und α -Amylase nicht hydrolysiert. Dagegen wird Maltosylglycin durch α -Glucosidase zu D-Glucose und Fructosylglycin abgebaut. Maltotriosylglycin, ein um eine Glucoseeinheit verlängertes Oligomer, wird durch die α -Glucosidase um den Faktor 10 schneller als Maltosylglycin hydrolysiert. Die Enzyme Glucoamylase und α -Amylase

katalysieren nur die Spaltung von Maltotriulosylglycin, wobei D-Glucose und Maltulosylglycin, nicht aber Fructosylglycin gebildet werden (87, 89).

Daß Glycosylamine auch als Inhibitoren für Glycosidasen eingesetzt werden können, zeigen beispielsweise aktuelle Untersuchungen von Kolarova et al. (54), die die Hemmung von Diglucosylamin auf β -Glucosidasen untersuchten.

Bei der Verfütterung von Eialbumin oder Aprikosenpulver, das durch eine thermische Reaktion mit Kohlenhydraten gebräunt wurde, konnten an den Versuchsratten eine signifikante Absenkungen der Lactase-, Saccharase- und Maltaseaktivität gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden, obwohl nur die mit Lactose umgesetzten Proteine als Substrat für Lactase fungieren sollten (59, 60). Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch andere Autoren, die eine deutlich erniedrigte Maltaseaktivität bei Ratten registrierten, wenn diese 18 Monate lang mit MRP aus der Umsetzung von Eialbumin mit D-Glucose gefüttert wurden (79). Erfolgte jedoch vor der Bräunung des Eialbumins eine Hydrolyse durch Pepsin, blieben sowohl die Maltase- als auch die Saccharaseaktivität konstant. Wird anstelle des Eialbumins Casein mit D-Glucose umgesetzt und an Ratten verfüttert, wird keine Veränderung der Saccharaseaktivität beobachtet.

Bei der Verabreichung von autoklavierter Trockenmagermilch (121 °C; 30 bzw 45 min) sinkt die Amylaseaktivität im Dünndarm von Versuchsratten auf 75-80 % (86). Auch die Verfütterung eines bei 35 °C thermisch sehr schonend behandelten Casein/D-Glucose-Reaktionsgemisches führte zu einer Erniedrigung der Amylaseaktivität, die nur teilweise durch die Zufütterung von Lysin zum Maillard-Casein aufgehoben werden konnte.

Aber nicht nur glycosylierte Proteine haben einen Einfluß auf die Glycosidaseaktivität, sondern auch Melanoidine, die häufig stark gefärbten Endprodukte der Maillard-Reaktion, beeinflussen die kohlenhydratspaltenden Enzyme. Bei einem Zusatz von 5-10 mg/ml LMW-Fraktion aus einer Lysin/D-Glucose-Reaktion (100 °C; pH 6,5; Öste et al. (75)) werden die Disaccharidasen Maltase, Trehalase, Invertase und Lactase kompetitiv oder nach einem gemischten Hemmtyp inhibiert. Die HMW-Fraktion der gleichen Reaktion inhibierte diese Disaccharidasen bereits ab einer Konzentration von 1,4-2,8 mg/ml, vermutlich nach einem gemischten Hemmtyp (76). Ein ebenfalls gemischter Hemmtyp kann bei Untersuchungen zum enzymatischen Abbau der HMW-Fraktion aus einer Glycin/D-Glucose-Reaktion (170 °C; 40 min; quasi wasserfrei) durch Maltase beobachtet werden (88, 55). Ob hier die Adsorption des Enzymproteins an das Melanoidin oder die von Öste et al. (76) vermutete Hemmung der Disaccharidase-Aktivität durch Polyole verantwortlich ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Speichel- α -Amylase wird *in vitro* weder durch die LMW- (5 mg/ml) noch durch die HMW-Fraktion (0,8 mg/ml) der MRP aus der Lysin/D-Glucose-Reaktion inhibiert (76).

Im Unterschied zu den *in-vitro*-Versuchen zeigen *in-vivo*-Experimente, daß Lactase und Invertase durch die LMW-, nicht aber durch die HMW-Fraktion aus der oben genannten Bräunungsreaktion (75) inhibiert werden.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse bleibt zu bemerken, daß Glycosidasen bei den *in-vitro*-Untersuchungen in der Regel frei vorliegen, *in vivo* aber an der Bürstensaummembran der Duodenalmucosa lokalisiert sind und die Substrate ggf. durch die Epithelzellmembran diffundieren müssen.

Verdaulichkeit von Maillard-Reaktionsprodukten durch Proteasen

Einfluß definierter Maillard-Reaktionsprodukte auf Proteasen

Mit dem Einfluß definierter MRP auf Proteasen beschäftigte sich eine Arbeit von Öste et al. (78), die verschiedene, zum Teil flüchtige MRP hinsichtlich ihrer Inhibitorwirkung auf Carboxypeptidase A und Aminopeptidase N (Membran-Alanyl-Aminopeptidase) untersuchten. Unterschiedlich substituierte Furane und Pyrrole, die aus der Maillard-Reaktion bekannt sind, inhibierten die untersuchte Carboxypeptidase A, wobei eine stärkere Hemmung durch carboxylierte Furane wie beispielsweise 5-Hydroxymethylfuran-2-carbonsäure oder Furan-2-carbonsäure zu finden ist. 2-Formyl-5(hydroxymethyl)pyrrol-1-norleucin hemmte Carboxypeptidase A auch *in vivo*. Die Aminopeptidase N wurde von N-substituierten Pyrrolen wie N-Carboxymethylpyrrol und N-Carboxymethyl-2,5-dimethylpyrrol kompetitiv gehemmt. Fructosyl-L-lysin inhibierte weder die Carboxypeptidase A noch die Aminopeptidase N (78).

Zu den definierten Reaktionsprodukten der Umsetzung von Proteinen mit Kohlenhydraten zählen auch glycosylierte Proteine, die durch gezielte Reduktion der Kohlenhydratkomponente stabilisiert werden können (11). Untersuchungen zum enzymatischen Abbau dieser glycosylierten Proteine zeigen, daß die Anfangshydrolysegeschwindigkeit der durch α -Chymotrypsin verursachten Abbaureaktion bis zu einer Konzentration von 50 mol D-Galactose/mol Legumin deutlich ansteigt und bei höherem Glycosylierungsgrad wieder sinkt. Diese Ergebnisse werden mit Strukturveränderungen am Protein diskutiert, bei denen infolge der Glycosylierung die tertiäre Struktur des Proteins entfaltet und dadurch eine Verbesserung der proteolytischen Abbaubarkeit erreicht wird. Durch eine mögliche Freilegung von Peptidbindungen, an denen Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin beteiligt sind, verbessern sich infolge der Glycosylierung die Angriffsmöglichkeiten für α -Chymotrypsin, belegbar durch die analytisch festgestellte Zunahme von Tyrosylresten an der Oberfläche des glycosylierten Legumins. Im Gegensatz zu α -Chymo-

trypsin wird die durch Trypsin erreichte Anfangshydrolysegeschwindigkeit bei geringen Glycosylierungsgraden des Legumins nicht erhöht, sondern herabgesetzt. Wahrscheinlich sind die für die katalytische Wirkung des Trypsins notwendigen basischen Seitenketten der Aminosäuren im Protein durch die Glycosylierung blockiert (12).

Die Reduzierung der Anfangshydrolysegeschwindigkeit des Proteins ist auch vom reagierenden Saccharidmolekül abhängig. So hemmt beispielsweise das lactosylierte Legumin-Derivat Trypsin am stärksten und das galactosylierte Derivat am schwächsten (12). In diesem Zusammenhang zeigten Waniska und Kinsella (105), daß das mit Maltose oder Glucosamin (2-Amino-2-deoxy-D-glucose) derivatisierte β -Lactoglobulin durch Trypsin und α -Chymotrypsin mit einer höheren Anfangshydrolysegeschwindigkeit gegenüber dem unmodifizierten Protein gespalten wird. Wie beim Erbsenlegumin ist die Hydrolysegeschwindigkeit des glycosylierten Proteins durch α -Chymotrypsin bedeutend höher als durch Trypsin. Die Modifizierung des β -Lactoglobulins mit Glucosamin ergab erst bei einer größeren Anzahl glycosylierter Aminogruppen im Protein eine Erhöhung der Anfangshydrolysegeschwindigkeit. Dagegen lag der Endhydrolysegrad bei Maltosyl- und Glucosamin- β -lactoglobulin sowohl bei α -Chymotrypsin als auch bei Trypsin niedriger als beim unmodifizierten Protein, was letztlich bedeuten kann, daß die Hydrolyseprodukte des glycosylierten β -Lactoglobulins die *in-vitro*-Verdaulichkeit reduzieren.

Einfluß von Zwischenprodukten der Maillard-Reaktion aus Kohlenhydraten und Proteinen sowie Melanoidinen auf Proteasen

Werden reduzierende Kohlenhydrate mit Proteinen zur Reaktion gebracht, bilden sich am Protein die schon im Kapitel 2 (siehe Abb. 1) erläuterten Umlagerungsprodukte der Zucker, die relativ stabilen 1-Amino-1-deoxyketosen. Die Reaktion bleibt jedoch nicht auf dieser Stufe stehen, sondern es laufen in Abhängigkeit von Reaktionszeit und -temperatur weitere Reaktionen ab, in deren Folge es zur Bildung verschiedener Kohlenhydratabbauprodukte kommt, bis schließlich die braun bis schwarz gefärbten Melanoidine gebildet werden. Gegenwärtig können jedoch weder die Intermediate des Zuckerabbaus am Protein noch die Melanoidine genau definiert werden. Die enzymatischen Untersuchungen zum Abbau der gebräunten Proteinproben schließen also in der Regel mehrere Reaktionsprodukte bzw. unterschiedliche Stufen der Maillard-Reaktion am Protein ein.

Ein schlüssiger Zusammenhang besteht aber offensichtlich in der Reaktion reduzierender Zucker mit der ε -Aminogruppe des proteingebundenen Lysins und der Aktivität einiger Proteasen, wie z.B. dem Trypsin. Infolge des durch die Maillard-Reaktion modifizierten Substrates wird die Affinität des Enzyms gegenüber diesen Protein-

derivaten verändert und damit die Verdaulichkeit beeinträchtigt. Das führt beispielsweise bei Sojaprotein, Rinder Serumalbumin, β -Lactoglobulin und α -Lactoalbumin, die mit 0,5 mol D-Fructose umgesetzt werden, zu einem Lysinverlust und einer damit verbundenen Verringerung der *in-vitro*-Verdaulichkeit (16). Vergleichbar sind diese Ergebnisse mit einer von Hansen et al. (32, 33) an erhitztem Weizenmehl gefundenen verringerten *in-vitro*-Proteinverdaulichkeit durch die Enzyme Pepsin, Trypsin und Carboxypeptidase B, deren Ursache wieder in der Inhibierung der Enzyme durch eine Reaktion des proteingebundenen Lysins und D-Glucose gesehen wird.

In-vivo-Versuche an Ratten zeigen, daß nach Verfütterung von autoklaviertem (121 °C, 30 bzw. 45 min) Magermilchpulver die Aktivität der Verdauungsenzyme Trypsin sowie α -Chymotrypsin, die mitsamt dem Verdauungsbrei aus dem Gastrointestinaltrakt der Versuchsratten isoliert wurden, gegenüber Standardsubstraten zunächst ansteigt. Dabei bewirkt das 30 Minuten erhitzte Magermilchpulver eine stärkere Aktivitätserhöhung als die länger erhitzten Magermilchproben (86). Die Verfütterung von Proteinen mit gemindertem Nährwert, wie sie in den gebräunten Produkten vorliegen, induziert nach Schneeman et al. (86) wahrscheinlich eine hormonell bedingte, erhöhte Synthese und Ausschüttung von proteolytischen Enzymen, die die veränderten Enzymaktivitäten hervorrufen können.

LMW-Melanoidine aus einem Lysin/D-Glucose-Reaktionsgemisch verändern die Aktivität von α -Chymotrypsin. Trypsin dagegen wurde nur in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat und der Substratkonzentration inhibiert (77). Beim Einsatz von N-Benzoylargininethylester als Modells substrat unterlag Trypsin einer geringen nicht-kompetitiven Hemmung, da bei Zusatz von 0,5 mg/ml LMW-Fraktion die maximale Geschwindigkeit r_{\max} von $7 \cdot 10^{-2}$ auf $5 \cdot 10^{-2}$ mM/min gesenkt wurde (77). Gegenüber Carboxypeptidase A und B bewirkte die gleiche LMW-Fraktion eine reversible Substratüberschußhemmung. Vergleichend dazu wurde Amino peptidase N erst bei einem Zusatz von 0,25 mg/ml LMW-Fraktion irreversibel inhibiert. Möglicherweise setzte sich die LMW-Fraktion des untersuchten Lysin/D-Glucose-Melanoidins aus verschiedenen inhibierenden Verbindungen zusammen, die in das enzymatische Abbaugeschehen eingreifen. Eine geringe Hemmung durch die LMW-Fraktion (Lysin/D-Glucose) wurde auch bei Glycylleucin-Dipeptidase festgestellt. Für Amino peptidase A, Dipeptidylpeptidase IV und Alanylprolindipeptidase wurden dagegen keine Effekte ermittelt (77).

Bei Untersuchungen der Proteinverdaulichkeit von undialysiertem Melanoidin (Glycin/D-Glucose, 90 °C, pH 6) konnte von Pitotti et al. (80) keine Inhibierung von Pepsin beobachtet werden. α -Chymotrypsin und Trypsin wurden dagegen in entsprechenden *in-vitro*-Versuchen durch das undialysierte Melanoidin schwach gehemmt.

Einfluß von Maillard-Reaktionsprodukten auf Enzyme im Organismus (Oxidoreductasen)

Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion wie 3-Deoxyosulosen, Methylglyoxal oder auch Glyoxal sind sehr reaktive α -Dicarbonylverbindungen, die sich bevorzugt in die Vernetzungen von Proteinen und die Bildung fluoreszierender Verbindungen einschalten können (47, 42, 95, 30). Eine besondere Bedeutung kommt nach bisherigen Untersuchungen wohl der 3-Deoxyhexosulose zu, die im Organismus als Ketoaldehyd intra- und extracellulär gebildet werden kann. Intracellulär entsteht 3-Deoxyhexosulose während der Hydrolyse von Fructose-3-phosphat (97), und sie entsteht extracellulär als ein Intermediat der Maillard-Reaktion zwischen Proteinen und Hexosen (43, 45, 35). Knecht et al. (50) konnten 3-Deoxyhexosulose *in vivo* als Zwischenprodukt des Zuckerabbaus in Urin und Plasma nachweisen.

2-Ketoaldehyde wie beispielsweise Methylglyoxal hemmen die Mitose (46) und blockieren Thiolgruppen, die für die Zellteilung und Proteinsynthese von essentieller Bedeutung sind (40). Deshalb haben 3-Deoxyhexosulose- und Methylglyoxal-metabolisierende Enzyme im

Organismus auch eine wichtige Funktion im Stoffwechsel. Sie organisieren den „Selbstschutz“ der Zellen gegen die Maillard-Reaktion *in vivo* (65) und sorgen für den Abbau reaktiver Produkte aus diesen Umsetzungen (104). Die wesentlichen auch *in vivo* auftretenden Enzyme (Reductasen), die an den besagten Abbaureaktionen der α -Dicarbonylverbindungen beteiligt sein können, sind Alkohol-Dehydrogenase (NADP^+), Aldehyd-Reductase, 2-Oxoaldehyd-Dehydrogenase (NAD^+) und 2-Oxoaldehyd-Dehydrogenase (NADP^+). Alle genannten Enzyme sind Aldo/Keto-Reductasen, die NAD^+ oder NADP^+ als Coenzym benötigen und sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. In Tabelle 1 sind die Aktivitäten der Enzyme gegenüber einigen ausgewählten Substraten dargestellt. *Alkohol-Dehydrogenase* ist inaktiv gegenüber 3-Deoxyhexosulose, aber hochaktiv gegenüber Acetaldehyd, Propanal und Methylglyoxal. *2-Oxoaldehyd-Dehydrogenase* (NADP^+) zeigt eine hohe Aktivität gegenüber 2-Ketoaldehyden wie 3-Deoxyhexosulose, Methylglyoxal und Phenylglyoxal sowie gegenüber hydrophilen Monoaldehyden wie Glucuronat, Pyridin-3-aldehyd und Glycerinaldehyd. Dabei werden beispielsweise 3-Deoxyhexosulose zur 3-Deoxyglucose oder -fructose und Methylglyoxal

Tab. 1 Relative Aktivitäten von Aldo- und Keto-Reduktasen gegenüber ausgewählten Substraten

Carbonyl- verbindung	Alkohol- Dehydrogenase (NADP^+) ^{2,6}	2-Oxoaldehyd- Dehydrogenase (NADP^+)		2-Oxoaldehyd- Dehydrogenase (NAD^+) ⁵	Aldehyd- Reduktase ^{4,6} (NADP^+)
		Schweine- leber ^{1,2,6}	Peter- silie ^{1,3}		
3-Deoxyhexosulose	0	100,0	100,0	3,6	100,0
Methylglyoxal	91,4	76,2	40,8	100,0	132,9
Phenylglyoxal	20,0	115,0	98,1	34,8	180,9
Glucoson	–	31,3	51,6	–	36,3
Glyceraldehyd	–	20,7	39,7	32,1	69,7
Glyoxal	7,1	20,7	19,4	3,6	–
Diacetyl	–	4,6	0	0	–
Propanal	100,0	1,5	1,9	–	1,2
Acetaldehyd	85,7	1,3	0,4	85,7	1,2
D-Fructose	–	0	0	–	1,1
D-Glucose	–	0	0	–	1,1
Benzaldehyd	–	17,1	2,7	–	17,4
Glutaraldehyd	–	–	17,9	112,9	5,6
Dihydroxyaceton	–	2,6	0	0	141,9
Hydroxyaceton	–	–	–	0	12,1
2,3-Pentandion	–	–	12,1	4,1	–
Pyridin-3-aldehyd	–	95,6	–	–	–
4-Carboxybenzaldehyd	–	19,0	–	–	–
Butyraldehyd	–	7,5	–	–	–
Glucuronat	–	58,7	–	–	–
Formaldehyd	–	0,5	–	–	–

¹⁾ (45) ²⁾ (64) ³⁾ (44) ⁴⁾ (65) ⁵⁾ (46) ⁶⁾ (48)

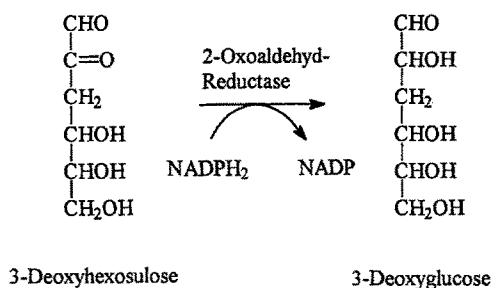


Abb. 3 Katalytische Wirkung von 2-Oxoaldehyd-Reductase.

zum Lactaldehyd reduziert. In Abb. 3 ist beispielhaft die Wirkung der 2-Oxoaldehyd-Reductase unter katalytischer Beteiligung von NADPH₂ auf 3-Deoxyhexosulose unter Bildung von 3-Deoxyglucose gezeigt. Der bei der Reduktion von Methylglyoxal gebildete Lactaldehyd ist ebenfalls in der Lage, Proteine zu modifizieren (103), kann aber auch über eine Keto-Enol-Tautomerie zu Acetol reagieren. 2-Oxoaldehyd-Dehydrogenase wird speziell in der Leber aktiv, um dort das Niveau an 2-Ketoaldehyd im Gewebe zu regulieren (34). Gegenüber Alkanalen wie Acetaldehyd und Propanal weist dieses Enzym nur eine geringe Aktivität auf.

2-Oxoaldehyd-Dehydrogenase (NAD⁺) bevorzugt als Substrate Aldehyde wie Acetaldehyd und Glutaraldehyd sowie Methylglyoxal, hat aber nur eine geringe Aktivität gegenüber 3-Deoxyhexosulose.

Die Aldehyd-Reductase schließlich zeigt die höchste Aktivität gegenüber 2-Ketoaldehyden und Dihydroxyacetone, aber eine sehr geringe Aktivität gegenüber D-Glucose.

Untersuchungen zur Vernetzung von glycosyliertem Lysozym durch 2-Oxoaldehyd-Reductase zeigen, daß dieses cross-linking erfolgreich unterbunden werden kann, wenn die reaktiven Carbonylverbindungen durch die Reductasen inaktiviert (reduziert) werden (64, 48).

Die für die fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion typische Bildung fluoreszierender Verbindungen wurde bei glycosyliertem Rinderserumalbumin, das mit 2-Oxoaldehyd-Reductase (NAD⁺) inkubiert wurde, deutlich reduziert (73).

Aus diesen Ergebnissen kann formal eine Hemmung der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion durch Dehydrogenasen abgeleitet werden, die in der katalysierten Reduktion reaktiver Carbonylverbindungen bestehen sollte.

Aldehyd-Reductase, die die Umwandlung von Aldosen und anderer Aldehyde in die entsprechenden Alkohole katalysiert, wird unter normalen Bedingungen im Körper nur in geringen Konzentrationen gebildet. Bei Diabetes mellitus und Galactosämie steigt ihr Gehalt jedoch dramatisch an, und ihre Aktivität führt bei entsprechenden Substraten zu hohen Sorbitol- und Galactitolkonzentrationen, die ihrerseits osmotische Katarakte in den Augen-

linsen verursachen können (65). Infolge ihrer möglichen Rolle bei der Pathogenese von diabetischen Komplikationen wie Kataraktbildung, Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie ist das Interesse an der Wirkung der Aldehyd-Reductase in den letzten Jahren stark gestiegen (49). Ihr wird eine Regulationsfunktion der Konzentration von Zuckeralkoholen und reaktiven 3-Deoxyhexosulosen im Stoffwechsel zugeschrieben (65).

Im Zusammenhang mit der Wirkung von MRP auf Enzyme im Organismus wurden neben den Oxidoreductasen auch Plasmaenzyme untersucht, deren Aktivität z.B. für die Beurteilung von pathologischen Vorgängen im Organismus herangezogen werden kann. Bei der Verfütterung von gebräuntem Eialbumin an Ratten wird eine signifikante Erhöhung der Serumparameter Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase oder auch der alkalischen Phosphatase festgestellt (63). Der Anstieg der Enzymaktivität dieser Plasmaenzyme korreliert mit einer gleichzeitigen Gewichtszunahme von Leber und Niere. Demnach bewirkt das durch Maillard-Reaktion veränderte Eialbumin Organschäden, die sich nach histopathologischen Untersuchungen in einer Ansammlung unbekannter dunkelbrauner Pigmente in der Leber zeigten (63, 1).

Einfluß der Maillard-Reaktion auf die Enzymstruktur

Im aktiven Zentrum zahlreicher Enzyme sind freie ε-Aminogruppen von proteingebundenem Lysin lokalisiert, die im Sinne der Maillard-Reaktion sehr reaktiv sind und leicht zur Glycosylierung neigen. In der Folge von Glycosylierungen bzw. weiteren Reaktionen der nichtenzymatischen Bräunung kann es dann zur Veränderung der Enzymaktivität kommen. Die Inkubation von β-N-Acetyl-D-hexosaminidase (β-N-Acetyl-D-glucosaminidase) mit D-Glucose führt zum kovalenten Einbau dieses Zuckers in das Enzymprotein, was mit der gleichzeitigen Herabsetzung der Enzymaktivität konform geht. Die getrennte Untersuchung ihrer Isoenzyme A und B (β-N-Acetyl-D-hexosaminidase) ergab, daß in Gegenwart von 44,4 mM D-Glucose nur das Isoenzym A nach 15stündiger Inkubation (37 °C) rund 80 % der Anfangsaktivität verliert und dies mit Strukturveränderungen am Enzymprotein verbunden ist. Nach der Glycosylierung des Enzymproteins veränderte sich die elektrophoretische Mobilität, und das Molekulargewicht stieg von 130 auf 205 kDa. Die Aktivität vom Isoenzym B blieb dabei unverändert. Durch *in-vivo*-Glycosylierung der β-N-Acetyl-D-hexosaminidase wurde auch eine Herabsetzung ihrer Aktivität in Niere und Placenta beobachtet (18).

Eine Glycosylierung und die damit verbundene Inaktivierung von Superoxid-Dismutase wurde von Arai et al. (4) und Taniguchi et al. (101) beobachtet. Die aerobe Inkubation von Superoxid-Dismutase mit D-Glucose führte sogar zur Spaltung des Enzymproteins zwischen einem

Prolin- und Histidinrest. Unter anaeroben Bedingungen erfolgte diese Spaltung nicht (101). Auch Aldehyd-Reductase wurde mit Kohlenhydraten umgesetzt und die Enzymaktivität damit deutlich herabgesetzt (98).

Daß jedoch Glycosylierungen nicht immer den Verlust der Enzymaktivität bedingen, zeigen *in-vitro*-Untersuchungen an Transaminasen, bei denen kein Aktivitätsverlust eintritt (57).

Die Inaktivierung von Catechol-Oxidase (Polyphenol-Oxidase) und Peroxidase, die häufig unerwünschte Bräunungsreaktionen in Lebensmitteln katalysieren, bereiten aufgrund ihrer Hitzestabilität oft Probleme. Systematische Untersuchungen zur Inhibierung der Catechol-Oxidase durch MRP zeigten, daß die an der Maillard-Reaktion beteiligten Aminosäuren von beträchtlichem Einfluß sind. So nimmt die inhibierende Wirkung von MRP aus verschiedenen Aminosäuren und D-Glucose in der Reihenfolge Arginin > Histidin > Lysin ab (99). Eine Reduzierung der Aktivität von Catechol-Oxidase und Peroxidase ist auch durch den Zusatz von MRP aus der Glycin/D-Glucose-Reaktion möglich (72). MRP, die der Reaktion von Glutaminsäure mit D-Glucose bzw. Valin und D-Glucose entstammen, erhöhen dagegen die Aktivität der Catechol-Oxidase leicht. Die Wirkung der MRP auf diese Enzyme wird auf zwei Effekte zurückgeführt, zum einen können sie infolge ihrer reduzierenden Eigenschaften die in der Anfangsphase entstehenden enzymatischen Oxidationsprodukte reduzieren und so die Bildung von gefärbten Verbindungen vermindern und zum anderen werden durch die Fähigkeit der MRP, Metall-Komplexe mit Zn-, Cu- und Fe-Ionen zu bilden, die Enzymaktivitäten abgesenkt.

Enzyme zum Nachweis von Maillard-Reaktionsprodukten

In der Lebensmittelchemie als auch in der medizinischen Chemie wird aus verschiedenen Gründen nach neuen analytischen Methoden zur Erfassung typischer MRP gesucht. Die für das Anfangsstadium der Maillard-Reaktion charakteristischen Amadori-Verbindungen können quantitativ durch Fructosylamin-Oxidase (Fructosylamin: Sauerstoff-Oxidoreductase) bestimmt werden, die sich aus *Pseudomonas aeruginosa* (29), *Corynebacterium sp. 2-4-1* (38) und *Aspergillus sp. 1005* (39) isolieren ließen. Es handelt sich dabei um Flavoproteine, die z.B. Fructosylglycin unter Sauerstoffverbrauch und Wasserstoffperoxidbildung zu Glucoson und Glycin oxidieren (38, 39). Diese Enzyme eignen sich zum schnellen Nachweis von Amadori-Verbindungen, die D-Fructose als Zuckerkomponente enthalten. Gegenüber Fructosyl- α -L-Aminosäuren zeigt Fructosylamin-Oxidase aus *Corynebacterium* und *Aspergillus* die höchste Aktivität. Die Spezifität der Enzyme unterscheidet sich nach ihrer Herkunft.

Neben diesen enzymatischen Nachweisen der Amadori-Verbindungen können MRP auch mit Hilfe der ELISA-Technik (Enzyme linked immuno sorbent assay) analysiert werden. So erkennt ein von Curtiss und Witzum (17) isolierter, monoklonaler Antikörper glycosyliertes Protein. Mit diesem Antikörper wurden die für die Maillard-Reaktion (Bräunung) wichtigen ϵ -Lysin-funktionalisierten Proteine spezifisch und quantitativ detektiert.

Zum spezifischen Nachweis von Protein-Lactose-Maillardkomplexen in Milchprodukten wurden ebenfalls monoklonale Antikörper eingesetzt, die mit MRP aus Lactose und verschiedenen Proteinen reagieren, aber Bräunungsprodukte mit anderen reduzierenden Zucker nicht akzeptieren (48).

Aber nicht nur glycosylierte Proteine können über die ELISA-Tests sicher nachgewiesen werden, auch *in vivo* gebildetes Lysylpyrralin (2-Formyl-5 (hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin) wurde unter Anwendung alkalischer Phosphatase (35) bestimmt. Ein von Gempiel et al. (28) entwickeltes ELISA eignet sich zur Analyse von Carboxymethyllysine-modifizierten Proteinen.

Schlußfolgerungen

Trotz umfangreicher Untersuchungen und publizierter Ergebnisse fällt es derzeit nicht leicht, die *in-vitro*- und *in-vivo*-Beeinflussung von Enzymreaktion durch Maillard-Reaktionsprodukte zu verallgemeinern – zu mannigfaltig sind die Reaktionswege und Reaktionsprodukte der nichtenzymatischen Bräunung (Maillard-Reaktion) und deren Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen im biologischen System.

Die durch die Maillard-Reaktion ausgelösten Veränderungen an den Proteinen sind infolge der hohen Reaktivität der Intermediate der Bräunung nur schwer zu charakterisieren und noch nicht genügend untersucht. Das schließt zugleich die Bildung von vernetzten Proteinen ein, deren Verfügbarkeit und Abbaubarkeit noch viele Fragen offen läßt. Auch die *in-vivo*-Bildung von cross links ist ein aktuell bearbeitetes Thema, von dem weitere Erkenntnisse zur Beeinflussung enzymkatalysierter Reaktionen zu erwarten sind. Zu diesem Problembereich gehören ebenso die bisher wenig beachteten Wechselwirkungen von Aminokomponenten mit polymeren Kohlenhydraten und deren Abbaubarkeit durch Amylasen. Damit sind nur zwei Fragen künftiger Arbeiten angesprochen, deren Lösung in der klaren Charakterisierung der durch Maillard-Reaktion veränderten Substrate (Proteine, Polysaccharide) und den Untersuchungen der Enzymaktivitäten gegenüber diesen Substraten besteht. An dieser Stelle muß noch angemerkt werden, daß nur bei genauer Kenntnis der Struktur und Reaktivität der hochmolekularen Melanoidine exakte Aussagen zum ernährungsphysiologischen Verhalten solcher Bräunungsprodukte möglich sind.

Auf dem Gebiet der Resorption von MRP liegen ebenfalls umfangreiche Untersuchungen vor. Einzelne Amdori-Verbindungen, glycosylierte Proteine und Melanoidine zeigen aber in Abhängigkeit von ihren Edukten und Herstellungsbedingungen ein sehr differenziertes Resorptionsverhalten. Durch systematische Arbeiten mit definierten MRP und/oder markierten Modellsubstraten sollte ein weiterer Wissenszuwachs zu erreichen sein.

Aus gegenwärtiger Sicht ist das Reaktionsverhalten von maillardanalogen Substraten, wie den hochreaktiven Dicarbonylverbindungen (Ketoaldehyde), im Organismus

noch nicht ausreichend bekannt. Das betrifft sowohl ihre Genese als auch deren Abbau durch Enzymreaktionen. Inwieweit hier durch die Intermediate der Maillard-Reaktion und/oder oxidative Abbauewege unter Beteiligung von Sauerstoffspezies eine Schädigung von körpereigenen Proteinen verursacht wird, ist bereits Gegenstand der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet. Ebenso aktuell sind schließlich damit verbundene Arbeiten, die sich mit der Suche nach den Möglichkeiten der Hemmung der Maillard-Reaktion *in vivo* beschäftigen.

Literatur

- Adrian J (1974) Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. In: world reviews of nutrition and dietetics. Basel, Karger, Vol 19, pp 71–122
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of N^ε-Carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261:4889–4894
- Andrieux C, Saquet E, Guéguen L (1980) Interactions between Maillard's reaction products, the microflora of the digestive tract and mineral metabolism. *Repro Nutr Dévelop* 20:1061–1069
- Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibaschi H, Oikawa K, Taniguchi N (1987) Glycation and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase: Identification of the *in vitro* glycated sites. *J Biol Chem* 262:16969–16977
- Bisse E, Berger W, Fluckiger R (1982) Quantitation of glycosylated hemoglobin. Elimination of labile glycohemoglobin during sample hemolysis at pH 5. *Diabetes* 31:630–633
- Brownlee M, Cerami A (1981) The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann Rev Biochem* 50:385–432
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1983) Nonenzymatic glycosylation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes* 32:680–684
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney T, Ulrich P, Cerami A (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking. *Science* 232:1629–1632
- Bunn HF (1981a) Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes* 30:613–617
- Bunn HF, Higgins PJ (1981b) Reaction of monosaccharide with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 213:222–224
- Caer D, Baniel A, Subirade M, Guéguen J, Colas B (1990) Preparation and physicochemical properties of glycosylated derivatives of pea legumin. *J Agric Food Chem* 38:1700–1706
- Caer D, Colas B (1993) Protease susceptibility and amino group accessibility to trinitro-benzenesulfonic acid of legumin during its glycosylation. *J Agric Food Chem* 41:544–546
- Cerami A (1994) The Maillard Reaction *in vivo*. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 1–10
- Chen CH-J, Cerami A (1993) Mechanism of inhibition of advanced glycosylation by aminoguanidine *in vitro*. *J Carbohydr Chem* 12:731–742
- Chiou SH, Chylack LT Jr, Tung WH, Bunn HF (1981) Nonenzymatic glycosylation of bovine lens crystallins: effect of aging. *J Biol Chem* 256:5176–5180
- Chung SY, Swaisgood HE, Catignani GL (1986) Effects of alkali treatment and heat treatment in the presence of fructose on digestibility of food proteins as determined by an immobilized enzyme assay. *J Agric Food Chem* 34:579–584
- Curtiss LK, Witztum JL (1983) A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. *J Clin Invest* 72:1427–1438
- Dolhofer R, Siess EA, Wieland OH (1982) Inactivation of bovine kidney β -N-Acetyl-D-glucosaminidase by nonenzymatic glycosylation. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 363:1427–1436
- Dyer DG, Blackledge JA, Katz BM, Hull CJ, Adkisson HD, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW (1991) The Maillard reaction *in vivo*. *Z Ernährungswiss* 30:29–45
- Erbersdobler HF, Alfke F, Schlecht C, von Wangenheim B (1977) Aufnahme und Elimination von Fructoselysin nach Verzehr hitzegeschädigter Proteine. *Ernährungs-Umschau* 24:375–376
- Erbersdobler HF, Brandt A, Scharrer E, von Wangenheim B (1981) Transport and metabolism studies with fructose amino acids. *Prog Fd Nutr Sci* 5:257–263
- Erbersdobler HF, Lohmann M, Buhl K (1991) Utilization of early Maillard reaction products by humans. In: Friedman M (ed) Nutritional and toxicological consequences of food processing. Advances in experimental medicine and biology, Vol 289, Plenum Press, pp 363–370
- Finot P-A (1982) Nonenzymatic browning products: physiologic effects and metabolic transit in relation to chemical structure. a review. *Diabetes* 31, Suppl. 3:22–28
- Finot P-A, Furniss DE (1989) Metabolic transit and toxicity of Maillard reaction products. In: The Maillard Reaction in Aging. Diabetes and Nutrition, pp 343–358
- Finot P-A (1990) Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products (MRP). In: The Maillard Reaction, Adv. Life Sciences, Birkhäuser Verlag, pp 259–272
- Garlick RL, Mazer JS, Chylack LT Jr, Tung WH, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycation of human lens crystallin: effect of aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 74:1742–1749
- Garlick RL, Bunn HF, Spiro FG (1988) Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources. *Diabetes* 37:1144–1150
- Gempfel KE, Wagner EM, Schleicher ED (1994) Production and characterization of antibodies against Carboxymethyllysine-modified proteins. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 392–396
- Gerhardinger C, Marion SM, Monnier VM (1994) Enzymatic degradation of glycated- ϵ -aminocaproic acid and glycated-lysine by a mucoid soil strain of *ps. aeruginosa*. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The royal society of chemistry, p 422

30. Glomb MA, Monnier VM (1995) Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the maillard-reaction. *J Biol Chem* 270:10017–10026
31. Gomyo T, Miura M (1986) Effect of melanoidin on digestion and absorption of disaccharides in the small intestine of rats. In: Fujimaki M, Namiki M, Kato H (eds), Amino-carbonyl reactions in food and biological system *Dev Food. Science* 13:549–558,
32. Hansen LP, Johnson PH (1976) Heat-moisture effects on wheat flour. 2: an evaluation study of heat-processing effects on flour proteins by digestive enzymes-pepsin, trypsin and carboxypeptidase B. *Cereal Chem* 53:656–670
33. Hansen LP, Millington RJ (1979) Blockage of protein enzymatic digestion (carboxypeptidase-B) by heat-induced sugar-lysine reactions. *J Food Science* 44:1173–1177
34. Hata F (1988) Human alpha-keto-aldehyde dehydrogenase and the possible regulation of the Maillard reaction. *Kobe Daigaku Igakubu Kiyo* 49:427–434
35. Hayase F, Nagaraj RH, Miyata M, Njoroge FG, Monnier VM (1989) Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard-reaction *in vivo*. *J Biol Chem* 263:3758–3764
36. Hiramoto K, Kido K, Kikugawa K (1994) DNA Breaking by Maillard Products of Glucose-Amino Acid Mixtures Formed in an Aqueous System. *J Agric Food Chem* 42:689–694
37. Homma S, Fujimaki M (1981) In: Eriksson (ed) *Progress in Food and Nutrition Science*, Pergamon Press, Oxford, pp 209–216
38. Horiuchi T, Kurokawa T, Saito N (1989) Purification and properties of fructosyl-amino acid oxidase from *Corynebacterium* sp. 2-4-1. *Agric Biol Chem* 53:103–110
39. Horiuchi T, Kurokawa T (1991) Purification and properties of fructosylamine oxidase from *Aspergillus* sp. 1005. *Agric Biol Chem* 55:333–338
40. Jellum E (1968) Metabolism of the ketoaldehyde 2-keto-3-deoxyglucose. *Biochem Biophys Acta* 165:357–363
41. Jerums G, Soulis-Liparota T, Panagiotopoulos S, Cooper ME (1994) Amino-guanidine as an inhibitor of the Maillard reaction. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) *Maillard-reactions in chemistry, food and health*. The Royal Society of Chemistry, pp 319–324
42. Kato H, Cho RK, Okitani A, Hayase F (1987) Responsibility of 3-deoxyglucosone for the glucose-induced polymerization of proteins, *Agric Biol Chem* 51:683–689
43. Kato H, Hayase F, Shin DB, Oimoni M, Baba S (1989) 3-Deoxyglucosone, an intermediate of the Maillard reaction, *Prog Clin Biol Res* 304:69–84
44. Kato H, Liang Z-Q, Nishimura T, Hayase F (1988) 3-Deoxyglucosone-metabolizing enzymes in plants: NADPH-dependent 2-oxaldehyde reductase of parsley. *Agric Biol Chem* 52:2675–2677
45. Kato H, Liang ZQ, Nishimura T, Shin HS, Hayase F (1989) 2-Oxoaldehyde-metabolizing enzymes in animal and plant tissues. In: Maillard React. J. 4th, Meeting Date (ed) Finot, Pierre Andre. Birkhauser:Basel, Switz, pp 379–384
46. Kato H, Miyauchi Y, Nishimura T, Liang Z-Q (1988) Purification and partial characterization of NADH-dependent methylglyoxal-reducing enzyme from porcine liver. *Agric Biol Chem* 52:2641–2642
47. Kato H, Shin DB, Hayase F (1987) 3-Desoxyglucosone crosslinks proteins under physiological conditions. *Agric Biol Chem* 51:2009–2011
48. Kato Y, Matsuda T, Kato N, Nakamura R (1994) Analysis of lactose-protein Maillard complexes in commercial milk products by using specific monoclonal antibodies. In: *Maillard-reactions in chemistry, food and health*. (ed) Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW; The Royal Society of Chemistry, pp 188–194
49. Kawasaki N, Tanimoto T, Tanaka A (1989) Characterization of aldose reductase and aldehyde reductase from rat testis. *Biochim Biophys Acta* 996:30–36
50. Knecht KJ, Feather MS, Baynes JW (1992) Detection of 3-deoxyfructose and 3-deoxy-glucosone in human urine and plasma: evidence for intermediate stages of the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys* 294:130–137
51. Koenig RJ, Arango DC, Cerami A (1976) Increased hemoglobin A_{1c} in diabetic mice. *Diabetes* 25:1–5
52. Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A (1977) Structure of carbohydrate of hemoglobin A_{1c}. *J Biol Chem* 252:2992–2997
53. Kohn RR, Schneider SL (1982) Glycosilation human collagen. *Diabetes* 31:47–51
54. Kolarova N, Trgina R, Linek K, Farkas V (1995) Inhibitory effect of diglucosylamines on two β -glucosidases. *Carbohydr Res* 273:109–114
55. Kroh LW, Schumacher D (1996) Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amyolytische Enzyme. 2. Zum enzymatischen Abbau von thermisch behandelten α -Glucanen mit und ohne Aminoskomponente. *Z Lebensm Unters Forsch*, in press
56. Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien J, Baynes JW (1994) "Maillard Reaction in Chemistry, Food and Health" Proceedings of the Fifth International Symposium on the Maillard Reaction, The Royal Society of Chemistry
57. Ledl F, Schleicher E (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew Chem* 102:597–525
58. Lee AT, Cerami A (1987) The formation of reactive intermediate of glucose-6-phosphate and lysine capable of rapidly reacting with DNA. *Mutation Res* 179:151–158
59. Lee CM, Lee TC, Chichester CO (1974) Physiological consequences of browned food products. In: *Prot IV Int Congr Sci Food Technol Vol 1*, pp 587–603
60. Lee CM, Lee TC, Chichester CO; (1977) The Effect of Maillard reaction products on disaccharidase in the rat. *J Agric Food Chem* 25:775–778
61. Lee H, Sen LC, Chifford AJ, Whitaker JR, Feeney RE (1979) Preparation and nutrition properties of caseins covalently modified with sugars, reductive alkylation of lysine with glucose, fructose or lactose. *J Agric Food Chem* 27:1094–1098
62. Lee K, Erbersdobler HF (1994) Balance experiments on human volunteers with ϵ -Fructose-lysine (FL) and Lysinoalanine (LAL). In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) *Maillard-reactions in chemistry, food and health*. The Royal Society of Chemistry, pp 358–363
63. Lee TC, Pintauro SJ, Chichester CO (1982) Nutritional and toxicologic effect of nonenzymatic Maillard browning. *Diabetes* 31:37–46
64. Liang ZQ, Hayase F, Kato H (1991) Purification and characterization of NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase from porcine liver. A self-defense enzyme preventing the advanced stage of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 197:373–379
65. Liang ZQ, Hayase F, Kato H (1992) Aldose reductase from porcine liver metabolizing 3-deoxyglucosone, a Maillard reaction intermediate. *Biosci Biotechn Biochem* 56:1074–1078
66. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R (1992) Hemoglobin-AGE: A circulating marker of advanced glycosylation. *Science* 258:651–653
67. Miura M, Gomyo T (1988) Effect of melanoidin on cholesterol in plasma, liver and feces in rats fed a high-cholesterol diet, *Agric Biol Chem* 52:2403–2408
68. Monnier VM, Cerami A (1981) Non-enzymatic browning *in vivo*: possible process for aging of long-living proteins *Science* 211:491–494

69. Monnier VM, Sell DR, Magaraj RH, Odetti P (1993) Maillard reaction and oxidative stress are interrelated stochastic mechanism of aging. In: Free radicals: From basic science of medicine. (ed) Poli G, Albano E, Dianzani MU, Birkhäuser Verlag Basel/Schweiz, pp 157–168
70. Morita J, Kashimura N (1991) The Maillard reaction of DNA with D-fructose 6-phosphate. *Agric Biol Chem* 55:1359–1366
71. Nair BM, Oste R, Asp NG, Pernemalm PA (1981) Absorption and distribution of a C-14-glucose lysine reaction in the rat. *Prog Fd Nutr Sci* 5:217–222
72. Nicoli MC, Elizalde BE, Pitotti A, Lerici CR (1991) Effects of sugars and Maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *J Food Biochem* 15:169–184
73. Oimomi M, Hata F, Igaki N, Masuta S, Nakamichi T, Maeda Y, Nishimoto S, Matsumoto S, Baba S (1988) Enzyme inhibition of the advanced-stage of the Maillard reaction, Rinsho Kagaku (Nippon Rinsho Kagakkai) 17:91–93
74. Ortwerth BJ, Speaker JA, Prabhakaram M (1994) The aldose reductase activity in lens extracts protects, but does not prevent, the glycation of lens proteins by L-Threose. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 292–299
75. Öste R, Sjödin P (1984) Effect of Maillard reaction products on protein digestion. *in vivo* studies on rats. *J Nutr* 114:2228–2234
76. Öste R, Sjödin P, Jägerstad M, Björck I, Dahlqvist A (1985) Effect of Maillard reaction products on carbohydrate utilization-studies *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem* 16:37–47
77. Öste RE, Dahlqvist SH, Norén O, Miller R (1986) Effect of Maillard reaction products on protein digestion. *in vitro* studies. *J Agric Food Chem* 34:355–358
78. Öste RE, Miller R, Noren O (1987) Effect of Maillard reaction products on protein digestion. studies on pure compounds. *J Agric Food Chem* 35:938–942
79. Pintauro SJ, Lee T-C, Chichester CO (1983) Nutritional and toxicological effects of Maillard browned protein ingestion in the rat. In: Waller GR, Feather MS (eds). The Maillard reaction in foods and nutrition. ASC symp. 215, pp 467–483
80. Pitotti A, Bo AD, Stecchini M (1994) Effect of Maillard reaction products on protease activity *in vitro*. *J Food Quality* 17:211–220
81. Rehner G, Walter T (1991) Wirkung von Maillard-Produkten und Lysin-alanin auf die Bioverfügbarkeit von Eisen, Kupfer und Zink. *Z Ernährungswiss* 30:50–55
82. Schleicher E (1991) Die Bedeutung der Maillard-Reaktion in der menschlichen Physiologie. *Z Ernährungswiss* 30:18–28
83. Schleicher E, Deufel T, Wieland OH (1981) Nonenzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated ϵ -lysine glycosylated low density lipoproteins in diabetic patients. *FEBS-Lett* 129:1–4
84. Schleicher E, Scheller L, Wieland OH (1981) Quantitation of lysine-bound glucose of normal and diabetic erythrocyte membrane by HPLC analysis of furosine. *Biophys Biochem Res Comm* 99:1011–1019
85. Schleicher E, Wieland OH (1981) Specific quantitation by HPLC analysis of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J Clin Chem Clin Biochem* 27:81–87
86. Schneeman BO, Dunaif G (1984) Nutritional and gastrointestinal response to heated nonfat dry milk. *J Agric Food Chem* 32:477–480
87. Schumacher D, Kroh LW (1994) Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amylytische Enzyme 1. Zur reversiblen Inhibierung von α - und Glucoamylase sowie α -Glucosidase durch Oligosaccharid-Amadori-Verbindungen. *Z Lebensm Unters Forsch* 199:270–274
88. Schumacher D, Hirsch D, Cämmerer B, Kroh LW (1996) Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amylytische Enzyme 3. Zur Inhibierung von α - und Glucoamylase sowie α -Glucosidase durch thermisch behandelte α -Glucose und Melanoidine. *Z Lebensm Unters Forsch*, in press
89. Schumacher D, Hirsch D, Kroh LW (1995) Zum enzymatischen Abbau von thermisch behandelten α -Glucanen und Maillard-Reaktionsprodukten. In: Kurzreferat 25. GDCh-Hauptversammlung, p 321
90. Sell DR, Monnier VM (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem* 264:21597–21602
91. Sgarbieri VC, Amaya J, Tanaka M, Chichester CO (1973) Nutritional consequences of the Maillard-Reaction. Amino acid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat. *J Nutr* 103:657–663
92. Shalkai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259:3812–3817
93. Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF (1980) Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin. *J Biol Chem* 255:3120–3127
94. Shibamoto T (1989) Genotoxicity testing of Maillard reaction products. In: The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition, pp 359–376
95. Shin DB, Hayase F, Kato H (1988) Polymerization of proteins caused by reaction with sugars and the formation of 3-desoxyglucosone under physiological conditions. *Agric Biol Chem* 52:1451–1458
96. Shinohara K, Jahan N, Tanaka M, Yamamoto K, Wu R-T, Murakami H, Ohara H (1989) Formation of mutagens by amino-carbonyl reactions. *Mutat Res* 122:279–286
97. Szwergold JS, Kappler F, Brown TR (1990) Identification of fructose-3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247:451–454
98. Takahadshi M, Fujii J, Teshima T, Suzuki K, Shiba T, Taniguchi N (1994) Glycation and inactivation of rat aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 427
99. Tan BK, Harris ND (1995) Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. *Food Chem* 53:267–273
100. Tanaka M, Lee TC, Chichester CO (1975) Nutritional consequences of the Maillard reaction. The absorption of fructose-L-tryptophan in the large intestine of the rat. *J Nutr* 105:989–994
101. Taniguchi N, Ookawara T, Ohno H (1994) Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) by glycation reaction: implication of reactive oxygen species. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The royal society of chemistry, pp 217–221
102. Uhde WJ, Macholz R (1986) Mutagene Substanzen in Aminosäure- und Proteinpyrolysaten sowie hitzebehandelten Lebensmitteln. *Nahrung* 30:59–73
103. Vander Jagt DL (1994) Ketoaldehyde detoxification enzymes and protection against the Maillard-Reaktion. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 314–318
104. Walton DJ, Kubiseski, Munro KA, Flynn TG, Feather MS (1994) Aldehyde reductase and aldose reductase may act as scavengers of aldoses formed from glycated proteins. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, Minnesota p 435

105. Waniska RD, Kinsella JE (1984) Enzymatic hydrolysis of maltosyl and glucosaminyl derivatives of β -lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 32:1042–1044
106. Weisburger JH (1994) Specific Maillard Reactions yield powerful mutagens and carcinogens. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 335–340
107. Witztum JL, Mahoney EM, Banks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D (1982) Nonenzymatic glucosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 31:382–391
108. Zyzak DV, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Litchfield JE, Wells-Knecht MC, Fu MX, Feather MS, Baynes JW (1994) Pathways of the Maillard Reaction *in vitro* and *in vivo*. In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien, Baynes JW (eds) Maillard-reactions in chemistry, food and health. The Royal Society of Chemistry, pp 274–280