

Charakterisierung von Isothiocyanatmodifiziertem α-Lactalbumin Auswirkungen auf die molekulare Struktur und biologische Eigenschaften des Proteins

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Doktor rerum naturalium)

> vorgelegt von Jenny Spöttel

Fachbereich Chemie Institut der Lebensmittelchemie Universität Hamburg 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2018 bis August 2021 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter der Dissertation:

Gutachter der Disputation:

Datum der Disputation: Datum der Druckfreigabe: Prof. Dr. Sascha Rohn Prof. Dr. Wolfgang Maison

Prof. Dr. Ralph Holl Prof. Dr. Sebastian Wicha Prof. Dr. Sascha Rohn

25.03.2022 09.05.2022

Publikationsliste

Beiträge zur kumulativen Dissertation

<u>Spöttel, J.</u>, Brockelt, J., Badekow, S., & Rohn, S. Immunological Analysis of Isothiocyanate-Modified α-Lactalbumin Using High-Performance Thin Layer Chromatography. *Molecules*. **2021**, *26*, 1842. https://doi.org/10.3390/molecules26071842

Badekow, S., Treblin, M., <u>Spöttel, J.</u>, & Rohn, S. Benzyl isothiocyanate-modified α-lactalbumin - Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography for analyzing modified peptides. *Journal of chromatography B.* **2021**, *1181*, 122937. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122937

<u>Spöttel, J.</u>; Brockelt, J.; Falke, S.; Rohn, S. Characterization of Conjugates between α-Lactalbumin and Benzyl Isothiocyanate – Effects on Molecular Structure and Proteolytic Stability. *Molecules.* **2021**, *26*, 6247. https://doi.org/10.3390/molecules26206247

Weitere Publikationen in Fachzeitschriften

Tran, H., Stetter, R., Herz, C., <u>Spöttel, J.</u>, Krell, M., Hanschen, F. S., Schreiner, M., Rohn, S., Behrens, M., & Lamy, E. Allyl Isothiocyanate: A TAS2R38 Receptor-Dependent Immune Modulator at the Interface Between Personalized Medicine and Nutrition. *Frontiers in Immunology*. **2021**, *12*, 669005. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669005

Posterpräsentationen

<u>Spöttel, J.</u>, Brockelt, J., Rohn, S. Untersuchung der Struktur und Eigenschaften von Isothiocyanat-modifiziertem α -Lactalbumin. Jahrestagung des Regionalverbands Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, **2020**, Berlin.

<u>Spöttel, J.</u>, Brauer, S., Rohn, S. Identifizierung und Charakterisierung von Isothiocyanat-Proteinaddukten. Deutscher Lebensmittelchemikertag, **2019**, Dresden. (Auszeichnung: Posterpreis des 48. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2019)

Kühn, C., <u>Spöttel, J.</u>, Kupke, F., Baldermann, S., Klopsch, R., Lamy, E., Hornemann, S., Pfeiffer, A.F.H., Schreiner, M., Hanschen, F.S., Rohn, S. Excretion Pathways of Benzyl Glucosinolate in Humans after Consumption of Indian cress (*Tropaeolum majus* L.). Deutscher Lebensmittelchemikertag, **2018**, Berlin.

Inhaltsverzeichnis

Ρ	Publikationsliste I					
Ir	nhaltsverzeichnis	II				
А	Abkürzungsverzeichnis IV					
1	Zusammenfassung1					
2	Abstract4					
3	Einleitung					
4 Theoretischer Hintergrund						
	4.1 Proteine – Funktionen und Strukturen					
	4.1.1 Proteine als Lebensmittelallergene	9				
	4.2 Molkenproteine	12				
	4.2.1 α-Lactalbumin	13				
	4.3 Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte					
	4.3.1 Vorkommen und Funktionen in der Pflanze					
	4.3.2 Struktur und Biosynthese	19				
	4.3.3 Enzymatischer Abbau	20				
	4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23				
	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27				
	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27				
	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27				
	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29				
	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31				
5	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33				
5 6	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35				
5 6	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35 36				
5 6	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35 36 36 57				
5 6	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35 36 57 66				
5 6 7	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35 36 57 66 98				
5 6 7 8	 4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate menschlichen Ernährung. 4.4 Isothiocyanate. 4.4 Isothiocyanate. 4.4.1 Metabolisierung und Ausscheidung. 4.4.2 Bioverfügbarkeit 4.5 Wechselwirkungen von Isothiocyanaten mit Proteinen. 4.5.1 Bedeutung von Proteinderivaten im Lebensmittel. Problemstellung und Zielsetzung. Kumulativer Teil der Dissertation. 6.1 Publikation I. 6.2 Publikation II. 6.3 Publikation III. Schlussfolgerung. 	in der 23 27 27 27 28 29 31 33 35 36 57 66 98 113				

10) /	An	hang	147
	10.	1	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	147
Ei	dess	ssta	attliche Versicherung	149

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
α-LA	α -Lactalbumin
AITC	Allylisothiocyanat
ANS	Ammonium-8-anilinonaphthalin-1-sulfonat
ARE	antioxidant response element
β-LG	β-Lactoglobulin
BAMLET	bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells
BITC	Benzylisothiocyanat
Bos d	Bos domesticus
CD	Zirkulardichriosmus (engl. <i>circular dichroism</i>)
CMA	Kuhmilchallergie (engl. cow's milk allergy)
CoA	Coenzym A
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
E. coli	Escherichia coli
EG	Europäische Gemeinschaft
Engl.	Englisch
ESI	Elektrosprayionisation (engl. <i>electrospray ionization</i>)
ESM	epithio specifier modifier protein
ESP	epithio specifier protein
Fab	antigenbindende Fragment (engl. fragment antigen binding)
Fc	kristallisierbare Fragment (engl. crystallisable fragment)
FDA	Food and Drug Administration
GLS	Glucosinolate
GSH	Glutathion
Н	α -Helix
h	3 ₁₀ Helices
HAMLET	human a-lactalbumin made lethal to tumor cells
HPLC	Hochleistungflüssigkeitschromatographie
	(engl.: high-performance liquid chromatography)
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
	(engl.: high-performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IF	Immunfärbung
Ig	Immunoglobulin
ITC	Isothiocyanat
kDa	Kilodalton
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1

LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantification</i>)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MG	molten globule
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NADPH	${ m Nicotinamidaden}$ indinukleotid phosphat
Nrf2	nuclear factor erythroid related factor 2
NSP	nitrile specifier protein
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
pН	Potential des Wasserstoffs (lat. pondus hydrogenii)
R_{f}	Retentionsfaktor (engl.: retention factor)
RP	Umkehrphase (engl.: <i>reversed phase</i>)
RT	Retentionszeit
S	β -Faltblättern
TFP	thiocyanate forming protein
UDP	Uridyldiphosphat
UniProt	Universelle Protein Databank
	(engl. universal protein database)
UV	Ultraviolet
VO	Verordnung

А	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
Ε	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
Н	His	Histidin
Ι	Ile	Isoleucin
К	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
Μ	Met	Methionin
Ν	Asn	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
Т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen der Aminosäuren als Ein- und Dreibuchstabencode

1 Zusammenfassung

In komplexen Lebensmittelmatrices können ungerichtete Reaktionen zwischen bioaktiven sekundären Pflanzenmetaboliten, wie den Isothiocyanaten, und Lebensmittelproteinen zu unerwünschten und erwünschten Änderungen der dreidimensionalen Struktur, der Eigenschaften und der Funktionalitäten der Proteine führen. Aus lebensmittelchemischer und -technologischer Sicht ist eine umfassende Grundlagenforschung erforderlich, um ein besseres Verständnis der Folgen kovalenter Proteinmodifikationen zu erlangen.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Wechselwirkung zwischen Benzylisothiocyanat (BITC), einem bioaktiven Metaboliten aus der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.), und dem Molkenprotein α -Lactalbumin (α -LA) auf die molekulare Struktur und auf die biologischen Eigenschaften des Molkenproteins, hier im Speziellen die Verdaubarkeit und die Antigenität, untersucht.

Nach erfolgreicher Synthese der BITC-Proteinkonjugate erfolgte die Quantifizierung der Reaktion durch die spektrophotometrische Bestimmung der frei verfügbaren Aminogruppen der unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteinderivate unter Einsatz von o-Phthaldialdehyd. Mit zunehmender Menge an gebundenem BITC wurde eine Abnahme der freien Aminogruppen festgestellt, was auf die erfolgreiche Synthese von irreversiblen Thioharnstoffderivaten und einen zunehmenden Grad der BITC-Modifikation von α -LA hindeutet. Schließlich wurde die molekulare Struktur, die Oberflächenhydrophobizität, das Aggregationsverhalten, der hydrodynamische Radius sowie die biologischen Eigenschaften, wie die Verdaubarkeit und Antigenität, in Abhängigkeit des Modifikationsgrads bestimmt.

Bei der Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der α -LA-Derivate wurde als Folge der kovalenten Modifikation mit BITC eine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins nachgewiesen. Mit zunehmendem Modifikationsgrad konnte eine Abnahme der α -helicalen Strukturanteile von 29 % auf 17 %, bei gleichzeitiger Zunahme der Anteile der β -Faltblattstrukturen von 12 % auf 28 % dokumentiert werden. Darüber hinaus wurde die temperaturinduzierte Konformationsänderung von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA im Bereich von 20 bis 80 °C untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Modifikationsgrad die Unterschiede der Zusammensetzung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Temperatur immer kleiner wurden. Weiterhin konnte mit steigender Menge an gebundenem BITC eine Zunahme der Oberflächenhydrophobizität und des hydrodynamischen Radius von 1.8 nm auf maximal 89.4 nm festgestellt werden. Die Addition des hydrophoben Liganden BITC an die polaren Aminogruppen der Proteinseitenketten hatte eine Abnahme der Polarität, ein Verlust der Ladung und damit eine Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität zur Folge. Die BITC-induzierte Umstrukturierung könnte zu einer verstärkten Freilegung hydrophober Gruppen an die Proteinoberflächen führen, was wiederum die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen mehreren Proteinmolekülen begünstigen und somit die Zunahme des hydrodynamischen Radius und die Bildung von Aggregaten bei den Proteinderivaten erklären könnte.

Schließlich galt es, den Einfluss der kovalenten Bindung von BITC auf die Proteinstruktur und auf die Epitopstrukturen in einen Zusammenhang zu bringen und daraus unmittelbare Konsequenzen für die antigenen Eigenschaften des Molkenproteins abzuleiten. Die immunologische Detektion nach vorangeschalteter Hochleistungsdünnschichtchromatographie konnte erfolgreich zur Abschätzung der Antigenität der unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteine eingesetzt werden. Da die molekulare Grundlage für ein verändertes antigenes Potential in der Änderung von Epitopstrukturen liegt, kann angenommen werden, dass durch die BITC-induzierte Änderung der dreidimensionalen Proteinstruktur vermutlich Epitope inaktiviert, blockiert oder zerstört, gleichzeitig aber auch die zuvor im Inneren des Proteins verborgene Epitope freigelegt und/oder neue Epitope gebildet wurden, was in Summe zu einer Erhöhung der antigenen Aktivität der BITC-Protenderivate führte. Weiterhin konnte mit Hilfe der spezifischen Antikörper die Restantigenität von proteolytisch verdauten unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteinen erfasst werden. Trotz der Proteinmodifikation und der enzymatischen Hydrolyse durch Trypsin blieb eine gewisse, aber reduzierte Restantigenität in Form von kurzen Peptidfragmenten erhalten, was bedeutet, dass einige der Epitope immunologisch aktiv blieben.

Darüber hinaus wurde das proteolytische Abbauverhalten von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA durch Trypsin untersucht. Mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen Hochleistungsdünnschichtchromatographie konnte eine qualitative Untersuchung zur Differenzierung von unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteinhydrolysaten auf Grundlage des visuellen Vergleichs der erhaltenen Chromatogramme durchgeführt werden. Durch den zweidimensionalen Ansatz konnte eine verbesserte Trennung des komplexen Peptidgemisches und somit eine optimierte Differenzierung der Proteinmodifikationen erzielt werden. Die Analyse mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie mit nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie ermöglichte eine Identifizierung der unmodifizierten und BITC-modifizierten Peptide. Die Untersuchungsergebnisse der tryptischen Hydrolyse von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA zeigten, dass die Bindung von BITC an die Aminogruppen der Lysinseitenketten die tryptischen Proteolysestellen sterisch blockierten. Infolge der partiellen Hemmung der enzymatischen Hydrolyse der BITC-Proteinderivate durch Trypsin konnten elongierte, modifizierte Peptide nachgewiesen werden. Mit zunehmender Menge an gebundenem BITC wurde eine sukzessive Erhöhung der Anzahl an modifizierten (elognierten) Peptiden beobachtet. Für zwei der BITC-modifizierten Peptide gelang es sogar, den

genauen Reaktionsort, also die modifizierten Aminosäuren (K32 und K113), in der Primärsequenz von α -LA zu identifizieren.

Die Ergebnisse der beiden chromatographischen Trennmethoden deuteten darauf hin, dass die Addition des hydrophoben Liganden BITC an die polaren Aminogruppen der Lysinseitenketten zu einer geringeren Polarität und damit zu einem veränderten chromatographischen Verhalten der Peptide beitrug. Die geringere Polarität der BITC-modifizierten Peptide steht im Einklang mit den fluorimetrischen Untersuchungsergebnissen, die mit zunehmenden Modifikationsgrad eine erhöhte Oberflächhydrophobizität verzeichneten.

2 Abstract

In complex food matrices, undirected reactions between bioactive secondary plant metabolites, such as isothiocyanates, and food proteins can lead to undesirable and desirable changes in the three-dimensional structure, properties and functionalities of the proteins. From a food chemistry and technology perspective, extensive fundamental research is required to gain a better understanding of the consequences of covalent protein modifications.

Therefore, the influence of the interaction between benzyl isothiocyanate (BITC), a bioactive metabolite from garden cress (*Lepidium sativum* L.), and the whey protein α -lactalbumin (α -LA) on the molecular structure and on the biological properties of the whey protein, in particular digestibility and antigenicity, was investigated in the present work.

Following successful synthesis of the BITC-protein conjugates, quantification of the reaction was performed by spectrophotometric determination of the free available amino groups of the unmodified and BITC-modified protein derivatives using *o*-phthaldialdehyde. With increasing amounts of bound BITC, a decrease in the amount of free amino groups was observed, suggesting the successful synthesis of irreversible thiourea derivatives and an increasing degree of BITC modification of α -LA. Finally, the molecular structure, surface hydrophobicity, aggregation behavior, hydrodynamic radius, and biological properties, such as digestibility and antigenicity, were determined as a function of the degree of modification.

Examination of the three-dimensional structure of the α -LA derivatives revealed a change in the secondary structure of the protein as a consequence of covalent modification with BITC. With increasing degree of modification, a decrease in the proportion of α -helical structures from 29 % to 17 %, with a contemporaneous increase in the proportion of β -sheet structures from 12 % to 28 %, was documented. Furthermore, the temperature-induced conformational change of the unmodified and BITC-modified α -LA samples was investigated in the range of 20 to 80 °C. Here, it was found that as the degree of modification increased, compositional differences in the secondary structure became smaller and smaller depending on the temperature. Furthermore, an increase in surface hydrophobicity and hydrodynamic radius from 1.8 nm to a maximum of 89.4 nm was observed with increasing amounts of bound BITC. The addition of the hydrophobic ligand BITC to the polar amino groups of the protein side chains resulted in a reduction in polarity and charge, leading to an increase in surface hydrophobicity. BITC-induced restructuring could result in the increased exposure of hydrophobic groups to the protein surfaces, which could promote the hydrophobic interactions between protein molecules and thus explain the increase in hydrodynamic radius and the formation of aggregates in protein derivatives. Finally, efforts were made to correlate the influence of covalent binding of BITC on protein structure and on epitope structures and to deduce direct consequences for the antigenic properties of whey protein. Immunological detection after preceding high-performance thin-layer chromatography was successfully used to estimate the antigenicity of the unmodified and BITC-modified proteins. As the molecular basis for altered antigenic potential results from changes in epitope structures, it can be assumed that the BITC-induced change of the three-dimensional protein structure probably inactivated, blocked or destroyed epitopes, but at the same time also previously hidden epitopes inside the protein were exposed or new epitopes were formed, resulting in a total increase of the antigenic activity of BITC protein derivatives. Furthermore, the specific antibodies were used to detect the residual antigenicity of proteolytically digested unmodified and BITC-modified proteins. Despite protein modification and enzymatic hydrolysis by trypsin, some but reduced residual antigenicity remained in the form of short peptide fragments, implying that some of the epitopes were still immunologically active.

Furthermore, the proteolytic degradation behavior of the unmodified and BITCmodified α -LA by trypsin was investigated. One- and two-dimensional high-performance thin-layer chromatography was used to perform a qualitative study to differentiate unmodified and BITC-modified protein hydrolysates based on visual comparison of the chromatograms obtained. By using the two-dimensional approach, an improved separation of the complex peptide mixture and thus an optimized differentiation of the protein modifications was achieved. The analysis by high-performance liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry provided the identification of the unmodified and BITC-modified peptides. The experimental results of the tryptic hydrolysis of the unmodified and BITC-modified α -LA showed that the binding of BITC to the amino groups of the lysine side chains sterically blocked the tryptic proteolysis sites. As a result of partial inhibition of enzymatic hydrolysis of the BITC protein derivatives by trypsin elongated modified peptides were detected. With increasing amounts of bound BITC, a successive increase in the number of modified (elognated) peptides was observed. For two of the BITC-modified peptides, it was even possible to identify the exact reaction site, i.e. the modified amino acids (K32 and K113), in the primary sequence of α-LA.

The results of the two chromatographic separation methods indicated that the addition of the hydrophobic ligand BITC to the polar amino groups of the lysine side chains resulted in a lower polarity and thus altered chromatographic behavior of the peptides. The decreased polarity of the BITC-modified peptides is consistent with the fluorimetric test results, which showed an enhanced surface hydrophobicity with increasing degree of modification.

3 Einleitung

Das wachsende Bewusstsein der Menschen für eine gesunde und ausgewogene Ernährung steigert die Nachfrage an Lebensmitteln mit gesundheitsfördernden Eigenschaften [1–5]. Für den gesundheitlichen Aspekt eines Lebensmittels ist die Zusammensetzung einer kompletten Mahlzeit, die Gesamtheit der Nährstoffe sowie die Wechselwirkung mit anderen Lebensmittelbestandteilen maßgebend [6–8]. In den vergangenen Jahren avancierte sich vor allem die vegetarische Ernährung zu einem der beliebtesten Ernährungstrends. Die pflanzlich ausgerichtete Ernährung bietet durch den gesteigerten Konsum von Gemüse vielzählige positive Wirkungen auf die Gesundheit. Neben den primären Pflanzenstoffen sind hierbei auch die sekundären Pflanzenstoffe zu nennen. Dem Trend folgend werden vermehrt traditionelle Lebensmittel mit Zutaten versetzt oder während einer Mahlzeit kombiniert, die aus Obst und Gemüse stammen und somit eine hohe Konzentration an gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenmetaboliten liefern. Häufig handelt es sich dabei um Milch- und Molkenprodukte, wie zum Beispiel Quark, oder um viel verzehrte Produkte, wie Brot.

Vor allem dem Gemüse der Pflanzenordnung *Brassicales* werden zahlreiche positive physiologische Wirkungen, wie antibakterielle, entzündungshemmende und antidiabetogene Eigenschaften, zugeschrieben, die größtenteils auf die schwefelhaltigen Glucosinolate (GLS) und deren Hydrolyseprodukte, den Isothiocyanaten (ITC), zurückzuführen sind [9–20]. Aufgrund der hohen Reaktivität der ITC sind in komplexen Lebensmittelmatrices während der Lebensmittelherstellung, -verarbeitung, -zubereitung und -lagerung ungerichtete Reaktionen mit anderen Lebensmittelbestandteilen wie beispielsweise den Proteinen denkbar. Von besonderer Bedeutung sind dabei Reaktionen mit Aminosäuren, die nukleophile Gruppen wie Thiol- und Aminogruppen in der Proteinseitenkette tragen [21–23]. ITC-Proteinkonjugate wurden bereits in vielzähligen Modellproteinen, darunter Proteine aus Milchprodukten, Pflanzen, Eiern und Fleisch, und in kompletten Lebensmitteln wie zum Beispiel in pflanzlich angereichertem Brot und Quark nach Zusatz von ITC-haltiger Gartenkresse (Lepidium sativum L.) nachgewiesen [15,24–38]. Durch die Anreicherung proteinhaltiger Lebensmittel mit GLS-reichen Zutaten können Interaktionen zwischen Proteinen und ITC die Eigenschaften beider Komponenten verändern. Beispielsweise können kovalente Proteinmodifikationen mit ITC erhebliche Veränderungen in der Lebensmittelmatrix hervorrufen und die Bioverfügbarkeit der essentiellen Aminosäuren und der gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenmetabolite reduzieren. Außerdem können kovalente Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ITC die Proteinfaltung beziehungsweise die dreidimensionale Struktur beeinflussen, was für die funktionellen, nutritiven und biologischen Eigenschaften entscheidend ist [9,14–17,21–23,25,27,29,32,39–46]. Obwohl die strukturellen Veränderungen und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Eigenschaften und Funktionen verschiedener Modellproteine im Falle der ITC-Modifizierung bereits untersucht wurden [3,4,6,8-11], sind die Folgen einer kovalenten ITC-Bindung an das Molkenprotein α -Lactalbumin (α -LA) hinsichtlich der Änderung der Struktur und der Eigenschaften bislang unzureichend geklärt.

Vor dem Hintergrund, dass α -LA wegen seiner hohen ernährungsphysiologischen Qualität und herausragenden funktionellen Eigenschaften eine wichtige Lebensmittelzutat darstellt, ist eine bessere Aufklärung der Proteinveränderungen infolge einer ITC-Konjugation von großer Bedeutung. Das gilt in besonderem Maße für die Gewährleistung des Einsatzes von α -LA mit seinen individuellen Eigenschaften und Funktionen in Lebensmitteln [32,41,47-57]. Hinzu kommt, dass α -LA eines der Hauptallergene in der Kuhmilch darstellt [58]. Um das weit verbreitete Gesundheitsproblem der Milchallergie zu lösen, wird bereits verstärkt nach Maßnahmen oder Strategien zur Kontrolle und Reduktion der Allergenität geforscht. In diesem Zusammenhang kommt der kovalenten Proteinmodifikation, die allgemein als eine vielversprechende Methode zur gezielten Veränderung oder Verbesserung der Proteineigenschaften gilt, eine bedeutende Rolle zu. Durch die gezielte Modifikation könnte eine optimierte Verwendung der Proteine in Lebensmitteln möglich werden, was aus lebensmittelchemischer und -technologischer Sicht von großer Relevanz ist. Hierfür ist zunächst eine umfassende Grundlagenforschung nötig, um ein besseres Verständnis über die Konsequenzen der kovalenten Proteinmodifikationen im Hinblick auf die Struktur und Eigenschaften zu gewinnen, sodass zukünftig Folgen besser abgeschätzt und gesteuert werden können.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bildung von α -LA-Derivaten mit dem bioaktiven Metaboliten Benzylisothiocyanat (BITC), einem Abbauprodukt des GLS Glucotropaeolin, als Beispiel für mögliche Wechselwirkung in proteinreichen Milchprodukten mit glucosinolathaltigen Gewürzen oder Kräutern zu realisieren und analytisch zu charakterisieren. Im Fokus stand die Untersuchung des Einflusses der BITC-Konjugation an das Molkenprotein auf die dreidimensionale Struktur und die biologischen Eigenschaften des Proteins, wie dem tryptischen Abbauverhalten und der antigenen Aktivität.

4 Theoretischer Hintergrund

4.1 Proteine – Funktionen und Strukturen

Proteine sind biologische Makromoleküle, die zu den Grundbausteinen aller Zellen gehören und neben Lipiden und Kohlenhydraten eine wichtige Klasse der Hauptnährstoffe darstellen [59–62]. Ihnen werden entscheidende Funktionen in vielen biologischen Prozessen zugeschrieben [63]. So unterstützen Proteine im Organismus die Speicherung und den Transport von verschiedenen Molekülen und Stoffen (bspw. den Transport von Sauerstoff durch Hämoglobin oder von Ionen und Elektronen durch Zellmembranen) und können als Enzyme (bio-)chemische Reaktionen katalysieren. Neben hormonellen Eigenschaften besitzen Proteine auch strukturgebende Einheiten, wie beispielsweise Kollagen in Sehnen, Knorpeln und Zähnen. Als Antikörper können Proteine körperfremde Strukturen (Antigene) erkennen, binden und somit zur Immunabwehr beitragen [59,60,63].

Neben den biologischen Aufgaben im Organismus besitzen Proteine als Lebensmittelkomponente weitere wichtige nutritive und funktionelle Eigenschaften [64]. Indem Proteine die für das Wachstum und die Gesundheitserhaltung unabkömmlichen Aminosäuren zur Verfügung stellen, tragen sie zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Lebensmitteln bei [65]. Während die nutritiven Funktionen der Proteine die biologischen Aktivitäten, wie die der Antikörper, Membranen, Hormone und Enzyme umfassen, sind die Definitionen der funktionellen Eigenschaften der Proteine ambivalent [64]. Aus biochemischer Sicht spielen die Proteinfunktionen auf zellulärer und molekularer Ebene eine entscheidende Rolle. Beispielsweise ist von Interesse inwieweit intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zur Stabilität der Proteinstruktur, zur Regulation des Aminosäurestoffwechsels, zur Synthese und zum Abbau von Proteinen sowie zur Erkennungs-, Schutz- und Transportfunktion beitragen. Dem hingegen interessieren sich Ernährungswissenschaftler für die nutritiven Funktionen der Proteine im gesamten Organismus. Sie untersuchen beispielsweise die toxischen und allergischen Eigenschaften sowie die Interaktionen mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen. Der Fokus der Lebensmittelchemie und -technologie liegt auf den funktionellen Eigenschaften der Proteine, wie Löslichkeit, Wasserbindung, Viskositätsentwicklung, Emulgierung sowie Gelund Schaumbildung, die die sensorischen und funktionellen Eigenschaften eines Nahrungsmittels bestimmen [64,65]. Grundsätzlich können Proteine als strukturelle Basis für die funktionellen Eigenschaften von Lebensmitteln betrachtet werden [65]. Die Funktionalität von Proteinen in Lebensmitteln ist im Wesentlichen von der Molmasse, der Aminosäurezusammensetzung und -sequenz sowie der daraus resultierenden Konformation und der direkten Umgebung abhängig. Letzteres beschreibt den Einfluss der Anwesenheit anderer Lebensmittelinhaltsstoffe, wie z.B. Wasser, andere Proteine, Saccharide, Lipide oder sekundäre Pflanzenstoffe, in Abhängigkeit

von der Art (Struktur), Konzentration und dem Ausmaß der Wechselwirkung. Außerdem zählen externe Parameter wie der pH-Wert, die Ionenstärke und die Wasseraktivität dazu [59.61,62,64–70]. Da die Struktur der Proteine maßgeblich entscheidend für deren Eigenschaften und Funktionen ist, werden nachfolgend die vier Struktureben der Proteine erläutert [61]. Die kleinste Einheit eines Proteins wird durch die Primärstruktur, der Abfolge der Aminosäuren, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind, beschrieben. Die peptidisch verknüpften Aminosäuren bilden lange Polypeptidketten, die sich zu regelmäßigen Strukturen falten. Diese räumliche Anordnung der Polypeptidkette zu Sekundärstrukturen wird überwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Stickstoffatom der Aminogruppe und dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe von nicht direkt benachbarten Aminosäuren stabilisiert [59,61,62]. Zu den prominentesten Strukturen gehören die α -Helix und das β -Faltblatt. Die Tertiärstruktur beschreibt die dreidimensionale Struktur der Polypeptid- bzw. Proteinkette. Sie wird durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen zwischen weit voneinander entfernt liegenden Aminosäuren gebildet. Zu den wirkenden Kräften zählen unter anderem Ionenbindungen, Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Die räumliche Anordnung mehrerer Proteinuntereinheiten unter Ausbildung eines funktionellen, oligomeren Gesamtkomplexes, der durch Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen stabilisiert wird, wird als Quartärstruktur bezeichnet [60,61,63].



Abbildung 1. Schematische Darstellung der Strukturebenen von Proteinen [71].

4.1.1 Proteine als Lebensmittelallergene

Neben den vielzähligen Funktionen der Proteine können sie in Lebensmitteln eine allergene Aktivität aufweisen. Häufig werden Allergene auch als Antigene bezeichnet, also als körperfremde Substanzen, die vom Organismus erkannt werden, eine spezifische Immunantwort auslösen und somit ein immunogenes Potenzial besitzen können. Während ein Immunogen immer ein Antigen darstellt, ist ein Antigen nicht zwangsläufig immer ein Immunogen [72]. Somit sind Immunogene grundsätzlich Substanzen, die eine humorale oder zelluläre Immunantwort induzieren, das heißt zur Synthese von Antikörpern führen können. Die Fähigkeit eines Antigens eine Immunantwort zu induzieren, heißt Immunogenität, wohingegen die Antigenität die Fähigkeit beschreibt Reaktionen mit spezifischen Antikörpern, die aus einer Immunantwort resultieren, einzugehen [73]. Die immunogene Wirksamkeit von Proteinen birgt das Risiko bei empfindlichen Menschen eine allergische Reaktion auszulösen [72]. Im Allgemeinen beschreibt eine Allergie eine veränderte immunologische Reaktion bzw. eine Überempfindlichkeit des Organismus gegenüber einer eigentlich ungefährlichen Substanz [61,74–76]. Die Allergene oder Antigene werden von Antikörpern selektiv und spezifisch erkannt und gebunden [62]. Diese Antigen-Antikörper-Bindung ist hochspezifisch und beruht auf starken, nicht kovalenten Wechselwirkungen. Durch die direkte Beteiligung der Antikörper an der humanen Immunabwehr werden sie auch als Immunoglobuline (Ig) bezeichnet [77]. Die Immunoglobuline oder Antikörper werden von den Plasmazellen produziert und ins Blut abgegeben. Sie sind für die Erkennung, Markierung und Neutralisierung von Antigenen im Körper verantwortlich. Immunoglobuline weisen eine Y-förmige Struktur auf und bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die weiterhin in 12 kleinere Domänen differenziert werden. Durch Disulfidbrücken werden die Ketten miteinander verbunden. Die Antigenbindungsstelle oder das Paratop wird aus den variablen Regionen der kurzen Arme aufgebaut, die das antigenbindende Fragment Fab darstellen (engl. fragment antigen binding). An den N-terminalen Enden der Peptidketten eines Antikörpers befinden sich somit jeweils zwei Paratope. Die darunter liegende konstante Region des kurzen Arms bildet zusammen mit den konstanten Regionen des langen Arms das kristallisierbare Fragment Fc (engl. crystallisable fragment) [61,78–80].



Abbildung 2. Aufbau eines Antikörpers am Beispiel eines monomeren Immunoglobulins. In Anlehnung an [78–80].

Immunglobuline werden in fünf verschiedene Typen unterteilt: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, die durch unterschiedliche Primärstrukturen der schweren Ketten

gekennzeichnet sind. Aus quantitativer Sicht kommt das IgG am häufigsten im Blutkreislauf der Menschen vor, wohingegen IgE weniger im menschlichen Blut enthalten ist. IgE-Antikörper werden beispielsweise bei einer Soforttypallergie nach einem ersten Kontakt mit einem Allergen von den B-Lymphozyten gebildet und verursachen bei wiederholtem Kontakt mit demselben Allergen eine allergische Reaktion.

Die Erkennung von Antigenen durch die Antikörper erfolgt nicht über ihre Gesamtstruktur, sondern über selektive Bereiche auf der Oberfläche eines Proteins, die als Epitope oder antigene Determinanten definiert sind [61,81]. Die Epitopstrukturen von Proteinen bestehen aus einer Abfolge von bis zu 20 Aminosäuren, die entweder als lineare (sequentielle und kontinuierliche) oder konformationelle (diskontinuierliche) Epitope klassifiziert werden [60,82–90].



Abbildung 3. Interaktion zweier Antikörper mit sequenziellen (A) und konformationellen (B) Epitopen eines Proteinantigens. In Anlehnung an [79].

Bei sequenziellen Epitopen wird das allergene Potential durch die lineare Reihenfolge der Aminosäuren, also von kurzen Abschnitten der Primärstruktur der Proteine bestimmt (Abbildung 3A), wohingegen bei konformationellen Epitopen nicht zusammenhängende Aminosäuren, sondern die dreidimensionale Faltung des Proteins (Konformation) entscheidend ist (Abbildung 3B) [60,82–90]. Es wird ersichtlich, dass die Natur der Epitope die allergenen Eigenschaften eines Proteins determiniert. Während die oberflächigen Epitope mit Antikörpern interagieren können, bleiben Epitope, die im Inneren vergraben sind, von den Antikörpern unentdeckt und werden nicht gebunden [91–94].

4.1.1.1 Lebensmittelallergien

Bei einer klassischen Lebensmittelallergie, die auch als Hypersensitivitätsreaktion bezeichnet wird, kommt es zu zell- oder antikörper-(IgE) vermittelten Abwehrreaktionen körpereigener Zellen [88,95]. Die meisten Nahrungsmittelallergien sind eine Typ-1-Allergie (Soforttyp), die durch spezifische an Mastzellen gebundene IgE-Antikörper vermittelt werden. Beim ersten Kontakt des Körpers mit einem allergieauslösenden Stoff bildet das Immunsystem spezifisch auf das Allergen/Antigen passende IgE-Antikörper, die an die Oberfläche von Mastzellen binden. Es handelt sich um eine Sensibilisierung, die symptomfrei abläuft. Beim zweiten Kontakt mit demselben Allergen/Antigen kann es zu einer Allergen-Antikörper-Bindung durch die an Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper kommen. Durch die Aktivierung der Mastzellen werden diese zur Degranulation stimuliert, wodurch es innerhalb weniger Sekunden bis Minuten zur Ausschüttung und Freisetzung von Substanzen wie Histamin, Leukotriene und anderen Mediatoren der allergischen Entzündung kommen kann [87,88,96]. Die Symptome reichen von ungefährlichen Hautreaktion, Schwellungen, Juckreiz über respiratorische, kardiovaskuläre oder gastrointestinale Krankheiten bis hin zu schwerer Atemnot und zum anaphylaktischen Schock [88,95].

Das Auftreten und das Ausmaß einer Allergie ist von verschiedenen Faktoren wie dem Essverhalten, der geographischen Lage, aber auch von der Sensibilität des Patienten und vom Allergen selbst abhängig [89,97–99]. Die biochemischen und immunologischen Eigenschaften des Antigens werden unter anderem von der Molekülgröße, der chemischen Struktur, aber auch von der Häufigkeit und Dichte der Epitope bestimmt [82–86,89,100]. Bislang ist noch unklar, weshalb manche Nahrungsmittelproteine für einige Menschen gut verträglich und unschädlich sind und bei sensibilisierten Personen eine allergische Reaktion auslösen [89]. Da es keine zuverlässigen Therapien zur Behandlung von Lebensmittelallergien gibt, stellt die einzige Möglichkeit Allergiker vor einer allergischen Reaktion zu schützen die vollständige Allergenkarenz dar [95,101]. Daher müssen seit 2011 gemäß Artikel 9 Abschnitt 1 Bst. c in Verbindung mit Anhang II Nummer 7 VO (EG) Nummer 1169/2011 die Hauptallergene auf der Lebensmittelverpackung deklariert werden. Besondere Gefahren einer allergischen Reaktion bergen Lebensmittel, die mit hohem technologischen Aufwand hergestellt wurden und versteckte und unerwartete Allergene enthalten [95,102,103].

Es besteht ein wachsender Wunsch, Lebensmittel für Allergiker sicherer zu machen. Um das weit verbreitete Gesundheitsproblem der Lebensmittelallergie besser zu verstehen und Behandlungstherapien zu entwickeln, wurden vielzählige Untersuchungen durchgeführt, um das allergene Potential von Proteinen zu beeinflussen.

4.2 Molkenproteine

Molkenproteine sind Proteine globulärer Struktur, die 20 % der Kuhmilchproteine ausmachen. Zu ihnen zählen verschiedene Albumine und Globuline, von denen quantitativ β -Lactoglobulin (β -LG) und α -Lactalbumin (α -LA) die wichtigsten Fraktionen in der Kuhmilch darstellen. Weitere Minorkomponenten sind Serumalbumine, Immunoglobuline und Proteose-Peptone [104]. Aufgrund des hohen Gehaltes an verzweigten, schwefelhaltigen und essentiellen Aminosäuren der Molkenproteine besitzen sie eine sehr hohe ernährungsphysiologische Qualität [41,49,50,105,106]. Weiterhin können Molkenproteine und die aus der enzymatischen Proteolyse resultierenden Peptide vielzählige Immunfunktionen, wie beispielsweise die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten, die Produktion von Antikörpern und die Aktivität von natürlichen Killerzellen und Granulozyten, beeinflussen [107]. Neben ihrer hohen biologischen Wertigkeit zeichnen sich Molkenproteine durch ihre außergewöhnlichen funktionellen Eigenschaften (gelierend, schaumbildend, emulgierend, wasserbindend und gut löslich in einem weiten pH-Wert-Bereich) aus, was sie zu wertvollen Lebensmittelzutaten macht [41,47,48,50]. Die Struktur der Molkenproteine ist durch freie Thiolgruppen, Lysinreste und hydrophobe Taschen geprägt, was sie zu geeigneten Trägern für bioaktive Stoffe macht [41].

4.2.1 α-Lactalbumin

 α -LA macht etwa 20 % der gesamten Molkenproteine und 2 - 5 % des gesamten Proteingehalts in der Milch aus [50,56,108,109]. Im Vergleich zu anderen Milchproteinen ist α -LA eine sehr gute Quelle für bioaktive Peptide und essentielle Aminosäuren, wie Tryptophan, Lysin und Cystein [4,110]. Die hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 72 % zwischen bovinem und menschlichem α -LA ermöglicht den Einsatz von bovinem α -LA in der Säuglingsnahrung [4].

4.2.1.1 Struktur und Metallbindung

 α -LA ist ein globuläres, monomeres Protein, bestehend aus 123 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 14.2 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen 4.2 und 4.5 [108–115]. Insgesamt sind vier genetische Varianten von α -LA bekannt, von denen die Varianten A und B vorherrschend sind [109,116–118]. Während die Variante A in der Aminosäuresequenz an Position 10 ein Glutamin enthält, weist die Variante B an dieser Stelle eine Arginin-Substitution auf [50,56,117].

Strukturstudien von bovinem α -LA zeigten, dass die Aminosäuresequenz, die Anordnung der Disulfidbindungen und die dreidimensionale Struktur homolog zu dem Typ-C-Lysozym sind. Obwohl die dreidimensionale Struktur beider Proteine sehr ähnlich ist, gibt es jedoch wesentliche Unterschiede in ihren Funktionen [119]. Die acht enthaltenen Cysteine des α -LA bilden vier Disulfidbrücken aus (C6-C120, C61-C77, C73-C91 und C28-C111), die gemeinsam mit der Calciumbindungsstelle die dreidimensionale Proteinstruktur stabilisieren [4,50,56,104,105,112,115,120,121]. Während die Sekundärstruktur von α -LA aus 26 % α -Helices, 14 % β -Faltblättern und 60 % ungeordneten Strukturen besteht [56], wird die Tertiärstruktur aus einer großen α - und einer kleinen β -Domäne (Abbildung 4) aufgebaut, die durch einen tiefen Spalt voneinander getrennt sind. Die α -Domäne umfasst die Aminosäurereste von 1-34 und 86-123 und besteht aus zwei kleineren 3_{10} Helices (h1 (18-20) und h3 (115-118)), einer pH-abhängigen α -Helix (H4 (105-110) sowie drei pH-stabilen α -Helices (H1 (5-11), H2 (23-34) und H3 (86-98)). Die kleinere β -Domäne umfasst die Aminosäurereste von 35-85 und besitzt neben drei antiparallele β -Faltblätter (S1 (41-44), S2 (47-50), S3 (55-56)) und einer kurze 3_{10} Helix (h2 (77-80)) auch Schleifen und ungeordnete Strukturen [4,50,105,112,122,123].



Abbildung 4. Darstellung der Konformationsstruktur von bovinem α -LA in Form eines Bändermodells (PDB ID 1F6S) [124]. In Anlehnung an [4].

Eine weitere Charakteristik für die Struktur von α -LA ist die Calciumbindung, die entscheidend für die Struktur, die korrekte Faltung, die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit für die Stabilität und die Funktion ist [4,50,108,119,125–127]. α -LA gilt als eines der wichtigsten Calcium-bindenden Modellproteine, das häufig Untersuchungen von Calciumbindungseffekten für herangezogen wird [50,115,128,129]. Die Koordination des Calcium-Ions erfolgt über die Sauerstoffatome von zwei Carbonyl- (K79 und D84) und drei Carboxylgruppen (D82, D87 und D88) des Peptidrückgrats sowie an zwei Wassermolekülen [50,112,130]. Unter bestimmten Bedingungen, wie niedrige pH-Werte, hohe Temperaturen oder die Zugabe von Denaturierungsmitteln und Chelatbildnern, kann das Calcium-Ion entfernt werden (Apo-Form), was Veränderungen in der Faltung und der funktionellen Eigenschaften von α -LA zur Folge haben kann [119,130]. Während natives, calcium-gebundenes α -LA eine hohe Rigidität der molekularen Struktur besitzt und durch eine hohe Thermostabilität gekennzeichnet ist, setzt die temperaturinduzierte Entfaltung/Denaturierung des Proteins der calciumarmen Variante bereits bei niedrigeren Temperaturen ein [110,127,131–135]. Außerdem erfordert die Rückfaltung und die Bildung nativer Disulfidbrücken im reduzierten, denaturierten Protein die Anwesenheit und Bindung von Calciumionen [50,115,136]. Demnach kann durch die Entfernung der Calciumionen die Empfindlichkeit des Proteins gegenüber Denaturierungsreagenzien, Temperatur- und pH-Wertänderungen erhöht werden, was ebenfalls mit einer Verminderung der molekularen Stabilität einhergehen kann

[50]. Neben Calcium kann α -LA auch andere physiologische wichtige Kationen binden. Ihre Bindung zeigt geringfügige Abweichungen im Hinblick auf die Stabilität der molekularen Struktur von α -LA [137–139]. Werden anstelle von Calcium-Ionen Magnesium-, Mangan-, Natrium- oder Kalium-Ionen gebunden, kommt es zu einer Stabilitätserhöhung der molekularen Struktur von α -LA, wohingegen die Bindung von Zink-Ionen zu einer verringerten Proteinstabilität führt. Je stärker Ionen mit dem Protein wechselwirken, desto höher ist die Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien wie Temperatur, Druck oder pH-Wert [108,110].

Die Faltung von α -LA in einer sauren Umgebung wird als Prototyp des *molten* globule (MG)-Zustands betrachtet. Im MG-Zustand bleibt zwar die Sekundärstruktur teilweise erhalten, jedoch wird bedingt durch das Fehlen der Wechselwirkungen wie im nativen Protein die Tertiärstruktur instabil und teilweise ungeordnet. Viele Aminosäureketten sind nicht fixiert, sodass die Struktur eine erhöhte Flexibilität erhält [110,130,140]. Obwohl die kugelförmige Form erhalten bleibt, kann durch die Bindung von Wassermolekülen die Struktur im Vergleich zum nativen Protein aufquellen, zeitgleich wird das Protein anfälliger für die Proteolyse [112,141,142]. Der Übergang zum Zustand der geschmolzenen Kügelchen kann neben einem niedrigen pH-Wert auch durch hohe Temperaturen oder die Anwesenheit von Denaturierungsmitteln und Detergenzien gefördert werden. Bei der calciumarmen Apo-Form des α -LA kann der MG-Zustand bereits bei physiologischen Bedingungen (Temperaturen, pH-Wert) und bei einer niedrigen Ionenstärke erreicht werden [115,119,143,144].

4.2.1.2 Physiologische Eigenschaften

In der Milchdrüse von Säugetieren reguliert α -LA die Biosynthese des Milchzuckers Laktose [4,114,145–148]. Neben α -LA ist die Galaktosyltransferase die zweite Komponente, die die Laktose-Synthese katalysiert. Unter physiologischen Bedingungen bindet α -LA reversibel an die Galaktosyltransferase, wodurch ein Laktose-synthase-Komplex gebildet wird, der die Spezifität und Affinität des Enzyms für Glukose erhöht und somit die Bildung von Laktose aus Glukose und Uridyldiphosphat(UDP)-Galaktose ermöglicht [76]. Bei der enzymatischen Übertragung tritt die Glukose mit der UDP-Galaktose zusammen, wobei in β -glykosidischer Bindung der Galaktoserest auf die Hydroxygruppe am C4 der Glucose übertragen wird. Schließlich wird durch die Abspaltung von UDP die Laktose gewonnen und eine effiziente Laktosesynthese im Lumen des Golgi-Apparates gewährleistet [50,56,105,110,112]. Es konnte festgestellt werden, dass die Konzentration an Laktose in der Milch proportional zur Menge an α -LA ist [56].

In den vergangenen Jahren wurden weitere physiologische Funktionen von α -LA, wie beispielsweise die Induktion der Apoptose von Tumorzellen oder die bakterizide Aktivität, hervorgehoben. Mehrere *in vitro* Studien berichteten, dass ein Protein-

Lipid-Komplex bestehend aus menschlichem oder bovinem α -LA in der *molten Glo*bule-Form und einer cis-ungesättigten Fettsäure, wie Ölsäure, letal auf Tumorzellen wirkt [127,149,150]. Der molekulare Komplex wird als HAMLET/BAMLET (human/bovine a-lactalbumin made lethal to tumor cells) bezeichnet. Durch die Bindung von bestimmten Fettsäuren an α -LA könnte der Protein-Lipid-Komplex nach dem Eindringen in die Tumorzelle an die Histone binden, die Organisation des Chromatins im Zellkern stören und folglich eine Apoptose (Selbstzerstörung der Zelle) auslösen [127]. Die apoptische Aktivität des Protein-Lipid-Komplexes gegen verschiedene Tumor- und Bakterienzellen kommt dadurch zustande, dass das Protein als Transportträger zytotoxische Fettsäuremoleküle durch die Zellmembran befördert. Bislang ist jedoch noch unklar, ob diese Komplexe bei der Verdauung von Milchprodukten im menschlichen Organismus entstehen oder bereits natürlich in der Milch vorkommen [4]. Die Komplexe bestehend aus α -LA und Ölsäure könnten zur Entwicklung neuer Krebsmedikamente eingesetzt werden. Außerdem wurde angenommen, dass der HAMLET-Komplex eine antimikrobielle Aktivität gegen Stämme wie Streptococcus pneumoniae und Haemophilus influenzae ausüben könnte [4].

Weiterhin dokumentierten frühere Arbeiten, dass α -LA und seine proteolytischen Peptide antibakterielle und immunstimulierende Eigenschaften besitzen können, wodurch ein Schutz vor Infektionen denkbar ist. Beispielsweise konnte eine klinische Studie zeigen, dass mit α -LA angereicherte Säuglingsnahrung eine Aktivität gegen den *E. coli* Stamm O127 aufwies und zur Reduktion von Durchfallerkrankungen führte. Es wurde angenommen, dass diese Beobachtungen auf die Bildung von bioaktiven Peptiden des α -LA zurückzuführen sind [151].

Weitere Studien berichteten, dass aus der enzymatischen Hydrolyse von α -LA durch Trypsin und Chymotrypsin bioaktive Peptide mit einer antibakteriellen Aktivität gegen Grampositive Bakterien und einer antiviralen Wirksamkeit gegen Herpeserkrankungen entstehen. Dies bietet unter anderem die Möglichkeit herkömmliche antivirale Medikamente, die meist unerwünschte Nebenwirkungen haben, durch den Einsatz von proteolytischen α -LA-Peptiden zu ersetzen [127,152–154].

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass α -LA zur Stressreduktion beiträgt, was darauf zurückgeführt werden kann, dass aus der Hydrolyse von α -LA Tryptophan entsteht, was wiederum als Vorstufe zur Serotoninherstellung dient und daher zur Reduktion von Stress führt. In einer Studie von Markus *et al.* (2000) erhielten Probanden Casein oder α -LA, um den Einfluss von α -LA auf Stresssymptome zu untersuchen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Stressniveau der Probanden, die α -LA konsumierten stark reduziert werden konnte [155]. Außerdem zeigte eine Supplementierung mit α -LA ein verbessertes Schlafverhalten [4].

4.2.1.3 Hauptallergene in der Kuhmilch – Kuhmilchallergie

In der Lebensmittelindustrie gilt die Kuhmilch als eine wertvolle Nahrungsquelle für den Menschen, vor allem für Säuglinge und Kinder. Insbesondere α -LA und seine proteolytischen Peptide werden aufgrund der hohen Menge an essentiellen Aminosäuren und der verschiedenen physiologischen Funktionen als Lebensmittelzusatzstoff in der Nahrung eingesetzt [50,154–158]. Neben den aufgeführten positiven Eigenschaften des Molkenproteins α -LA zählt es allerdings zu einem der Hauptallergene in der Kuhmilch, wodurch die Anwendung von α -LA begrenzt wird. Eine allergische Reaktion ist sowohl gegenüber der Molkenproteine α -LA (Bos d 4) und β -LG (Bos d 5) als auch der Caseinfraktion (Bos d 8) denkbar [58,76,82,93,159].

Die meisten Kuhmilchallergiker sind durch den direkten Kontakt mit Milchprodukten gegen mehrere Milchkomponenten sensibilisiert [76,160,161]. Die Kuhmilchallergie (engl. *cow's milk allergy*, kurz: CMA) gilt als eine seltene, aber schwerwiegende Lebensmittelallergie, die meistens eine weitere Sensibilisierung gegenüber anderen Lebensmitteln nach sich zieht [72,162]. Eine besonders hohe Prävalenz der Kuhmilchallergie wurde bei Kindern und Säuglingen festgestellt. Es wurde angenommen, dass der Zeitpunkt der ersten Aufnahme des Allergens die Häufigkeit der Kuhmilchallergie bei Kindern und Säuglingen erklären könnte. Demnach seien die ersten Fremdproteine, mit denen der Körper in Berührung kommt, Kuhmilch- sowie Hühnereiproteine [101,163]. Die niedrige Prävalenz der Kuhmilchallergie bei Erwachsenen lässt vermuten, dass sich im Laufe der menschlichen Entwicklung eine Toleranz gegenüber dem Antigen ausgebildet haben könnte.

Obwohl bislang die Ursache nicht abschließend geklärt werden konnte, weshalb die Allergieprävalenz der Kuhmilchallergie einen altersabhängigen Trend zeigt, wird vermutet, dass die erhöhte Permeabilität des Gastrointestinaltraktes für Makromoleküle von Kindern und Säuglingen die erhöhte Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Lebensmittelallergie im Kindesalter erklären könnte [164]. Der steigende Trend der Allergieprävalenz lässt sich vermutlich durch ein verändertes Essverhalten und einer zunehmenden Verarbeitung der Lebensmittel in Verbindung mit der Komplexität einzelner Zutaten erklären. Hinzu kommt, dass ein zu hohes Maß an Hygiene und Sauberkeit dazu führen kann, dass Zellen, deren Aufgabe darin besteht harmlose von krank machenden Erregern zu unterscheiden und letztere abzuwehren, bedingt durch eine übertriebene Hygiene und eine zu reinliche Umgebung ihrer Aufgabe nicht mehr nachkommen können und somit fehlgeleitete Reaktionen (harmlose Stoffe werden für feindlich Eindringlinge gehalten) und Allergien auslösen [76,164,165]. Die Datenlage in der Beurteilung der Häufigkeit der Kuhmilchallergie ist schwankend und kritisch zu betrachten, da die repräsentativen Daten durch verschiedene Diagnostikmethoden generiert werden und deren Kausalität nicht immer beweisbar ist [166].

In den vergangenen Jahren wurde verstärkt nach Lösungsansätzen zur Reduktion der Allergenität gesucht. Durch den Einsatz verschiedener Lebensmittelverarbeitungen wie Milchsäurefermentation, Glykierung, Wärmebehandlung, hydrostatischer Druck und enzymatische Hydrolyse kann durch die kontrollierten und optimierten Bedingungen die Allergenität von Milchproteinen reduziert werden [167–170]. Die Ergebnisse zeigten, dass Proteine durch die genannten Technologien aggregieren, denaturieren oder an lipide Strukturen binden können. Weiterhin können sie glykosyliert oder glykiert werden [102]. Prozessbedingte strukturelle und chemische Änderungen der Proteine können ebenfalls die allergenen Eigenschaften beeinflussen [102]. In Abhängigkeit des immunologischen Profils der betroffenen Person und vom Allergen ist eine partielle Inaktivierung des Allergens denkbar, wodurch eine Reduktion der allergischen Reaktion erzielt werden könnte. Bei besonders empfindlichen Personen schützt jedoch nur eine vollständige Allergenkarenz vor einer allergischen Reaktion, was wiederum zu einer nicht ausgewogenen Ernährung und insbesondere bei Säuglingen und Kindern zu einem gestörten Wachstum führen könnte. Darüber hinaus ist es schwierig Kuhmilchproteine vollständig aus der Ernährung zu isolieren, da sie in vielen verarbeiteten Lebensmitteln enthalten sind.

4.3 Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte

4.3.1 Vorkommen und Funktionen in der Pflanze

Glucosinolate (GLS) sind stickstoff- und schwefelhaltige Pflanzeninhaltsstoffe, die der Klasse der sekundären Pflanzenstoffe angehören. Während primäre Pflanzenstoffe wie Proteine, Fette und Kohlenhydrate für eine Pflanze essentiell und lebensnotwendig sind, werden sekundäre Pflanzenstoffe von Pflanzen selbst hergestellt und gelten als Produkte des Sekundärstoffwechsels [171]. Obwohl diese niedermolekularen Substanzen für das Wachstum und für die Differenzierung eines Organismus abkömmlich sind, werden ihnen viele wichtige Aufgaben zugeschrieben [171]. So können sie einem Individuum oder einer Population ein Selektionsvorteil bieten, der sich evolutionär positiv auf die Fortpflanzung und auf das Überleben auswirkt. Aufgrund des bitteren und scharfen Geschmacks, des stechenden Geruchs sowie der toxischen Wirkung der GLS dienen sie den Pflanzen zur Abwehr von schädlichen Fraßfeinden und pathogenen Mikroorganismen. Sie können aber auch als Signalstoffe Insekten zur Eiablage anlocken [171–173]. Die pflanzliche Funktionen der GLS werden in mehreren Studien mit deren enzymatischen Abbauprodukten in Verbindung gebracht [174–176].

Besonders weit verbreitet sind die GLS in Pflanzen der Ordnung der Kreuzblütlerartigen (*Brassicales*) [9,10]. Die Ordnung *Brassicales* umfasst beispielsweise die Pflanzenfamilien der Kaperngewächse (*Capparaceae*), Melonenbaumgewächse (*Caricaceae*) aber auch die der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) und der Kapuzinerkressengewächse (*Tropaeolaceae*). Eine hohe Vielfalt an GLS bietet die Gattung *Brassica* innerhalb der Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*), darunter gängige Gemüsekohl-Arten (*Brassica oleracea*) wie Brokkoli, Kohlrabi, Blumenkohl, Rotkohl, Rosenkohl und Weißkohl aber auch Raps, Steckrüben, schwarzer Senf und Chinakohl [10,14,177].

In intakten Pflanzen kommen die relativ stabilen und inerten GLS in den Vakuolen der stickstoffreichen S-Zellen vor [178]. Der Gehalt und das Profil der GLS kann sowohl in den einzelnen Pflanzenfamilien und -gattungen als auch in den verschiedenen Pflanzenteilen variieren [14,179]. So können beispielsweise strukturell unterschiedliche GLS in den Blüten, Röschen, Wurzeln oder Samen vorliegen [179– 181]. Weitere Faktoren, die die qualitative und quantitative Variabilität von GLS determinieren, sind unter anderem die Züchtung, Kultivierung, Düngung, Erntezeit, die Umwelt, das Klima und das Entwicklungsstadium der Pflanze und des jeweilige Pflanzenorgans [182–184]. Beispielsweise konnte in Brokkolisprossen ein höherer Gehalt an GLS als in der ausgewachsenen Pflanze festgestellt werden [10,14,178,179,185–187]. Auch die Tageszeit und die Belichtung während der Keimung kann einen Einfluss auf den GLS-Gehalt haben [188–190].

4.3.2 Struktur und Biosynthese

Allen GLS ist ein Grundgerüst gemeinsam, das aus einer β -D-Thioglucose, einem sulfonierten Oximrest und einer variablen Seitenkette R besteht [14,191].



Abbildung 5. Grundstruktur eines GLS bestehend aus einer β -D-Thioglucose, einem sulfoniertem Oxim-rest und einer variablen Seitenkette R (grün). In Anlehnung an [192].

Die strukturelle Diversität an GLS ergibt sich aus der variablen Seitenkette R, die sich von verschiedenen Aminosäuren ableiten lässt. Basierend auf der Beschaffenheit der variablen Seitenkette R erfolgt eine Einteilung in aliphatische, schwefelhaltige, aromatische und indolische GLS [14,176,193].



Abbildung 6. Darstellung der GLS-Klassen mit Strukturbeispielen der variablen Seitenkette R: I. aliphatische, II. schwefelhaltige, III. aromatische, IV. indolische GLS. Das GLS-Grundgerüst wird als X definiert. In Anlehnung an [192,193,196].

Die bei der Biosynthese der GLS im pflanzlichen Gewebe vorliegende Aminosäure dient als entscheidende Vorläufer-Substanz und ist maßgeblich entscheidend für die Struktur der Seitenkette [14,194]. So werden beispielsweise aus den Aminosäuren Alanin, Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin aliphatische GLS synthetisiert, während aus Phenylalanin und Tyrosin aromatische GLS gebildet werden. Für die Synthese von indolischen GLS dient Tryptophan als Grundbaustein [192,193,195].

Grundsätzlich läuft die Biosynthese der GLS in drei Schritten ab: die Kettenverlängerung der zugrundeliegenden Aminosäure, die Synthese des Grundgerüstes und die Modifikation der Seitenkette der GLS [192,197]. Die Elongation der Seitenkette der zugrundeliegenden Aminosäure beginnt mit einer Transaminierung, aus der eine α -Ketosäure hervorgeht. Anschließend erfolgt eine Kondensation mit Hilfe des Enzyms Acetyl-Coenzym A (CoA). Nach der Isomerisierung, die die Hydroxygruppe innerhalb des Moleküls verschiebt, folgt eine abschließende oxidative Decarboxylierung, aus der eine um eine Methylengruppe erweiterte α -Ketosäure resultiert. Diese kann weitere Zyklen der Kettenverlängerung durchlaufen oder durch eine erneute Transaminierungsreaktion wieder in eine Aminosäure umgewandelt werden [172,192,195]. Aus der elongierten Aminosäure wird im nächsten Schritt das Grundgerüst der GLS gebildet. In einem zweistufigen Prozess, an dem das Enzym Cytochrom P450-Monooxygenase beteiligt ist, wird die Aminosäure in ein Aldoxim und anschließend in ein noch nicht genau charakterisiertes, reaktives Zwischenprodukt umgewandelt. Die nachfolgenden Reaktionen zum GLS sind noch nicht vollständig aufgeklärt [195]. Es wird jedoch angenommen, dass das reaktive Zwischenprodukt mit einem Schwefeldonor (bspw. Cystein) konjugiert wird. Im weiteren Verlauf wird vermutlich durch eine C-S-Lyase Thiohydroximsäure freigesetzt, die abschließend glucosyliert und sulfatiert wird [192,193,197,198]. Abschließend können die Seitenketten der GLS durch sekundäre Modifikationen, wie beispielsweise Oxidationen, Methoxylierungen, Sulfatierungen, Hydroxylierungen oder Glycosylierungen verändert werden. Die sekundären Modifikationen begründen gemeinsam mit der Kettenverlängerung der Vorläufer-Aminosäure vor der Bildung des Grundgerüsts die große Strukturvielfalt der GLS [14,172,192,193,197].

4.3.3 Enzymatischer Abbau

Die relativ stabilen und inerten GLS sind in intakten Pflanzen räumlich getrennt von dem zelleigenen Enzym, der Myrosinase, welches in den Idioblasten des Cytoplasmas, den sogenannten Myrosinzellen, lokalisiert ist [174,176,199–201]. Die Myrosinase ist eine β -Thioglucosidase, die den enzymatischen Abbau der GLS initiiert und die eigentlich wirksamen, bioaktiven Hydrolyseprodukte liefert [177,202–205]. Erst nach Schädigung des intakten pflanzlichen Zellgewebes, beispielsweise durch einen Insektenbefall oder durch das Einwirken von mechanischen Kräften wie beim Schneiden oder Kauen, wird die Kompartimentierung in der Pflanze aufgehoben. Die Myrosinase wird aus den Myrosinzellen freigesetzt, kann an die GLS binden und dessen Thioglycosidbindung spalten. Bei der Hydrolyse der GLS entsteht neben Glucose und Sulfat ein Thiohydroximat-*O*-sulfonat, das ein chemisch instabiles Aglykon darstellt und in Abhängigkeit verschiedener Parameter (pH-Wert, Temperatur, Struktur der GLS-Seitenkette, Anwesenheit von Eisen-Ionen oder verschiedener Spezifizierungsproteine) in vielzählige Hydrolyseprodukte umgewandelt wird. Dazu zählen neben ITC auch Nitrile, Thiocyanate, Epithionitrile und Oxazolidin-2-thione [14,172,174,193,196,197,199,200,203,206].



Abbildung 7. Enzymatische Abbauprodukte der GLS in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert und Spezifizierungsproteine (ESM: *epithio specifier modifier protein*, ESP: *epithio specifier protein*, NSP: *nitrile specifier protein*, TFP: *thiocyanate formining protein*,). In Anlehnung an [196].

In manchen Pflanzen können in Anwesenheit von Spezifizierungsproteinen Interaktionen mit dem Aglykon stattfinden, sodass die Bildung spezifischer Hydrolyseprodukte begünstigt werden kann. Während aus der Interaktion mit dem Spezifizierungsprotein ESM (engli.: *epithio specifier modifier protein*) überwiegend ITC resultieren, bilden nitrilspezifische Proteine (engl.: *nitrile specifier protein*, NSP) bevorzugt Nitrile, epithiospezifische Proteine (engl.: *epithio specifier protein*, ESP) Epithionitrile und thiocyanatspezifische Proteine (engl.: *thiocyanate forming protein*, TFP) Thiocyanate [196,200,206].

Weiterhin beeinflussen Faktoren wie die Struktur der Seitenkette, die Temperatur, der pH-Wert sowie die Anwesenheit von Eisen-Ionen den Abbau zu den Produkten [203,207]. In Gegenwart von Eisen-Ionen kann die Bildung von Nitrilen bzw. Epithionitrilen begünstigt werden, wohingegen eine Hydroxylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom der variablen Seitenkette der GLS die Bildung von instabilen ITC, die zu Oxazolidin-2-thionen cyclisieren, erleichtert [14,172,196,200]. GLS mit aromatischen und aliphatischen Seitenketten bilden unter physiologischem (neutralem) pH-Wert hauptsächlich ITC. In Abwesenheit von Spezifizierungsproteinen kann eine nichtenzymatische intramolekulare LOSSEN-Umlagerung ablaufen, die jedoch unter sauren Bedingungen verhindert wird [196]. Bei der intramolekularen LOSSEN-Umlagerung von GLS findet eine Abspaltung einer Sulfatgruppe, die Übertragung der variablen Seitenkette R auf das benachbarte Stickstoffatom und die Ausbildung einer Doppelbindung zum Sulfid statt, woraus ein ITC mit seiner funktionellen Gruppe resultiert [203,208].



Abbildung 8. LOSSEN-Umlagerung des Thiohydroximat-O-Sulfonats zum ITC. In Anlehnung an [208].

Obwohl die pflanzeneigene β-Thioglucosidase der einzelnen Pflanzenarten zu der gleichen Familie zählt, erfordert jedes Enzym unterschiedliche Bedingungen für eine optimale Enzymaktivität. Das isolierte Enzym aus Meerrettich zeigte beispielsweise eine maximale Effektivität im Temperaturbereich von 37 bis 45 °C und in einem pH-Bereich von 5 bis 8 [209]. Auch das Enzym aus Wasabi arbeitet in diesem pH-Bereich am effektivsten [210]. Die Enzyme aus weißer Senfsaat und aus verschiedenen Kohlarten besitzen eine maximale Enzymaktivität bei ca. 60 °C [211,212]. Erhöhte Temperaturen ab 70 °C führen zur Denaturierung und Inaktivierung der β-Thioglucosidase, während für die Myrosinase aus Wasabi eine Denaturierung bereits bei 30 °C festgestellt wurde [210]. Auch die Natur und Vielfalt der GLS in einer Pflanze ist entscheidend für die Effektivität der enzymatischen Umsetzung. Es konnte beobachtet werden, dass die substratabhängige Enzymaktivität erhöht wurde, wenn mehrere GSL in einer Probe vorlagen [213]. Weitere Faktoren, die die Aktivität der β -Thioglucosidase beeinflussen bzw. verstärken, sind beispielsweise die Anwesenheit von Ascorbinsäure und Magnesiumchlorid [211,214]. Beispielsweise wird bei der Ascorbinsäure von einer katalytischen Funktion ausgegangen, indem sie zusätzliche nucleophile Gruppen eingeführt und die Konformation des Enyzms

so verändert, dass die Bindung der GLS am aktiven Zentrum der Myrosinase und folglich die Umwandlung der GLS begünstigt wird [203,215]. Eine aktive Beteiligung der Ascorbinsäure an der Reaktion wird jedoch ausgeschlossen. Demgegenüber wird bei einer erhöhten Ascorbinsäure-Konzentration eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der β -Thioglucosidase angenommen [216], was vermutlich der konkurrierenden Bindung der Ascorbinsäure und der GLS am aktiven Zentrum des Enzyms zugrunde liegt [203].

4.3.4 Bedeutung der Glucosinolate und Isothiocyanate in der menschlichen Ernährung

Für den Menschen spielen GLS und deren Hydrolyseprodukte durch ihren charakteristischen Geschmack und Geruch eine entscheidende Rolle bei der Nahrungsmittelwahl. Der tägliche Verzehr von GLS-haltigen Lebensmitteln wie Radieschen, Rüben, Rucola, Kohlrabi, Brokkoli, Blumenkohl sowie Senf und Rapsöl ist abhängig von den individuellen Essgewohnheiten, der geographischen Lage und der Jahreszeit. Ein erhöhter GLS-Gehalt in Kohl- und Rübengemüse ist für deren typisches Aroma verantwortlich, während der scharfe Geschmack von Senf auf das aliphatische GLS Sinigin und deren Abbauprodukte zurückzuführen ist [194]. Der bittere bis scharfe Geschmack und der stechende Geruch von Meerrettich und Senf sowie das charakteristische Aroma vielzähliger Kreuzblütler-Gemüse wie Brokkoli, Rotkohl und Rosenkohl ist im Wesentlichen auf die ITC zurückzuführen, die als charakteristische Geruchs- und Geschmacksstoffe der *Brassicales*-Pflanzen gelten [10,194]. Sie stellen gemeinsam mit weiteren enzymatischen Abbauprodukten der GLS die eigentlich biologischen wirksamen Substanzen dar.

4.3.4.1 Positive Eigenschaften auf den menschlichen Organismus

Obwohl die GLS und ihre Hydrolyseprodukte keinen Nährstoffcharakter besitzen, verfügen sie neben den Funktionen als Geschmacks- und Aromastoffe in pflanzlichen Nahrungsmitteln über eine Vielzahl an physiologischen Wirkungen. Die pharmakologischen Wirkungen sowie nahezu alle biologischen Aktivitäten der GLS sind auf die eigentlich wirksamen, bioaktiven Hydrolyseprodukte der Thiocyanate, Indole und den ITC zurückzuführen [13,14]. Die bioaktiven Substanzen gelten als besonders wichtig für die Ernährung und Gesundheit von Tieren und Menschen [200]. Besonders den ITC wird aufgrund ihrer hohen Reaktivität ein großer Einfluss auf diverse physiologische Prozesse zugeschrieben [14]. In mehreren Studien wurde dokumentiert, dass die ITC vielzählige positive Eigenschaften und Funktionen aufweisen, weshalb sie immer mehr in den Fokus der Forschung rücken [11,12,15–20].

Die größte Aufmerksamkeit gewinnen GLS und ihre Hydrolysprodukte, insbesondere die ITC, durch ihre potentielle antikanzerogene und chemopräventive Wirkung [13,171,217–219]. Die Entstehung und Entwicklung von Krebs ist ein komplexer mehrstufiger Prozess (Initiation, Promotion, Progression), der hauptsächlich durch exogene Faktoren verursacht wird [10,196,220]. Kanzerogene können sowohl bei der Verarbeitung oder Lagerung von Lebensmitteln entstehen, als auch bei der Metabolisierung von ursprünglich ungefährlichen, inaktiven Substanzen [171]. Die Initiation einer Zelle kann durch die Bindung eines Kanzerogen und durch eine irreversible Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) verursacht werden. Infolge eines Funktionsverlustes von regulatorischen und zellulären Einheiten, die maßgeblich entscheidend für die Proliferation und Apoptose sind, können sich initiierte Zellen in der Wachstumsphase (Promotion) vermehren. Die dritte Stufe der Kanzerogenese ist durch eine Steigerung des Wachstums und der Invasivität sowie durch eine genotypisch und phänotypische irreversible Änderung der Tumorzellen gekennzeichnet [196].

Tierexperimentelle Untersuchungen von malignen Gewebe in Nagetieren aus Darm [221], Prostata [222], Brustdrüse [223,224], Leber, Lunge [225] und Pankreas [226–228] zeigten, dass die Tumorentstehung (Kanzerogenese) im frühen und späterem Stadium durch subtoxische Mengen von GLS-Hydrolyseprodukten gehemmt werden konnte [10,219]. Diese Erkenntnisse werden unterstützt von Ergebnissen aus epidemiologischen Studien am Menschen, die zeigten, dass der Verzehr von *Brassicaceae*-Gemüse mit einem reduzierten Risiko an bestimmten Krebsarten, darunter Lungen-, Brust-, Prostata-, Blasen-, Magen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs aber auch an Herz-Kreislaufstörungen, zu erkranken einhergeht [10,171,184,196,220,229–251]. Verschiedene Studien bestätigten, dass die Inhibition der Kanzerogenese oder die Induktion der Apoptose auf die Wirkung der ITC zurückgeführt werden kann [221,252–256]. Ein besonders hohes antikanzerogenes Potenzial wird Benzylisothiocyanat (BITC), Phenethylisothiocyanat (PEITC) und Sulforaphan zugeschrieben [218,257].

Bislang ist der Mechanismus der Krebsprävention durch ITC noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass ITC in verschiedenen Stadien der Kanzerogenese wirksam sein können und eine Kombination verschiedener Wirkungen resultieren [196,220]. Untersuchungen zeigten, dass ITC die Umwandlung lipophiler Stoffe in hydrophile Stoffe (Biotransformation) unterstützen können, indem sie Phase-I-Enzyme hemmen und Phase-II-Enzyme aktivieren [10,237]. Vermutlich konkurrieren ITC mit hydrophoben Fremdstoffen (Xenobiotika/Prokarzinogene) um die Bindung an das aktive Zentrum der Phase-I-Enzyme. Die Aufgabe der Phase-I-Enzyme besteht darin inaktive Kanzerogene durch Funktionalisierungsreaktionen zu reaktiven elektrophilen Verbindungen (biologisch wirksame Kanzerogene) umzuwandeln. Hierdurch werden die Xenobiotika aktiviert und können aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit körpereigenen Substanzen wie der DNA oder Proteinen interagieren, wodurch ihnen eine nennenswerte Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren zu kommt [184,218,258]. Indem die ITC irreversibel an die Enzyme binden und gegebenenfalls strukturelle und funktionelle Änderungen des Enzyms verursachen, können sie die Aktivierung der Krebs fördernden Substanzen zu biologisch wirksamen Kanzerogenen verhindern und deren Entgiftung fördern [14,220,258–262]. Die ITC induzierte (kompetitive) Hemmung der Phase-I-Enzyme führt zur Reduktion der Bildung von Karzinogener und geht mit einer Abnahme mutagener Prozesse, die zur Zellinitiation führen, und einem vermindertem kanzerogenen Potential einher [196,241,263]. Ein weiterer chemopräventiver Mechanismus der ITC ist die Aktivierung der Phase-II-Enzyme, die bereits aktivierte Kanzerogene aus dem Phase-I-Metabolismus zu inaktiven wasserlöslichen (hydrophilen) Konjugaten umwandeln, sodass sie leichter über den Urin ausgeschieden werden können. Hierdurch kann die Zelle vor einer Initiation geschützt und die Entgiftung von Kanzerogenen gesteigert werden [39,184,264,265]. Die Aktivierung der Enzyme erfolgt über den kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE)-Signalweg [196,266,267]. Dabei wird auf einen im Cytosol vorliegenden Komplex bestehend aus einem Redox-regulierten Transkriptionsfaktor Nrf2 und einem Inhibitorprotein Keap1 Einfluss genommen [266–268]. Durch die Bindung von Nrf2 an Keap1 wird die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern gehemmt. Indem ITC als potenter Induktor der Nrf2-Signalkaskade beispielsweise an die Thiolgruppen von Keap1 bindet und diese zu Thiolacyladdukten umwandelt, wird der Nrf2-Keap1-Komplex gelöst. Durch die Freisetzung von Nrf2 kann es in den Zellkern translozieren, mit sogenannten small Maf-Proteinen dimerisieren und an das ARE in der Promotorbindungsregion von Genen, die sowohl Phase-II- als auch antioxidative Enzyme codieren, binden [177,237,266,267,269]. Folglich kommt es zur Initiierung der Transkription von Nrf2-Zielgenen, darunter die NADPH:Chinon-Oxidoreduktase, Hämoxygenase-1 und Glutathion-S-Transferase [14,269,270]. Die Glutathion-S-Transferase beispielsweise katalysiert die Bindung von freiem Glutathion an bereits aktivierte Kanzerogene, wodurch diese in inaktive hydrophile Substanzen umgewandelt und ausgeschieden werden können [10,14,39,184,218,237,264,265,271,272]. Der Schutz vor Karzinogenen durch ITC beruht auf der Aktivierung des Nrf-Signalweges und stellt eine vielversprechende Strategie zur Prävention von Krebs dar [220]. In Abhängigkeit der Struktur der ITC zeigten sich signifikante Unterschiede im Potential zur Aktivierung der Phase-II-Enzyme. Sulforaphan zeigte ein stärkeres Vermögen in die Biotransformation einzugreifen als beispielsweise PEITC und BITC [192,255,273]. Auch Allylisothiocyanat (AITC) besitzt die Fähigkeit über den Nrf2-abhängigen Signaltransduktionsweg Phase-II- und antioxidative Enzyme zu induzieren [274].

Aus vielzähligen Untersuchungen ergaben sich neben der Inhibition von Phase-I-Enzyme und der Aktivierung von Phase-II-Enzymen weitere chemopräventive Wirkmechanismen der ITC, darunter die Erhöhung des zellulären Glutathionspiegels, die Hemmung der Proliferation und Differenzierung von (onkogenen) Zellen durch die Regulierung des Zellzyklus sowie die Förderung der Apoptose [14,256,275–281]. Die Exposition von ITC zeigte eine hemmende Wirkung auf die Telomerase, die eine kontinuierliche Zellteilung bewirkt und daher an einem unkontrollierbaren Wachstum von Tumorzellen im Körper beteiligt ist [254]. Es wird angenommen, dass eine Konjugation von ITC an intrazellulären Proteinen und die Einflussnahme auf Mitochondrien den Zelltod fördern [282,283]. Studien zeigten ein hohes apoptotisches Potential für BITC, AITC, und Sulforaphan [217,279,284,285].

Zu tumorfördernden Stimuli gehören neben Wachstumsfaktoren auch Hormone und Entzündungen. Vielzählige Studien berichteten über eine entzündungshemmende zelluläre Wirkung der ITC. Durch die Modulation von Proteinen und Enzymen, die an Autoimmunerkrankungen, inflammatorischen Prozessen und an der Krebsentstehung beteiligt sind, können ITC Entzündungsprozesse effektiv hemmen [20,218,267,280,281,286,287]. Da Entzündungen häufig als Ursache für Tumorerkrankungen gelten, ist besonders deren Therapie von hoher Wichtigkeit [10]. Weiterhin zeigten in vitro Untersuchungen eine antibakterielle [19,288] und antidiabetogene Wirkung der ITC [12]. In einer Studie von Winter et al. (1954) konnte nach einer Nahrungsaufnahme von Kapuzinerkresse eine antibiotische Wirkung des Urins festgestellt werden, weshalb auch von einer *in vivo* Wirksamkeit ausgegangen wird [289]. Einige Arzneimittel bestehend aus Meerrettichwurzeln und Kapuzinerkresse werden bereits zur Therapie von Harnwegs- und Atmenwegsinfektionen eingesetzt. Sulforaphan wirkt *in vitro* antibakteriell gegenüber *Helicobacter pylori*, der eine Ursache für die Entstehung von Magenkarzinomen darstellen kann [237,264,290]. Papi et al. (2008) führten die antioxidative Wirksamkeit der ITC darauf zurück, dass deren Schwefelatom in der Seitenkette Hydrogenperoxide und andere Radikale quencht, wodurch die Anzahl der reaktiven Sauerstoffspezies, die als Initiatoren der Krebsentstehung gelten, reduziert werden könnte [291].

Es stellt sich die Frage, ob die Erkenntnisse aus *in vivo/in vitro* Studien auf die Wirkung im menschlichen Körper übertragen werden können. Dabei ist wichtig zu hinterfragen, ob die normale Verzehrmenge an Brassica-Gemüse für die beschriebenen Effekte ausreicht oder ob eine pharmakologische Anwendung reiner ITC notwendig ist.

4.3.4.2 Negative physiologische Wirkungen

Obwohl bereits protektive physiologische Wirkungen der ITC nach dem Konsum von Brassica-Gemüse dokumentiert wurden, werden vermehrt potentielle Risiken der GLS und deren Abbauprodukte für die menschliche Gesundheit diskutiert [196].

In vitro Studien konnte eine genotoxische Aktivität der ITC feststellen. Der genaue Mechanismus ist zwar noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird angenommen, dass aufgrund der hohen Elektrophilie der ITC Addukte mit der DNA gebildet und somit Mutationen und Schäden induziert werden können [220,292– 295]. Eine weitere *in vitro* Studie zeigte, dass einige ITC durch die Bildung von *N*-Nitroso-Derivaten mutagene Wirkungen aufwiesen [265]. Weiterhin könnten
einzelne ITC zu einer erhöhten Induktion der Mikronuklei in menschlichen Hepatomzellen führen, was ein erhöhtes Wachstum zur Folge hat [296]. Zellkulturexperimente zeigten, dass ITC in hohen Konzentrationen im Verdacht stehen prooxidativ zu wirken, allerdings müssen vergleichbare Effekte nicht zwangsläufig *in vivo* auftreten [220,297]. Darüber hinaus wurde eine allergische Reaktion bei Hautkontakt von Neoprenanzügen, die ITC enthielten, beobachtet. Es wurde angenommen, dass infolge der Modifizierungsreaktion zwischen Hautproteinen und ITC immunologische Reaktionen ausgelöst werden können [298].

Die potenziellen Risiken für die menschliche Gesundheit stehen insbesondere der antikanzerogenen Wirkung der ITC entgegen und müssen kritisch hinterfragt werden [196]. Vor allem unter dem Hintergrund, dass aufgrund der Annahme der antikanzerogenen Aktivität ein erhöhter Konsums ITC-reicher Lebensmittel und unter Umständen sogar eine Supplementierung mit reinem ITC erfolgen könnte [294]. Während die normale Verzehrmenge von Brassica-Gemüse keine toxischen Wirkungen beim Menschen auslösen soll und die genotoxische Aktivität in *in vivo* Untersuchungen schwächer ausgeprägt waren, muss sichergestellt werden, dass keine ähnlichen Effekte beim Konsum erhöhter ITC-Dosen auftreten. Zukünftig muss eine minimale und maximale Verzehrmenge ermittelt sowie toxikologische Untersuchungen durchgeführt werden, um die gesundheitliche Sicherheit und Akzeptanz gewährleisten und eine Gefahr von unerwünschten Reaktionen bei Aufnahme einer erhöhten ITC-Dosis vermeiden zu können [196,294].

4.4 Isothiocyanate

4.4.1 Metabolisierung und Ausscheidung

Nach der Nahrungsaufnahme von ITC-reichen Lebensmitteln erfolgt deren Aufnahme in den menschlichen Organismus passiv über die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes [197,299]. Aufgrund der hohen Lipophilie der ITC erfolgt die Resorption relativ schnell, sodass innerhalb weniger Stunden eine maximale Konzentration im Blut erreicht wird [14,299].

Nach der Resorption wird ein Großteil der ITC spontan oder enzymatisch durch die Glutathion-S-Transferase, die im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert ist, an intrazelluläre Thiole konjugiert [297,300]. Indem die Glutathion-S-Transferase den nucleophilen Angriff des Tripeptids Glutathion (GSH) über seine Thiolgruppe am elektrophilen, zentralen Kohlenstoffatom des ITC begünstigt, werden Glutathion-Dithiocarbamate gebildet [301]. Nach der Konjugation an GSH erfolgt die Metabolisierung über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg [300,302]. Dieser dient der Umwandlung aufgenommener Xenobiotika in hydrophile Verbindungen, die anschließend leichter ausgeschieden werden können [273,300,302]. Die entstandenen GSH-Konjugate werden in mehreren enzymatischen Reaktionen metabolisiert [302]. γ -Glutamyltranspeptidasen katalysieren die Übertragung einer

Glutamyleinheit auf einen Aminosäureakzeptor, wobei unter Abspaltung von Glutaminsäure ein Cysteinglycinkonjugat resultiert. Anschließend erfolgt durch die Cysteinylglycinase eine Abspaltung eines Glycinrestes und die Umwandlung zu einem Cysteinkonjugat, welches durch Acetyltransferasen zur entsprechenden Mer-(*N*-Acetyl-*L*-Cystein-Dithiocarbamate) captursäure verstoffwechselt wird [273,300,302,303]. Die Exkretion der ITC erfolgt vorwiegend renal als entsprechende Mercaptursäure oder als Cysteinkonjugat [177,304]. Neben der renalen Exkretion der ITC können die Stoffwechselmetabolite oder freien ITC aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit auch über die Atemluft ausgeschieden werden [305–307]. Tierexperimentelle Versuche zeigten, dass eine Ausscheidung der ITC auch über Fäzes möglich ist, wobei diese Exkretion mengenmäßig eine untergeordnete Rolle spielt [300]. In Abhängigkeit der verschiedenen Spezies, des Alter und des Geschlechts, aber auch in Abhängigkeit der strukturellen Eigenschaften der ITC gibt es Unterschiede in deren Metabolismus [300,303,308]. Da die Konjugation von ITC an Thiolgruppen reversibel ist und maßgeblich vom pH-Wert determiniert wird, können die instabilen Stoffwechselmetabolite wieder zu freien ITC dissoziieren. Die reversible Konjugation der ITC an Thiolgruppen sorgt dafür, dass dissoziierte ITC für neue Reaktionen mit anderen nucleophilen Gruppen zur Verfügung stehen [184,273]. Die Verstoffwechselung der ITC erfolgt somit nicht chronologisch und hat zur Folge, dass die Stoffwechselmetabolite länger und zeitgleich im menschlichen Organismus vorliegen [304]. Während saure pH-Werte nur im geringen Maße zur Dissoziation der ITC führen, begünstigen basische Bedingungen die Abspaltung [304]. Aufgrund des neutralen bis leicht basischen pH-Wertes des Urins, können daher freie ITC im Urin nachgewiesen werden [309].

4.4.2 Bioverfügbarkeit

Die Definitionen der Bioverfügbarkeit sind ambivalent. Während die Bioverfügbarkeit aus ernährungsphysiologischer Sicht die Menge eines Nährstoffs beschreibt, die aus der Nahrung verwertet, resorbiert und metabolisiert wird, berücksichtigen andere Definitionen ebenfalls die Verdauung, Verteilung und Speicherung im Körper sowie die Lebensmittelmatrix [310,311]. Gemäß der *Food and Drug Administration* (FDA) beschreibt die Bioverfügbarkeit die Menge und die Geschwindigkeit, mit der ein therapeutischer Stoff resorbiert wird und zum Zielort gelangt [299,312].

Die Bioverfügbarkeit von GLS und ITC im menschlichen Organismus wird von der Metabolisierung aber auch von der Zusammensetzung der Lebensmittelmatrix sowie deren Verarbeitung, Zubereitung und Lagerung bestimmt [313,314].

In einer Humanstudie konnte gezeigt werden, dass nach dem Verzehr von einer gleichen Menge an GLS und dem korrespondierendem ITC, letztere eine höhere Metabolisierungsrate als die intakten GLS aufwiesen [315]. Weitere Ergebnisse aus früheren Studien konnten feststellen, dass während einer Lebensmittelverarbeitung eine teilweise oder vollständige Inaktivierung der Myrosinase ausschlaggebend für eine verminderte Bioverfügbarkeit der GLS und ITC ist [219,316,317].

Verschiedene Prozessbedingungen wie Lagerzeit, Temperatur, Verpackung unter Schutzatmosphäre sowie die Inaktivierung der Myrosinase sind hierbei entscheidend [314,317]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass frischer, roher Brokkoli eine höhere Bioverfügbarkeit von ITC im Vergleich zu gekochtem Brokkoli besitzt [219,318]. Weiterhin konnte in Abhängigkeit von der Dauer und der Temperatur beim Kochen oder beim Erwärmen in der Mikrowelle eine Reduktion des Gehaltes an GSL festgestellt werden [314,316]. Dem hingegen führten Cieslik *et al.* (2007) die Reduktion des GLS-Gehaltes von gekochten GLS-haltigen Lebensmitteln gegenüber frischen Pflanzenmaterial nicht auf die Inaktivierung der pflanzlichen Myrosinase zurück, sondern nannten als Ursache den Übergang wasserlöslicher GSL in das Kochwasser [319]. Das Dampfgaren von Lebensmitteln stellt eine der schonendsten Zubereitungsmethode dar, die verhindert, dass die Myrosinase inaktiviert wird und GLS in das Kochwasser ausgewaschen werden [320,321]. Auch die Zubereitung einer Brokkolisuppe aus triefgefrorenem und frischem Brokkoli zeigte deutliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der GLS [322].

Ein weiterer wichtiger Parameter, der die Bioverfügbarkeit von GLS und ITC beeinflussen kann, stellt die Lebensmittelmatrix dar. Aufgrund der hohen Reaktivität der ITC ist beispielsweise eine irreversible Bindung mit nucleophilen Seitenketten von Lebensmittelproteinen denkbar. Die konjugierten ITC können nicht mehr resorbiert und über den klassischen Stoffwechselweg metabolisiert werden, wodurch die Bioverfügbarkeit der GLS und ITC reduziert werden kann [22,323].

4.5 Wechselwirkungen von Isothiocyanaten mit Proteinen

Aufgrund der Struktur bzw. der funktionellen Gruppe (-N=C=S) der ITC besitzen sie stark elektrophile Eigenschaften am zentralen Kohlenstoffatom, die eine Reaktion mit Nucleophilen begünstigt. Besonders große Aufmerksamkeit gewinnt die Reaktion von ITC mit nucleophilen Gruppen von Proteinen, da signifikante Änderungen in den Proteineigenschaften und in der Lebensmittelmatrix resultieren können. Die Thiol- und Aminogruppen in den Seitenketten der Proteine können als Elektronendonatoren fungieren und zählen zu den wichtigsten Reaktionspartnern der ITC [183,196,224,324]. Eine Konjugation der ITC mit Hydroxylgruppen unter Bildung von Carbamaten ist ebenfalls denkbar, allerdings wird auf diese wenig in der Literatur eingegangen [21,22,183,224,324].

Die Abbildung 9 zeigt die Reaktion von einem ITC mit den Thiol- und Aminogruppen der Aminosäuren Cystein und Lysin. Die Reaktionen mit Thiolgruppen führen zur Ausbildung von Dithiocarbamaten, wohingegen aus der Konjugation an die Aminogruppe Thioharnstoffe hervorgehen [39]. Mehrere Studien beschäftigten sich mit der kinetischen Untersuchung der Reaktion zwischen ITC und den nucleophilen Gruppen in Proteinseitenketten und konnten zeigen, dass die Kinetik vom pH-Wert, der ITC-Struktur und dem nucleophilen Reaktionspartner bestimmt wird. Beispielsweise konnten Drobnica *et al.* (1965) feststellen, dass eine geringe Elektronendichte am zentralen Kohlenstoffatom der ITC die Reaktivität verbessert. Während kleine, elektroziehende Gruppen an der ITC-Seitenkette die Elektrophilie und somit die Reaktivität des ITC erhöhen, führen große Gruppen zu sterischen Hinderungen, was eine verminderte Reaktivität zur Folge hat [325,326]. Weiterhin konnten bei der Reaktion der ITC mit Thiol- und Aminogruppen erhebliche Reaktivitätsunterschiede dokumentiert werden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Reaktion der ITC mit Thiolgruppen um das Tausendfache schneller abläuft als die Reaktion mit Aminogruppen. Jedoch gehen aus der Reaktion mit den Thiolgruppen irreversible Reaktionsprodukte (Dithiocarbamate) hervor, wohingegen die Bildung der Thioharnstoffe irreversibel ist [326,327].



Abbildung 9. Reaktion von ITC mit Thiol- und Aminogruppen der Aminosäuren Cystein und Lysin unter Ausbildung von Dithiocarbamat und Thioharnstoff. In Anlehnung an [15].

Obwohl die ITC im Lebensmittel bei lebensmittelrelevanten pH-Werten von 4-8 mit den nucleophilen Gruppen der Proteinseitenketten interagieren, gibt es pHabhängige Unterschiede in der Reaktivität. Allgemein gilt, dass ein hoher pH-Wert nucleophile Additionen begünstigt, da die ITC mit der dissoziierten Form der Amino-, Thiol- und Hydroxylgruppe (freie Basen) bevorzugt reagieren [327–329]. Während eine Reaktion mit Aminogruppen mindestens neutrale Bedingungen erfordert [22,23], kann die Bildung der Dithiocarbamate aus der Reaktion mit Thiolgruppen von Aminosäuren auch im sauren Milieu stattfinden [23,328]. Weiterhin konnten Stabilitätsunterschiede der Reaktionsprodukte in Abhängigkeit des pH-Wertes festgestellt werden. So zeigen Thioharnstoffe als Reaktionsprodukte eine pH-unabhängige Stabilität, wohin gegen die Dithiocarbamate nur im sauren Milieu stabil sind [304,323].

4.5.1 Bedeutung von Proteinderivaten im Lebensmittel

Neben den biologischen Funktionen im menschlichen Organismus besitzen Proteine als Lebensmittelkomponenten wichtige nutritive und funktionelle Eigenschaften [64]. Grundsätzlich bilden Proteine die strukturelle Basis für verschiedene funktionelle Lebensmitteleigenschaften und beeinflussen die biologische und nutritive Charakteristik eines Nahrungsmittels [64,65]. Die Eigenschaften von Proteinen werden durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der zugrundeliegenden Aminosäuren (Aminosäurezusammensetzung und -sequenz), der Molmasse und der dreidimensionale Struktur/Konformation bestimmt [61,65]. Weiterhin können die vorherrschenden Bedingungen bei dem Anbau, der Haltung, der Pflege (Klima, Umwelt, Kontaminanten, Pestizide, etc.), der Ernte und Schlachtung (Stressfaktoren, Technologie, usw.), der Verarbeitung (physikalische und chemische Bedingungen), der Zubereitung sowie dem Transport und der Lagerung von Lebensmitteln Einfluss auf die Struktur und Eigenschaften der enthaltenen Proteine haben [64]. Besonders die lebensmitteltechnologischen Verarbeitungsprozesse (z.B. Erhitzen, Gefrieren, pH-Wert, chemische Derivatisierung oder enzymatische Modifikation) und die direkte Umgebung der Proteine spielen in dieser Hinsicht eine entscheidende Rolle.

In komplexen Lebensmittelmatrices sind während der Herstellung, Verarbeitung, Zubereitung und Lagerung von Lebensmitteln ungerichtete Reaktionen zwischen Lebensmittelinhaltsstoffen wie bioaktiven sekundären Pflanzenstoffen und Lebensmittelproteinen unvermeidbar. Eine Reihe an Studien untersuchten bereits die kovalente Wechselwirkung zwischen Proteinen aus Milchprodukten, Pflanzen, Eiern und Fleisch, mit Polyphenolen, Phenolsäuren, Kohlenhydraten und schwefelorganischen Verbindungen. Sowohl in den Modellproteinen als auch im Lebensmittel konnten bereits kovalente ITC-Proteinkonjugate nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte in pflanzlich angereichertem Brot und Quark nach Zusatz von ITChaltiger Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) Konjugate identifiziert werden [15,24– 38].

Mit der Bildung von kovalenten Proteinderivaten können Veränderungen der Proteinstruktur und -eigenschaften einhergehen. Beispielsweise können durch die kovalente Bindung von sekundären Pflanzenstoffen an Proteine Konformations- beziehungsweise Strukturänderungen, Auf- und Entfaltungen, Denaturierungen sowie Freilegungen hydrophober Bereiche verursacht werden. In der Regel kann angenommen werden, dass eine Denaturierung des Proteins aufgrund der Freilegung hydrophober Molekülbereiche (Änderung der Hydrophobizität oder Polarität) mit einer reduzierten Löslichkeit sowie einer veränderten Quellung und Wasserbindungskapazität einhergeht. Infolge der konformativ veränderten Proteine ist eine Aggregation der Proteine möglich, woraus neue intra- und intermolekulare Bindungen resultieren können. Die infolge einer kovalenten Proteinmodifikation resultierenden Effekte können sich sowohl auf die funktionellen Eigenschaften, wie Löslichkeit, Hydrophobizität, Viskosität, Gelierung, Schaumbildung, Emulgierung, Farbe, Geruch und Geschmack, als auch auf die nutritiven und biologischen Eigenschaften der Proteine, wie der Verdaubarkeit, der biologischen Wertigkeit sowie der antigenen und antimikrobiellen Aktivität, auswirken [10,12,18,22,26,28,33,42,65,66,70,71].

Lange Zeit wurden irreversible, kovalente Bindungen von sekundären Pflanzenmetaboliten an Lebensmittelproteine als negativ angesehen, da aus ernährungsphysiologischer Sicht die Bioverfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren und der gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenstoffe reduziert und die physikalisch-chemischen Eigenschaften (wie beispielsweise die Farbe und Löslichkeit) von Proteinen verändert werden können [9,15,17,21,25,27,32,40,46]. Immer mehr konzentrieren sich aktuelle Forschungsarbeiten darauf, die positiven Auswirkungen derartiger Proteinmodifikationen, wie zum Beispiel ein verbessertes Emulgiervermögen oder eine verminderte allergene/antigene Aktivität, hervorzuheben und die kovalente Addition von natürlichen, elektrophilen Pflanzenstoffen an Proteine zu nutzen, um zielgerichtet die Struktur, Eigenschaften und Funktionalität der Proteine zu modifizieren [16,17,36,41–43,65,331].

5 Problemstellung und Zielsetzung

Die Folgen kovalenter Proteinmodifikationen sind vielfältig und komplex, sodass zuverlässige Vorhersagen oder Abschätzungen der Konsequenzen auf die Struktur, Eigenschaften und Funktionen der modifizierten Proteine schwierig sind. Allerdings ist die Kenntnis über die Auswirkungen kovalenter Proteinmodifikationen fundamental für die Lebensmittelchemie und -technologie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll eine kovalente Addition des bioaktiven Metaboliten Benzylisothiocyanat (BITC), einem Abbauprodukt des Glucosinolats Glucotropaeolin, an das Molkenprotein α -Lactalbumin (α -LA) realisiert und analytisch charakterisiert werden. Da die Eigenschaften und Funktionalitäten der Proteine von ihrer dreidimensionalen Struktur abhängen, sind genauere Informationen über den Einfluss der kovalenten Proteinmodifikationen auf molekularer Ebene von hoher Relevanz. Vor diesem Hintergrund ist die strukturelle Charakterisierung von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA elementar, um die Auswirkungen der kovalenten Proteinmodifikation auf die Eigenschaften und Funktionen von α -LA abschätzen, zukünftig vermeiden oder sogar nutzen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung von BITC-modifiziertem α -LA im Hinblick auf die Veränderungen der molekularen Struktur sowie der physikochemischen (Hydrophobizität, Löslichkeit, Polarität, etc.) und den biologischen Eigenschaften des Proteins, wie die Verdaubarkeit und die Antigenität.

Hierfür soll zunächst die molekulare Struktur von unmodifiziertem und BITCmodifiziertem α -LA mittels Zirkulardichroismus- (CD-)Spektroskopie, Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure- (ANS-)Fluoreszenz und dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht werden. Die CD-Spektroskopie lässt eine Schätzung der Anteile der Sekundärstrukturelemente zu, während die ANS-Fluoreszenz zur Bewertung von Konformationsänderungen und zur Charakterisierung von hydrophoben Bereichen auf der Proteinoberfläche dient. Mit Hilfe der DLS soll die Größe beziehungsweise der hydrodynamische Radius der BITC-Proteinaddukte sowie deren Aggregationsverhalten bestimmt werden. Zur Quantifizierung der Reaktion von BITC mit α -LA sollen die freien Aminogruppen vor und nach der BITC-Konjugation mit Hilfe von o-Phthaldialdehyd (OPA) spektrophotometrisch bestimmt werden.

Da das Molkenprotein α -LA zu einem der wichtigsten Hauptallergene der Kuhmilch gehört, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Konsequenzen der BITC-induzierten strukturellen Veränderung auf die Epitopstrukturen und damit auf die antigenen Eigenschaften des Modellproteins abzuleiten. Hierbei liegt der Fokus sowohl auf der Analyse der antigenen Aktivität von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA sowie auf der Untersuchung der Restantigenität der entsprechenden tryptischen Proteinhydrolysate. Die Analyse der entsprechenden Peptide darf nicht vernachlässigt werden, da relevante Epitope in den Proteolyseprodukte erhalten bleiben können. Zu diesem Zweck soll eine immunologische Analyse mit Hilfe einer Effekt-gerichteten Detektionsmethode unter Einsatz von Antikörpern nach dünnschichtchromatographischer Trennung angewandt werden, eine kombinierte Strategie aus der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) und der Immunfärbung (IF).

Darüber hinaus soll das proteolytische Abbauverhalten von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA durch Trypsin mit Hilfe der ein- (1D-) und zwei-(2D-)dimensionalen HPTLC sowie der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert und bewertet werden. Es sollen Rückschlüsse auf BITC-induzierte Unterschiede im chromatographischen Verhalten, in der Protein-/Peptidpolarität und der enzymatischen Verdaubarkeit durch Trypsin gezogen werden. Mit Hilfe der 2D-HPTLC soll eine verbesserte Trennung der komplexen Peptidgemische und eine optimierte Differenzierung von Proteinmodifikationen im Vergleich zur 1D-HPLTC erzielt werden. Zusätzlich soll durch die HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der genaue Reaktionsort von BITC in der Aminosäuresequenz identifiziert werden.

6 Kumulativer Teil der Dissertation

Die Ergebnisse der Dissertation werden nachfolgend in Form von wissenschaftlichen Fachpublikationen dargestellt.

Die Veröffentlichungen umfassen die Synthese und Charakterisierung der Addukte zwischen dem bioaktiven Metaboliten Benzylisothiocyanat (BITC) und dem Molkenprotein α -Lactalbumin (α -LA). Es werden die Erkenntnisse aus den Untersuchungen hinsichtlich der Änderungen der molekularen Struktur von α -LA infolge der kovalenten Konjugation von ITC beschrieben. Weiterhin beinhalten die Publikationen die Analyse der Antigenität von BITC-modifiziertem und unmodifiziertem α -LA sowie der Restantigenität der jeweiligen tryptischen Peptide. Zusätzlich werden die Ergebnisse der statistischen Analyse zur Validierung der HPTLC-IF-Methode erläutert. Abschließend werden die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA durch Trypsin dargestellt, die mit Hilfe der 1D-, 2D-HPTLC und der HPLC-ESI-MS/MS analysiert wurden.

Die Mitwirkenden sind jeweils in den Autorenangaben aufgeführt und eine Zusammenarbeit mit anderen Instituten ist in den entsprechenden Publikationen kenntlich gemacht.

Die Publikationen wurden in den Fachzeitschriften *Molecules* und *Journal of Chromatography B* veröffentlicht.

6.1 Publikation I

Immunological analysis of isothiocyanate-modified α -lactalbumin using high-performance thin layer chromatography

Jenny Spöttel, Johannes Brockelt, Svenja Badekow, Sascha Rohn

Molecules 26(7), 1842

Impact Factor: 4.411 (2020)

Synopse

Molkenproteine stellen aufgrund ihrer funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften wichtige Lebensmittelzutaten dar. α -LA ist aus quantitativer Sicht das zweithäufigste Molkenprotein und besitzt eine Reihe an positiven physiologischen Wirkungen. Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass α -LA als eines der wichtigsten Hauptallergene in der Kuhmilch das Potential besitzt bei empfindlichen Menschen eine allergische Reaktion auszulösen. Um das Problem der Milchallergie zu lösen, widmeten sich bereits vielzählige Studien der Entwicklung von Maßnahmen oder Strategien zur Kontrolle und Reduktion der Allergie. Dem Trend folgend, proteinreiche Lebensmittel wie Milch- und Molkenprodukte mit glucosinolatreichen Zutaten anzureichern, könnte eine irreversible Wechselwirkung zwischen Proteinen und ITC mit einer gezielten Änderung der Proteinstruktur und -eigenschaften einhergehen, die durchaus auch einen Einfluss auf die antigenen Eigenschaft des Proteins haben kann.

Gegenstand der vorliegenden Publikation war die Untersuchung von Konjugaten bestehend aus dem Molkenprotein α -LA und dem bioaktiven Metaboliten aus *Bras*sicaceae-Gemüse, BITC. Ziel war es die Antigenität der BITC-modifizierten und unmodifizierten Proteine abzuschätzen und zu vergleichen. Weiterhin wurde die Restantigenität der Proteinhydrolysate nach tryptischer Hydrolyse auf das Vorhandensein von Epitopen untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine kombinierte Strategie aus der HPTLC und der Immunfärbung (IF) angewandt und validiert. Die Methodik dieser Publikation nutzt Antikörper als hochspezifisches Detektionswerkzeug, um Aussagen über die Antikörperbindungseigenschaften einzelner Proteine zu treffen. Nach der chromatographischen Trennung der Proben konnten die Analyten durch einen Protein-Antigenitäts-Assay direkt auf der Platte nachgewiesen werden. Mit Hilfe der HPTLC-IF-Methode konnten sowohl Aussagen über die Antigenität der Proteine als auch über die Restantigenität der tryptischen Peptide gemacht werden. Die Validierung der HPTLC-IF-Methode wurde in Anlehnung an die Empfehlung der *Food and Drug Administration* durchgeführt und umfasste die Bestimmung der Linearität, Präzision, Genauigkeit, Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ).

Alle Arbeiten dieses Forschungsprojektes wurden an der Universität Hamburg durchgeführt. Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt 60 %.





Article Immunological Analysis of Isothiocyanate-Modified α-Lactalbumin Using High-Performance Thin Layer Chromatography

Jenny Spöttel¹, Johannes Brockelt¹, Svenja Badekow¹ and Sascha Rohn^{1,2,*}

- ¹ Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; jenny.spoettel@chemie.uni-hamburg.de (J.S.); johannes.brockelt@web.de (J.B.); svenja.badekow@studium.uni-hamburg.de (S.B.)
- ² Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Technische Universität Berlin, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin, Germany
- Correspondence: rohn@tu-berlin.de; Tel.: +49-30-314-72583

Abstract: Undirected modifications between food proteins and secondary plant metabolites can occur during food processing. The results of covalent interactions can alter the functional and biological properties of the proteins. The present work studied the extent of which covalent conjugation of the bioactive metabolite benzyl isothiocyanate (BITC; a glucosinolate breakdown product) to the whey protein α -lactal burnin affects the protein's allergenicity. Additional to the immunological analysis of native untreated and BITC-modified α -lactalbumin, the analysis of antigenic properties of proteolytically digested protein derivatives was also performed by high performance thin layer chromatography and immunostaining. As a result of the chemical modifications, structural changes in the protein molecule affected the allergenic properties. In this process, epitopes are destroyed or inactivated, but at the same time, buried epitopes can be exposed or newly formed, so that the net effect was an increase in allergenicity, in this case. Results from the tryptic hydrolysis suggest that BITC conjugation sterically hindered the cleavage sites for the enzyme, resulting in reduced digestibility and allergenicity. Residual antigenicity can be still present as short peptide fragments that provide epitopes. The desire to make food safer for allergy sufferers and to protect sensitized individuals from an allergenic reaction makes it clear that the detection of food antigens is mandatory; especially by considering protein interactions.

Keywords: whey proteins; allergenicity; α-lactalbumin; isothiocyanates; protein modifications; protein antigenicity; peptide antigenicity; HPTLC immunostaining; food processing

1. Introduction

Interactions between proteins and secondary plant metabolites occur frequently in nature, and can also arise during food production and processing. The effects of covalent protein modifications are diverse and can influence protein folding and structure as well as various biological (hydrolysis, antigenic and antimicrobial activity), and technofunctional and functional properties such as viscosity, gelation, foaming, solubility, emulsification, color, odor, and taste [1]. From a physiological point of view, a conjugation of secondary plant metabolites or their degradation products with dietary proteins may reduce the availability of the health-promoting secondary metabolites or decrease the bioavailability of essential amino acids [2]. However, covalent addition of natural, hydrophobic, electrophilic plant compounds is also considered a promising method to specifically affect protein functionality [3–6]. In this respect, a bunch of studies have already studied the functional and biological properties of proteins by their modification with secondary plant metabolites. For example, it was reported that a covalent interaction of selected polyphenols with the whey protein β -lactoglobulin (β -LG) altered its functional properties and reduced its allergenic



Citation: Spöttel, J.; Brockelt, J.; Badekow, S.; Rohn, S. Immunological Analysis of Isothiocyanate-Modified α-Lactalbumin Using High-Performance Thin Layer Chromatography. *Molecules* **2021**, *26*, 1842. https://doi.org/10.3390/ molecules26071842

Academic Editors: Tuba Esatbeyoglu and Banu Bayram

Received: 1 March 2021 Accepted: 22 March 2021 Published: 25 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). activity [7]. Rade-Kukic et al. (2011) concluded that binding of isothiocyanates to β -LG changed the protein's folding and structure, improving its technofunctional properties such as heat aggregation, foam formation, and emulsification [3]. Almost a handful of studies confirmed the change in the secondary and tertiary structure of proteins as a result of isothiocyanate (ITC) conjugation [6,8–11]. ITC are degradation products of glucosinolates, which are mainly found in Brassicales plants such as broccoli, cauliflower, brussels sprouts, and cabbage and are associated with various health-promoting properties (e.g., antibacterial, anti-inflammatory, and antidiabetogenic activity) [2,4,6,12–16]. Due to their functional group, isothiocyanates possess a high electrophilicity at the carbon atom, which makes a reaction with nucleophiles conceivable. The electrophilic center of ITC reacts with thiol and amino groups in the side chains of proteins to form thiocarbamates and thioureas [17–19]. Keppler et al. (2017) showed that covalent conjugation of allyl isothiocyanate (being a degradation of the glucosinolate sinigrin) to a whey protein isolate significantly affected the physicochemical properties such as charge, aggregation, surface hydrophobicity, and secondary structural features of the protein, depending on pH value [6]. It was also shown that a modification of these proteins with allyl isothiocyanate had no significant effect on the antibacterial activity of this protein against different strains of Staphyolococcus aureus and Eschericha coli [6].

The reason for an intensified research on whey proteins is because of their very high nutritional quality, being due to their high content of branched, sulfur-containing, and essential amino acids in an advantageous composition. Besides their high biological value, whey proteins are characterized by their extraordinary functional properties and their solubility over a wide pH value range, making them valuable food ingredients [3,20–23]. Whey proteins include various albumins and globulins, among which α -lactalbumin (α -LA) is the second most common protein in cow's milk, accounting for 2–5% [20]. α -LA is a small, acidic protein, consisting of 123 amino acids and a molecular weight of 14.2 kDa. In addition, it is an important Ca²⁺-binding model protein and a classic example of the molten globule state. It is a component of lactose synthase [20,24]. For example, α -LA and its hydrolysates have been found to have an antihypertensive effect in hypertension [25], to contribute to stress reduction [26], and to regulate cell growth [27]. It further provides antimicrobial [28] and immunostimulatory properties [29]. Besides to the positive properties of α -LA, it is one of the main allergens in cow's milk, along with β -LG and casein [30].

In general, food allergies are mostly type 1 (immediate-type) allergies that are mediated by specific IgE antibodies bound on mast cells. Binding of the antibody to the antigen activates the mast cells and stimulates them to degranulate. There is a release of histamine and a number of other mediators of allergic inflammation [31]. Type I allergenicity of the immediate reaction is a particular immunogenicity. While immunogenicity describes the ability to induce a humoral or cellular immune response, antigenicity describes the ability to be specifically recognized by antibodies produced as a result of an immune response to the given substance or molecule [32]. A substance that is recognized by the organism as an antigen is capable of eliciting an immune response and therefore has an immunogenic potential, the extent of which depends, among other things, on the molecular size and chemical structure. In the literature it is described that immunogenic substances usually must have a molecular weight higher than 5000 Daltons and contain antigenic regions in the secondary and tertiary structure, so-called epitopes. Generally, various proteins in food can therefore have an allergenic potential, because the epitopes can be specifically recognized by antibodies and subsequently trigger an allergic reaction. The extent of immunogenicity depends on the abundance and density of the epitopes. These epitope structures of proteins can be formed as linear (sequential and continuous) or conformational (discontinuous) epitopes [33–37]. The latter are formed by the folding of spatial structures such as the secondary or tertiary conformational arrangements, while sequential epitopes are short sections of the primary structure of proteins [31,38].

Despite cow's milk being a valuable food source for humans and especially for infants, these food allergens can cause allergic reactions in sensitive people. However, there

is a growing desire to make food safer for allergic sufferers and to further investigate the problem of milk allergy. As food allergens are a widespread health problem, many investigations have been made to modify milk ingredients to reduce or eliminate their allergenic potential [39–41]. It is well known that immune-influencing properties are characterized by immunogenicity and antigenicity, being related to protein structures. Therefore, it can be assumed that modifications of proteins influence the immune properties of the native protein. In the past, the influence of various food processing such as lactic acid fermentation, glycation, heat treatment, hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis was studied [42]. The results showed that proteins can aggregate, denature, or bind to lipid structures by the aforementioned technologies. They can also be glycosylated or glycated [43]. Obviously, these processing-induced structural and chemical alterations of the proteins are accompanied by a change in immunogenicity and allergenicity [43,44]. A large part of the current state of knowledge about the influence of the food processing on protein's structure and function is based on numerous studies of model foods, in particular whey proteins from cow's milk [45]. Not all food processing has the potential to reduce milk allergenicity. Increasingly, it is reported that allergenicity may be decreased, increased, or even remain unchanged by food techniques [46]. Although knowledge in this field is constantly improving, strategies to control milk allergy have not yet been satisfactorily solved. As the processing of milk proteins can affect the protein's structure and function in various ways and thus, its allergenicity, this topic should be an important focus of future research considering a change of the allergenicity of milk proteins. In addition, there is a need for a robust and thoroughly evaluated and validated method for food allergenicity risk assessment that considers both protein digestion and protein analysis [47]. In fact, many studies focused on the investigation of the covalent interaction between whey proteins and isothiocyanates and its effect on the structural, functional, and selected nutritional properties of the proteins [3,4,6,8–11], while the studies regarding the influence on allergenic properties are insufficient [1].

However, analysis of undirected protein modifications and their implications for allergenicity is quite challenging. In contrast to other separation techniques, high performance thin layer chromatography (HPTLC) offers several advantages to study the influence of undirected posttranslational modifications that significantly affect the polarity, solubility, and respective properties of the protein. With little effort, it is possible to use different solvent systems, allowing a wide polarity range to be covered. This is supported by the variety of available chromatographic stationary phases. By varying the mobile and stationary phases, HPTLC can respond quite easily and quickly to the separation problem at hand. Biller et al. (2015) succeeded in developing a concept for the development of solvent systems, enabling intact proteins to be analyzed by HPTLC and providing a basis for the development of specific detections [48]. As the potential BITC-protein adducts described above can heavily influence the separation behavior, HPTLC separation might be advantageous. Even when not separated and remaining at the starting point, it is possible to recognize the behavior of the (modified) proteins. In a high-performance liquid chromatography (HPLC) approach, such compounds are discriminated, as they get stuck at the beginning of the analytical column or already in the pre-column. Another advantage of HPTLC compared to other separation techniques is the variety of compatible detection methods. For example, a chromatogram can be evaluated with different staining reagents, with coupling to mass spectrometry, or with a bioactivity-driven and effect-directed analysis [49–51]. The combined strategy of HPTLC followed by effect-directed detection via the specific antigen-antibody reaction, known as HPTLC immunostaining (HPTLC-IS) [52], can be used to analyze the biological function of allergenicity of proteins. The direct application of the bioassay to the analytical plate eliminates the time-consuming transfer of analytes, such as in immunoblotting, thereby further increasing the applicability of the method. Several studies already described antibody-based detection methods coupled to HPTLC: Meisen et al. (2011) succeeded in detecting glycosphingolipids [53], while Morschheuser et al. (2016) presented the detection of phosphorylated peptides using antibodies [54]. Another study by Morschheuser et al. (2017) dealt with the immunological investigation of proteins in milk after chromatographic separation [52].

A scheme of the principle of immunostaining is shown in Figure 1. After the chromatographic separation of the samples, the analytes are detected by a protein antigenicity assay directly on the HPTLC plate. The immunological staining procedure used is very similar to the indirect enzyme immunoassay. The post-chromatographic detection starts with a blocking step to avoid non-specific binding of the detection antibodies on the surface of the separation material. Afterwards, the incubation is performed with a primary antibody that has an affinity for the target protein. The primary antibody used in the present work was a polyclonal anti- α -LA antibody from the organism rabbit. The secondary antibody needs to be specific for the host animal of the primary antibody and is conjugated with an enzyme, here, horseradish peroxidase (HRP). For detection, an enzymatic conversion of the chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB) into a colored precipitate is finally performed, making the first antibody visible.



Figure 1. Schematic representation of the principle of an indirect antibody-based detection of proteins after chromatographic separation (HPTLC-IS). The primary antibody having affinity for the target protein is associated with the HRP-conjugated secondary antibody specific for the host of the primary antibody. Visualization of the ligated antibodies is achieved by the formation of a colored precipitate derived from a chromogenic substrate.

The aim of the present work was to study adducts of the whey protein α -LA and a bioactive metabolite from *Brassicaceae* vegetables, exemplarily benzyl isothiocyanate (BITC), to subsequently estimate and compare the antigenicity of the BITC-treated and untreated proteins. In addition to the analysis of protein derivatives, the study of residual antigenicity of peptides after enzymatic hydrolysis, which may still carry epitopes, should not be underestimated and was also be investigated in the present work. For this purpose, a combined strategy of HPTLC and immunostaining was applied.

2. Results

2.1. HPTLC-Immunostaining (HPTLC-IS) of Intact Proteins and Its Validation

Primarily, following the work of Morschheuser et al. [52], the HPTLC method coupled with antibody-based detection was applied to the whey protein α -LA and subsequently validated.

Initially, the linear correlation of the method used was confirmed by analyzing the standard solutions in a concentration range between 0.2 μ g and 3 μ g α -LA. The linearity was verified by means of Mandel's fitting test. These results obtained are comparable to

the linearity ranges of other HPTLC applications. For example, the HPTLC method of the antimalarial substance artemisinin showed linearity in the concentration range of 0.03–0.120 μ g [55]. Reim et al. (2015) presented an HPTLC analysis of pea saponins that showed a linear correlation in the range of 1.25–6.25 μ g [56]. For proteins, Morschheuser et al. (2016, 2017) reported a linear correlation for the range of 0.1–1 μ g lysozyme using aptamers as detecting agents [57] and a linearity between 0.075–2 μ g β -LG using an antibody-based detection [52].

Additionally, in the present study, the LOD and LOQ were also determined based on DIN standards using the calibration method (Table 1). Compared to other semi-quantitative HPTLC analyses, the results obtained were comparable. For example, Reim et al. (2015) calculated an LOD of 0.6 μ g \pm 17% and an LOQ of 2.1 μ g \pm 5% [56]. Morschheuser et al. (2016) showed a LOD and LOQ of 0.063 μ g \pm 19% and 0.112 μ g \pm 19%, when using HPTLC-aptastaining (HPTLC-AS) [57]. When using HPTLC-IS, they determined an LOD of 0.062 μ g \pm 24% and an LOQ of 0.093 μ g \pm 22% [52]. The precision of the HPTLC-IS method was within the accepted range of 15% according to the FDA guidelines.

Table 1. Statistical parameters of HPTLC-IS using anti-bovine α-LA antibodies.

Synonym	Value	RSD
Limit of detection	0.040 µg	0.74%
Limit of quantification	0.177 μg	3.27%
Accuracy	99.93%	4.27%
Precision	8.55%	-
Coefficient of determination	0.956	1.52%

2.2. HPTLC-Immunostaining of BITC-Modified and Non-Modified α-Lactalbumin

In the following, the influence of a conjugation between α -LA and BITC on the allergenic properties is presented. For this purpose, treated and untreated proteins were detected after chromatographic separation using the specific antigen-antibody reaction. Figure 2 shows a "twin plate" (one plate cut into two similar plates after the chromatographic separation) stained with the protein-specific dye fluorescamine (Figure 2a), detecting all proteins present. Figure 2b shows the chromatogram obtained from the immunological staining protocol.



Figure 2. HPTLC analysis of BITC-α-LA derivatives as a function of the concentration of BITC. (**a**) Protein-specific staining with fluorescamine (UV-light; λ = 366 nm); (**b**) Immunostaining with antibodies (white light) for the exclusive detection of the antigen. (1) α-LA control (freshly prepared), (2) α-LA control (treated similar as BITC-protein derivatives), (3) BITC-α-LA derivative "low" (c_{BITC} = 3.8 mM), (4) BITC-α-LA derivative "moderate" (c_{BITC} = 38 mM), (5) BITC-α-LA derivative "high" (c_{BITC} = 75 mM); (6) BITC-α-LA derivative "very high" (c_{BITC} = 113 mM).

In Figure 2, an α -LA solution freshly prepared in water was applied at position 1 of the plate. Lane 2 shows the α -LA control treated like the modifications, but without the addition of BITC. This control was intended to represent the effect of synthesis and re-conditioning of the protein. Lanes 3-6 show the protein derivatives "low", "moderate", "high", and "very high" produced with increasing amounts of BITC.

The control samples applied as lanes 1 and 2 showed three bands (I, II, and III) for both staining procedures. When comparing the band sharpness between both detection methods, it was obvious that the band sharpness of HPTLC-IS slightly decreased. While the bands of the BITC- α -LA derivatives "low" and "moderate" were clearly separated from each other when stained with fluorescein (Figure 2a, lanes 3 and 4), overlapping and broadening of the bands already occurred in these samples during immunostaining (Figure 2b, lanes 3 and 4). This could be attributed to diffusion effects during the incubation in aqueous solutions [52].

When using a low concentration of BITC for producing the BITC- α -LA derivative "low", both staining methods (Figure 2a,b; lane 3) showed bands that were assigned to non-modified, residual protein (I, II, III) as well as new additional bands (green arrows) with higher R_f values. For this protein derivative, both detection methods still showed a high agreement with the band pattern of the control sample (Figure 2a,b; lane 2).

With increasing concentrations of BITC, a steady decrease in intensity of the bands of the control (I, II and III) was observed, until they could not be detected anymore (Figure 2a,b; lanes 4–6). Similarly, a continuous increase in the intensity of new bands (green arrows) was observed with increasing BITC concentration (Figure 2a,b; lanes 4–6). The new bands had higher R_f values and appeared more intense and partially broadened. The trend obvious from Figure 2a supported the assumption that the ITC-protein adducts formed depending on BITC concentration to a certain extent.

In both figures, the formation of smeary streaks was pronounced at higher BITC concentrations (lanes 5 and 6, yellow arrows), which is probably due to an increase in the degree of modification. It is likely that there were numerous different protein modifications formed that impaired the chromatographic separation. Moreover, after the protein-specific staining with fluorescamine, another band can be detected attributable to an excess of residual BITC (red arrows). This identification was made by comparison with a standard BITC solution (comparison not shown here).

2.3. HPTLC-Immunostaining of Tryptic Peptides

The present study showed that untreated and BITC-modified α -LA can be analyzed with regard to its antigenic properties using HPTLC-IS. In addition to the native protein structure, fragments/parts of the protein structure may also retain their antigenicity after proteolytic hydrolysis, so that antigenic analysis of corresponding peptides must not be neglected. Due to the low molecular weight of the peptides, their analysis by traditional methods such as Western blotting after gel electrophoresis is limited. Consequently, an immunological detection after HPTLC separation of the present work. For this purpose, α -LA was derivatized with BITC and subsequently hydrolyzed with the protease trypsin. Immunological detection by HPTLC-IS enabled the identification of the presence of residual epitopes in the hydrolysate. Figure 3 shows the HPTLC chromatograms of tryptic peptides after peptide/protein staining with fluorescamine (Figure 3a) and after immunostaining (Figure 3b). Antigenic and non-antigenic peptides can be differentiated.



Figure 3. HPTLC analysis of tryptically digested α -LA derivatives as a function of BITC concentration. (**a**) Protein staining using fluorescamine as a derivation reagent (UV-light; $\lambda = 366$ nm), (**b**) Immunological staining (white light). (1) α -LA control (freshly prepared), (2) α -LA control (treated similar as BITC-protein derivatives), (3) BITC- α -LA derivative "low" (c_{BITC} = 3.8 mM), (4) BITC- α -LA derivative "moderate" (c_{BITC} = 38 mM), (5) BITC- α -LA derivative "high" (c_{BITC} = 75 mM); (6) BITC- α -LA derivative "very high" (c_{BITC} = 113 mM).

Figure 3a shows a high agreement in the band pattern of both control samples (lanes 1 and 2). The number of bands detected was consistent. Only a slight, but uniform reduction in the intensity of all bands in lane 2 was observed. By comparing the band patterns of the control sample (lane 2) with those of the BITC-protein derivatives (lanes 3-6), a steady decrease in intensity was observed with increasing BITC concentration. Exemplarily, some bands, whose intensity decreased with increasing BITC concentration have been highlighted by red dashed boxes. In the case of an excess of BITC, some bands showed such a strong loss of intensity that some of them could no longer be detected (lanes 5 and 6; red dashed boxes). In Figure 3b, peptides with residual epitopes appear as distinct blue bands on a lighter background (yellow arrows). Based on this chromatogram, conclusions can be drawn about the residual antigenicity of the peptides. After enzymatic hydrolysis of the native α-LA using trypsin as protease, three blue bands were detected in the immunological assay (Figure 3b, lane 1; yellow arrows). The immunological staining showed a reduction in the number and a decrease in intensity of the blue band (red dashed box) with increasing modification with BITC (Figure 3b). Furthermore, a significant antigen-antibody reaction was observed for the initial application position of the sample (Figure 3b, lane 1, blue arrow). The intense blue coloration could be attributed to residual non-hydrolyzed and non-separated α -LA.

3. Discussion

In the following, the previously described results from Figures 2 and 3 will be illustrated and explained at hand of Figure 4. This figure serves to facilitate understanding and schematically depicts the influence of ITC conjugation on the structure, on the epitopes, and on the potential tryptic cleavage sites of the protein, when being successively modified with ITC, and depending on the degree of α -LA modification. It should be noted that only different model scenarios are illustrated, and that the discussion is based on a hypothetical approach for describing the impact of protein modifications on its antigenicity (creation and destruction of epitopes) in accordance with the current literature. Protein structure, the locations of epitopes, disulfide bridges, and tryptic cleavage sites are not depicted



realistically, but only schematically for illustrating the different outcomes from a certain degree of modification possible.

Figure 4. Schematic illustration of the influence of a protein modification on protein structure, epitopes, and enzymatic hydrolysis. While potential reaction sites for the ITC are represented by gray dots, ITC conjugation is highlighted by the red crosses. Intact epitopes are shown as orange regions, tryptic cleavage sites by green dashed lines, and disulfide bridges by black dashed lines. (a) Native protein with the potential reaction sites for ITC and its intact epitopes; (**b**–**g**) increasing degree of protein modification and the resulting change in protein structure, epitope, and enzymatic hydrolysis. The protein structure, locations of epitopes, disulfide bridges, and tryptic cleavage sites are not realistically depicted.

In Figure 4a, the native protein is shown with potential reaction sites suitable for a reaction with ITC (gray dots) and with intact epitopes (orange regions). Here, no distinction is made between linear (sequential and continuous) or conformational (discontinuous) epitopes. The green dashed lines show the naturally occurring tryptic cleavage sites (trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues [58]), and the black dashed lines show the disulfide bridges in the protein [59]. In the native protein, the epitopes are intact and accessible to the antibody reaction [33,60–63], as reflected by the three blue bands in Figure 2b (lane 1, bands I, II, III). The high concordance of band patterns between control samples suggested that the synthesis and re-conditioning had no effect on the protein and its allergenicity (Figure 2a,b; lanes 1 and 2). The three bands detected in the native protein solution in lane 1 can be attributed either to the purity of the protein (\geq 85%) or to the three genetic variants of α -LA. It is noteworthy that the protein has two predominant variants A and B, and a third variant has been described, but was not yet approved [64].

The potential reaction sites, shown as gray dots in the figure, are replaced by red crosses in the case of a covalent bond between the nucleophilic groups of α -LA and the BITC. Previous studies confirmed the conjugation of ITC with the whey protein β -LG, determined by a decreased content of free amino and thiol groups in the protein, suggesting that ITC bind covalently to these protein side chains [3].

Using a low concentration of BITC for the preparation of the protein conjugates, a high agreement in the band pattern compared to the control sample (Figure 2a,b, lanes 2 and 3) can be seen in both detection techniques. It can be assumed that the use of a low BITC concentration resulted in a small number of protein modifications having no significant influence on the protein and its allergenicity. Despite the protein modifications with BITC, the epitopes appear to remain immunologically-active (Figure 2b, lane 3). This situation can be illustrated as in Figure 4b. It is likely that when using a low BITC concentration, only comparatively more easily accessible reaction sites in the outer part or the surfaces of the native protein structure were conjugated primarily, not noticeable influencing the whole protein structure with its epitopes.

For both detection techniques, two differences in the band pattern are highlighted with increasing concentration of BITC in Figure 2. On the one hand, with increasing BITC concentration (lanes 4–6), a strong intensity decrease was noted (band I), while on the other hand, a clear intensity increase of a new band (green arrows) could be seen. Immunological detection showed certain differences with increasing concentration of BITC, indicating a change of the allergenic properties induced by ITC conjugation (Figure 2b). The blue coloration resulted from an antigen-antibody reaction, so that an increase in the color intensity could be equated with an increase in the immunological reaction. Conversely, a decrease in intensity of a band indicated an inhibition of the antibody response.

It is conceivable that the amino acid residues that covalently interact with ITC are sometimes located in an epitope. When amino acids in an epitope are conjugated with ITC or an ITC-protein bond is directly in the region or close to a linear epitope, the epitope can be blocked, inactivated, or destroyed (Figure 4c, loss of orange regions). The epitope is then no longer accessible for an antibody reaction [7], as reflected by a decrease in intensity of the blue coloration of the bands in Figure 2b (band I).

In addition to the shielding/masking of the epitopes by the covalent binding of ITC, the irreversible structural change of the protein molecule induced by ITC conjugation could cause the decrease in the intensity of blue staining, i.e., a decreased binding to antibodies.

A change in the structural properties of proteins as a result of the conjugation with ITC has been already observed in previous studies. Thus, a loosening of protein folding and a change in secondary and tertiary structure could be noted for an ITC conjugation to a whey protein isolate [6] and pure β -LG [3]. In addition, the results suggested that ITC could also play a role in the cleavage of disulfide bridges in β -LG [2,4,65,66]. Similar effects of ITC conjugation are conceivable for the protein α -LA.

As the conformation of the epitopes of α -LA is associated with its secondary or tertiary structure, which play an extraordinary role in the protein antigenicity, it is conceivable that a structural change induced by covalent ITC conjugation could presumably change some of the epitope structures and thus, affecting the allergenicity of the protein [60,63,67,68]. Based on these assumptions, a loosening of the protein molecule was mapped in Figure 4d (loss of orange regions), which may lead to the destruction or inactivation of conformational (discontinuous) epitopes under certain circumstances. A more significant change in the protein structure is shown in Figure 4e. Here, the fact that the ITC could cleave the disulfide bridges is pictorially illustrated. The result is a significant unfolding of the protein structure, corresponding to a certain extent of secondary structure transformation, but least strong transformation of the tertiary structure. These unfolding and denaturation processes may also inactivate and destroy conformational (discontinuous) and/or linear (sequential and continuous) epitopes (Figure 4d, further loss of orange regions), which could explain the reduction in intensity or disappearance of the bands in Figure 2b, lanes 4–6 (band I).

In addition to the destruction or inactivation of epitopes, it can be seen that as a result of the structural change, neo-formed epitopes occur or epitopes that were previously hidden inside ("buried") the protein structure can become more accessible and exposed through unfolding and denaturation processes (Figure 4d,e, new orange regions), thereby increasing the immunological response. This effect of ITC conjugation on the antigenicity could explain the significant increase in intensity of the blue coloration of the band marked with green arrows in Figure 2b, lanes 5 and 6.

A purely hypothetical approach is shown in Figure 4f. Here, it is assumed that the protein is fully derivatized and completely fold over, after being exposed to an excessive BITC-modification. Furthermore, it is not known, whether epitopes can be completely destroyed or partially preserved in this state.

In summary, epitopes located on the surface of protein molecules can react with antibodies, while amino acids hidden inside cannot be recognized in the first moment. External influences and post-translational modifications such as the covalent binding of BITC as in this case, can cause the protein to denature and unfold, and consequently affecting protein structure with its physicochemical and biological properties. Irreversible structural changes of proteins resulting from covalent modifications can lead to antigenic epitopes either being blocked, destroyed, remodeled, or of even improved accessibility, thereby affecting the allergenic properties. On the one hand, the formation of neo-formed epitopes or the exposure of epitopes, initially buried inside the protein can lead to the formation of new, potentially immunogenic sequences or conformations. On the other hand, epitopes may be blocked or inactivated by ITC conjugation or conformational (discontinuous) epitopes may be destroyed by the structural change, resulting in a decreased antigen-antibody response.

In the following, the influence of ITC conjugation on enzymatic hydrolysis and on the antigenicity of tryptic peptides is discussed. Initially, the theoretically generated peptides upon enzymatic hydrolysis of α -LA with trypsin can be calculated along with the masses and positions of the peptides in the protein, using the PeptideMass tool available at www.expasy.org (accessed on 20 March 2021) (Table 2), The protein sequence of α -LA was taken from the UniProtKB database (http://www.uniprot.org/ (accessed on 20 March 2021); under the UniProt entry name LALBA_BOVIN, and file number P00711).

Mass	Position	Peptide Sequence
618.35	20-24	EQLTK
653.31	25-29	CEVFR
389.24	30–32	ELK
375.22	33–35	DLK
4654.15	36–77	GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQINNK
549.29	78–81	IWCK
1889.78	82–98	DDQNPHSSNICNISCDK
1642.73	99–112	FLDDDLTDDIMCVK
147.11	113–113	К
488.31	114–117	ILDK
1220.65	118–127	VGINYWLAHK
650.32	128–133	ALCSEK
1034.50	134–141	LDQWLCEK
132.10	142-142	L

Table 2. Masses, positions in the protein and sequences of the calculated peptides after tryptic hydrolysis using the PeptideMass tool available at www.expasy.org (accessed on 20 March 2021).

Comparison of protein-specific staining with fluorescamine and immunological staining using antibodies allows differentiation and assigning of antigenic and non-antigenic peptides. It should be emphasized that a specific antibody can bind to residual epitopes consisting of only a few residues of the initial antigen. For this purpose, the sequential epitope must consist of at least five linear arranged amino acids and can be up to a multiple number, when the linear arranged amino acids are coiled in the polypeptide [69]. It has already been shown that peptides consisting of 12–14 linear arranged amino acids with a molecular weight of approximately 1500 Da are responsible for a significant contribution to the allergenicity of the entire molecule [61,70]. Taking into account the relevant order of magnitude for an epitope character, the peptide sequences listed in Table 2 and the associated masses can be used to describe that are responsible for the antigen-antibody reaction, i.e., the appearance of the blue band in Figure 3b.

In Figure 4a, the tryptic cleavage sites are shown as green dashed lines, and the resulting peptides reflect the bands in Figure 3a, lane 1. Figure 3a showed a chromatogram followed by peptide-specific staining with fluorescamine. The high concordant band pattern of the two control samples (Figure 3a, lanes 1 and 2) indicated that the conditions of synthesis and re-conditioning had no effect on enzymatic hydrolysis. Only in lane 2 a slight but uniform reduction in the intensity of all bands was observed, which is probably due to the procedure, leading to minor losses, at all. In the chromatogram, a difference in the band pattern of the tryptic peptides with increasing degree of protein modification can be seen. From lanes 3-6, a loss of intensity as well as a decrease in the number of bands (red dashed boxes) was observed with increasing BITC concentration. It can be assumed that the formation of BITC adducts prevented or inhibited enzymatic hydrolysis with the protease trypsin. In Figure 4, the inhibition of enzymatic hydrolysis due to the conjugation is represented by red crosses and fewer green dashed lines. This trend increases from Figure 4b-f with increasing protein modification. This assumption can be underlined at hand of previous studies that have already investigated the influence of an AITC conjugation to β -LG with regard to digestibility [4]. It is well known that ITC can form stable thioureas with ε -amino groups of lysine side chains [71]. Based on the fact that trypsin preferentially cleaves peptide bonds after lysine and arginine, it seems to be obvious that the protein modification would result in a reduced tryptic digestibility [4,8,71].

Immunological staining revealed that of approximately 14 peptides separated, presumably three peptides were still immunologically-active, despite hydrolysis of the initial protein (Figure 3a,b, lane 1; yellow arrows). It is important to keep in mind that it cannot be ruled out that the chromatographic separation of the peptides was complete [52]. Overlapping of several peptides in one band is possible. Epitopes that are immunologically-active after enzymatic hydrolysis can be identified in Figure 4a by the fact that regions between the tryptic cleavage sites are highlighted in orange. When a tryptic cleavage site is located in the middle of an epitope, enzymatic hydrolysis at this site would destroy the epitope, being reflected by the reduced number of detected bands in Figure 3b.

In the immunological detection of the antigenic peptides, a significant decrease in the intensity of the blue coloration of the bands highlighted by a red dashed box was observed with increasing degree of protein modification (Figure 3b). Of presumably three immunologically-active peptides that still seem to provide an epitope, despite enzymatic hydrolysis of native α -LA, only one antigenic peptide was still detectable with increasing protein modification. The results showed that a certain degree of antigenicity was retained after enzymatic hydrolysis. It may either lead to an inhibition of enzymatic hydrolysis as a result of covalent binding, so that the immunologically-active peptide can no longer be formed, or the conjugation of ITC is close to or directly in the region of an epitope, which may have been blocked, inactivated, or destroyed. Inactivation of some epitopes by ITC conjugation is represented by red crosses and a loss of orange regions (e.g., Figure 4f).

Although some studies already investigated the influence of a protein modification with ITC on functional properties of the proteins, there is insufficient information on the influence on biological properties such as allergenicity. The current state of knowledge shows that the allergenic potential of foods can be reduced, unchanged, or even increased by various procedures in manufacturing and processing, such as mechanical, thermal, biochemical, or chemical treatments [46]. Initially, the recipe itself plays a pre-requisite role: ITC and proteins have to be present to a certain amount. As a result of food processing, the following structural changes of protein molecules are conceivable: Denaturation, unfolding, degradation, fragmentation, aggregation or the formation of oligomers, or neo-formed

conformations. These changes in protein structure can also affect the epitope structures and thus, the allergenicity of the proteins [72–74]. The molecular basis for the change in allergenic properties is the modification of epitopes. Inactivation or destruction of epitopes, formation of new epitopes, or improved accessibility of previously hidden epitopes may occur [45,46,75]. Previous studies reported that the effect of heat treatment on proteins may lead to protein denaturation or aggregation. Consequently, the process-induced denaturation leads to the loss of the organized protein structure, which does not necessarily result in a reduced allergenicity. Rather, it is even conceivable that the formation of aggregates increases the allergenic potential, as illustrated in Figure 4g [61]. It is well known that aggregated proteins are considered to have high immunogenicity, because they can be readily taken up by antigen-presenting cells [76].

Furthermore, the influence of the food matrix during processing must be considered, because allergenic food proteins can interact chemically with other food components. Previous studies reported that new epitope structures can be formed, when proteins are heated in the presence of carbohydrates, polyphenols, or oxidized lipids [39,41,45,77]. Stanic-Vucinic et al. (2013) reported that chemical modification of β -LG is associated with structural and functional modification of proteins, which in turn may increase their allergenic potential by exposing hidden epitopes or creating new epitopes [78]. While the reaction of β -LG with lactose in milk showed increased allergenic activity [79], the allergenicity could be reduced by the covalent modification of ovalbumin [80] and the whey protein β -LG [7,81] with polyphenols in vitro.

In summary, chemical modifications of food proteins are often accompanied by protein unfolding and aggregation. Therefore, a loss of some structural elements and a change in the tertiary and secondary structure of the proteins can be expected [45].

In one study, the effect of heat exposure on the model whey protein α -LA was investigated by NMR. It was shown that the protein was partially unfolded, and the surface hydrophobicity of the protein changed. Residues previously buried in the hydrophobic core of the native protein thus reached the protein surface. Such structural changes have the potential to affect protein digestibility and allergenicity [45,82].

Apart from this, biochemical processes are known to potentially support the manufacturing of hypoallergenic foods, as hydrolysis of proteins showed reduced allergenicity [46].

Depending on the enzyme applied and the degree of hydrolysis, controversial observations are described in the literature. In case of incomplete hydrolysis of proteins, residual allergenicity could be attributed to the presence of native protein remaining or large fragments thereof. In the case of advanced hydrolysis, residual allergenic activity may be induced by short peptide fragments. Thus, short peptide fragments can account for a considerable amount of the allergenic activity of the entire protein. In native proteins, these peptide fragments are located in the hydrophobic core of the protein and are only exposed after protein denaturation or enzymatic hydrolysis. Thus, the remaining protein can still act as an allergen after hydrolysis [61].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

1,4-Dioxane, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, acetonitrile, ammonia, polyethylene-sorbitan monolaurate (Tween20), sodium hydrogen carbonate, tris-HCl, tris(hydroxymethyl) -aminomethane, and dialysis membranes (regenerated cellulose, molecular weight cutoff < 3.5 kDa) were obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany. Sodium chloride and tert-butanol were purchased from VWR International GmbH, Darmstadt, Germany. Bovine α -lactalbumin (α -LA) as model protein, benzyl isothiocyanate (98%), citric acid monohydrate, dioctyl sulfosuccinate sodium salt, dithiothreitol (DTT), fluorescamine, hydrogen peroxide, and trypsin from porcine pancreas were purchased from Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany. The polyclonal primary antibodies were raised in rabbit against bovine α -LA with a concentration of 1g/L and obtained from antibodies-online GmbH, Aachen, Germany. A polyclonal goat anti-rabbit antibody, conjugated to HRP, was

used as secondary antibody (Dako GmbH, Glostrup, Denmark). The concentration of the purified antibodies was 0.25 g/L. Ethanol, formic acid, hydrochloric acid, pyridine, urea, and HPTLC silica gel 60 were purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany. The stationary phase materials were glass-backed and had a size of 10×20 cm. C₁₈ solid phase extraction cartridges (1 mL, 100 mg) were purchased from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany. All solvents were of HPLC grade, otherwise, ACS grade was used. Water was double distilled (ddH2O).

4.2. Methods

4.2.1. Preparation of ITC Protein Conjugates

The protein solutions were prepared by dissolving α -LA in water (0.714 mM). Protein modification was conducted with four different BITC concentrations, ranging from 0 and 113 mM. BITC dissolved in 1,4-dioxane was added to the protein solutions and stirred for 20 h at 37 °C. After the incubation was finished, the reaction mixtures were dialyzed overnight and subsequently lyophilized for removing as much as residual BITC. For the lyophilization, all samples were frozen in liquid nitrogen to prevent cold denaturation and freeze-dried using a laboratory freeze dyer (Christ RVC 2–25 CDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). The freeze-dried samples were dissolved in ACN/water (60/40; v/v), stored at –20 °C until analysis. For one of the control samples, the protein solution was treated in the same way as the modifications, except that BITC was not added.

4.2.2. Tryptic Digestion of α -Lactalbumin

For the tryptic digestion, the freeze-dried ITC-modified and non-modified protein samples were dissolved in 50 μ L 6 M aqueous urea. Subsequently, 100 mM DTT (in 100 mM sodium hydrogen carbonate) were added and incubated for 10 min at 60 °C to cleave any disulfide bridges. The samples were diluted with 425 μ L 100 mM sodium hydrogen carbonate (in water). Tryptic digestion was started by adding trypsin solution (1 mg/mL in 0.1 mM HCl) to the protein solution at a ratio of 1:100. The incubation was performed for 16 h at 37 °C. After the incubation period, the reaction was quenched by adding 0.2% formic acid. For purification of the digested samples, a solid phase extraction was performed. Therefore, the chromatography material was conditioned with 60% ACN in water and equilibrated with 0.2% formic acid in water. After the application of the samples, rinsing was performed with 0.2% formic acid in water, followed by elution with 60% ACN. Finally, the samples were dried using gaseous nitrogen and re-dissolved in a defined volume of 0.2% formic acid for further analysis.

4.3. High-Performance Thin-Layer Chromatography-Immunostaining (HPTLC-IS) 4.3.1. Protein Derivatives

Primarily, silica gel HPTLC plates were pre-washed with methanol and activated at 100 °C for 10 min. Sample application was done using an HPTLC autosampler (ATS4, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland). A total sample volume of 10 μ L was applied as 6 mm bands. Each sample was applied onto the plate in duplicate so that it could be cut in half after chromatographic separation, resulting in two identical plates ("twin plates"). The development of the HPTLC plates was performed in a saturated twin-trough chamber using a solvent system consisting of 2-butanol/pyridine/ammonia/water (39/15/10/36; v/v/v/v) adapted from Biller et al. [48]. After the solvent front reached a height of 80 mm, the plate was removed, and residual solvents were evaporated overnight.

4.3.2. Tryptic Peptides

Analogously to the chromatographic analysis of the protein derivatives, the separation of the digested protein derivatives was performed. By using an HPTLC autosampler, samples were applied onto the plates and developed in a twin-trough chamber filled with the mobile phase consisting of 2-butanol/pyridine/ammonia/water (39/34/10/26; v/v/v/v) [52]. Finally, residual solvents were evaporated from the plates.

4.3.3. Protein-/Peptide-Specific Staining

After the residual solvents were evaporated overnight, proteins and peptides were stained with fluorescamine. Visualization of the fluorescent proteins/peptides was performed using a photodocumentation system (TLC-Visualizer, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland) under ultraviolet light (UV 366 nm). The proteins/peptides appeared as fluorescent bands on a dark background. These plates were used as twin plates to compare with the immunostained plates.

4.3.4. High-Performance Thin-Layer Chromatography-Immunostaining (HPTLC-IS)

Specific detection of proteins and peptides were performed using antibodies according to the procedure described by Morschheuser et al. [52]. Following the evaporation of the mobile phase overnight, one half of the HPTLC plate was transferred to a small vessel.

First, the HPTLC plate was incubated two times for 15 min with a buffer containing Tween20 as a blocking reagent. This prevents the primary antibody from binding nonspecifically to the plate surface. For preparing the blocking solution, 0.9% sodium chloride, 0.6% tris(hydroxymethyl)aminomethane, and 0.5% Tween20 was used. Subsequently, the blocking buffer was removed and replaced by the primary antibody solution (1:20,000 for intact proteins and 1:12,000 for peptides, both in blocking buffer). The incubation with primary antibodies lasted for 2 h and was followed by three washing steps with the blocking solution. Coating with the secondary antibody was performed for 1 h (diluted 1:2000 in blocking solution). The secondary antibody exhibited specificity against the primary antibody and was HRP-conjugated. After the plates were washed three times with the blocking buffer, pH was lowered by incubation for 1 min with an acidic solution containing 0.06% Tris-HCl (pH 6.0). The staining solution consists of the following substances: 0.06% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 0.2% dioctyl sulfosuccinate sodium salt, 0.7% citric acid monohydrate, 1.8% sodium hydrogen phosphate dihydrate, 25% ethanol. Just before staining, 0.15% hydrogen peroxide was added. The TLC plate was incubated in the staining solution for 10 min until blue bands appeared. Upon oxidation, TMB forms a water-soluble blue reaction product that can be measured spectrophotometrically at 650 nm. All incubations were executed at room temperature and on an orbital shaker at 70 rpm. Finally, the analytes were detected at white light and documented using a photodocumentation system (TLC visualizer, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland).

4.4. Statistical Analysis

Validation of the HPTLC-IS methodology was performed with regard to following parameters: linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). For this purpose, native α -LA was used as the standard compound and treated like the modification except for the addition of BITC for excluding any effect of treatment and reconditioning. Subsequently, a calibration series was prepared from the treated non-modified α -LA stock solution. The standard solutions were separated on silica gel and then detected by immunological reaction with antibodies.

Following the documentation of the plates, densitometric evaluation was performed at 650 nm using a TLC Scanner 4 (CAMAG AG, Muttenz, Switzerland). Densitograms recorded with the TLC scanner can be used for quantitative analysis. Linearity was validated using a 15-point calibration curve (n = 3) and was verified by means of Mandel's fitting test. Homogeneity of variance was assigned regarding all values obtained [83,84].

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined using the calibration method DIN 32645:2008-11 (n = 3) via the calibration curve (concentrations between 0.2–3 μ g). Accuracy and precision were determined by analyzing the closeness of individual densitometric measurements of the band (same concentration of α -LA, c = 1.8 μ g, n = 12).

5. Conclusions

In summary, immunological staining of native untreated and BITC-modified α -LA could be successfully performed directly on the plate after their separation using HPTLC. As the HPTLC-IS procedure does not destroy the tertiary and secondary structure, it was possible to estimate the antigenic properties of the modified and non-modified proteins. In the present work, even highly degraded samples such as denatured or proteolytically digested proteins could be detected. It is obvious that due to the chemical modification of α -LA with BITC, structural changes of the protein molecule potentially influence the allergenic properties. Consequently, the chemical modifications could have destroyed or inactivated epitopes, but at the same time buried or newly formed epitopes can be exposed, so that the net effect was an increase in allergenicity. It can be concluded that despite protein modification, (some of the) epitopes remained immunologically-active, at least.

Regarding the enzymatic hydrolysis with trypsin of the BITC-modified proteins, it can be concluded that the conjugation of BITC with free amino groups of lysine protein side chains probably sterically hindered the cleavage sites for the enzyme and consequently led to a reduced digestibility and altered peptide patterns. While for the native and untreated α -LA three of the 14 separated peptides could be detected immunologically, the BITCtreated samples showed only one antigenic peptide. However, it is possible that not every band can be assigned to a single peptide, but several peptides may overlap in one band.

For this purpose, coupling with mass spectrometry of HPTLC-IS could provide excellent features for the advanced studies of antigens. It has to be considered that the blocking reagent Tween20 can interfere with the signals in mass spectrometry. Therefore, the immunostaining procedure has to be optimized with regard to blocking agents. Other major advantages of HPTLC-IS are its ease of use, low cost compared to alternative methods such as gel electrophoretic separation on membranes and staining afterwards, and the reduced use of toxic substances such as acrylamide in SDS-PAGE. In addition, antibody-based detection is characterized by high affinity and specificity to target proteins. Due to the high variability of the HPTLC analysis, e.g., with regard to the composition of the mobile phases, the conditions of the HPLC-IS can be individually adapted to the analytical problem at hand. Furthermore, the methodology profits from a two-dimensional development, which can increase the chromatographic resolution. Here, the sample of interest is developed in two directions with different composition of the mobile phase. Initial experiments of two-dimensional HPTLC-IS have already been performed, which seem promising and should therefore be further optimized in future research.

It is of particular importance to protect sensitized individuals from an allergenic reaction. For this purpose, a method that ensures the identification of allergenic proteins is mandatory. As only an estimation of the antigenicity of the native and the processed protein is obtained with the method described here, future studies need to evaluate and compare the immunogenicity and allergenicity with other analytical methods such as enzyme-linked immunosorbent assays, radio-immunoprecipitate assays, electrochemiluminescence, beadbased assays, surface plasmon resonance or bio-layer interferometry. In addition, specific assays for the determination of protein antigenicity are available [85,86]. In addition, there is no clear tendency to what extent the various food processing influences the allergenic properties [45], so furthermore exhaustive studies are necessary. For example, processing techniques may reduce or increase the bovine allergen in cow's milk or leave it unchanged at all [46]. The evaluation of such non-directed posttranslational modifications that can occur frequently in foods remains challenging. In addition to in vitro studies, it is also necessary to verify, whether the findings obtained can be observed in vivo.

Author Contributions: Conceptualization, J.S. and S.R.; validation, J.S., S.B. and J.B.; formal analysis, J.S., S.B. and J.B.; investigation, J.S.; resources, S.R.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, J.S. and S.R.; visualization, J.S.; supervision, S.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

- Keppler, J.K.; Schwarz, K.; van der Goot, A.J. Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 101, 38–49. [CrossRef]
- 2. Kühn, C.; von Oesen, T.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of isothiocyanate-protein conjugates in milk and curd after adding garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Food Res. Int.* **2018**, *108*, 621–627. [CrossRef]
- Rade-Kukic, K.; Schmitt, C.; Rawel, H.M. Formation of conjugates between β-lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* 2011, 25, 694–706. [CrossRef]
- 4. Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Tholey, A.; Schwarz, K. Interaction of β-Lactoglobulin with Small Hydrophobic Ligands— Influence of Covalent AITC Modification on β-LG Tryptic Cleavage. *Food Biophys.* **2014**, *9*, 349–358. [CrossRef]
- 5. Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Schwarz, K. Differences in binding behavior of (–)-epigallocatechin gallate to βlactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). *J. Mol. Recognit.* **2015**, *28*, 656–666. [CrossRef]
- Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Berton-Carabin, C.; Nipoti, E.; Coenye, T.; Schwarz, K. Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 1 physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7. *Food Hydrocoll.* 2017, 65, 130–143. [CrossRef]
- 7. Wu, X.; Lu, Y.; Xu, H.; Lin, D.; He, Z.; Wu, H.; Liu, L.; Wang, Z. Reducing the allergenic capacity of β-lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chem.* **2018**, *256*, 427–434. [CrossRef] [PubMed]
- Rawel, H.M.; Kroll, J.; Schröder, I. Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation. *Food/Nahrung* 1998, 42, 197–199. [CrossRef]
- 9. Kroll, J.; Noack, J.; Rawel, H.; Kroeck, R.; Proll, J. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with egg-white protein fractions. J. Sci. Food Agric. 1994, 65, 337–345. [CrossRef]
- 10. Kroll, J.; Rawel, H.; Kröck, R.; Proll, J.; Schnaak, W. Interactions of isothiocyanates with egg white proteins. *Food/Nahrung* **1994**, *38*, 53–60. [CrossRef]
- 11. Keppler, J.K.; Schwarz, K. Increasing the emulsifying capacity of whey proteins at acidic pH values through covalent modification with allyl isothiocyanate. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *522*, 514–524. [CrossRef]
- Kühn, C.; Von Oesen, T.; Herz, C.; Schreiner, M.; Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Rohn, S.; Kuehn, C. In Vitro Determination of Protein Conjugates in Human Cells by LC-ESI-MS/MS after Benzyl Isothiocyanate Exposure. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 6727–6733. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Beevi, S.S.; Mangamoori, L.N.; Dhand, V.; Ramakrishna, D.S. Isothiocyanate Profile and Selective Antibacterial Activity of Root, Stem, and Leaf Extracts Derived from *Raphanus sativus* L. *Foodborne Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 129–136. [CrossRef]
- 14. Lee, Y.M.; Seon, M.R.; Cho, H.J.; Kim, J.-S.; Park, J.H.Y. Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. *J. Mol. Med.* 2009, *87*, 1251–1261. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Sofrata, A.; Santangelo, E.M.; Azeem, M.; Borg-Karlson, A.-K.; Gustafsson, A.; Pütsep, K. Benzyl Isothiocyanate, a Major Component from the Roots of *Salvadora Persica* Is Highly Active against Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23045. [CrossRef]
- Guzmán-Pérez, V.; Bumke-Vogt, C.; Schreiner, M.; Mewis, I.; Borchert, A.; Pfeiffer, A.F.H. Benzylglucosinolate Derived Isothiocyanate from *Tropaeolum majus* Reduces Gluconeogenic Gene and Protein Expression in Human Cells. *PLoS ONE* 2016, 11, e0162397. [CrossRef]
- 17. Cejpek, K.; Valušek, J.; Velíšek, J. Reactions of Allyl Isothiocyanate with Alanine, Glycine, and Several Peptides in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3560–3565. [CrossRef]
- Hanschen, F.S.; Brüggemann, N.; Brodehl, A.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L.W. Characterization of Products from the Reaction of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates with Cysteine and Lysine Derivatives Formed in Either Model Systems or Broccoli Sprouts. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 7735–7745. [CrossRef]
- 19. Zhang, Y.; Talalay, P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1976–1981.
- Nciuc, N.S.T.Ă.; Râpeanu, G. An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality. *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati* Fascicle VI Food Technol. 2010, 34, 82–93.
- 21. Smithers, G.W. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. Int. Dairy J. 2008, 18, 695–704. [CrossRef]
- Smithers, G.W.; Ballard, F.J.; Copeland, A.D.; De Silva, K.J.; Dionysius, D.A.; Francis, G.L.; Goddard, C.; Grieve, P.A.; McIntosh, G.H.; Mitchell, I.R.; et al. New Opportunities from the Isolation and Utilization of Whey Proteins. *J. Dairy Sci.* 1996, 79, 1454–1459. [CrossRef]
- 23. Kinsella, J.E.; Morr, C.V. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1984**, *21*, 197–262. [CrossRef]

- 24. Permyakov, E.A.; Berliner, L.J. α-Lactalbumin: Structure and function. FEBS Lett. 2000, 473, 269–274. [CrossRef]
- 25. Fitzgerald, R.J.; Murray, B.A.; Walsh, D.J. Hypotensive Peptides from Milk Proteins. J. Nutr. 2004, 134, 980S–988S. [CrossRef]
- 26. Markus, C.R.; Olivier, B.; Panhuysen, G.E.M.; Van Der Gugten, J.; Alles, M.S.; Tuiten, A.; Westenberg, H.G.M.; Fekkes, D.; Koppeschaar, H.F.; De Haan, E.E.H.F. The bovine protein α-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, *71*, 1536–1544. [CrossRef]
- 27. Sternhagen, L.G.; Allen, J.C. Growth rates of a human colon adenocarinoma cell line are regulated by the milk proteins alphalactalbumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001, 501, 115–120.
- 28. Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Hunziker, P.; Von Fellenberg, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α–lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1426*, 439–448. [CrossRef]
- 29. Cross, M.L.; Gill, H.S. Immunomodulatory Properties of Milk. Br. J. Nutr. 2000, 84, 81–89. [CrossRef]
- Villa, C.; Costa, J.; Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017, 17, 137–164. [CrossRef]
- 31. Paschke, A. Proteine als Lebensmittelallergene. Nachr. Chem. 2008, 56, 1005–1009. [CrossRef]
- 32. Ilinskaya, A.N.; Dobrovolskaia, M.A. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016, 299, 70–77. [CrossRef] [PubMed]
- Li, X.; Yuan, S.; Huang, M.; Gao, J.; Wu, Z.; Tong, P.; Yang, A.; Chen, H. Identification of IgE and IgG epitopes on native Bos d 4 allergen specific to allergic children. *Food Funct.* 2016, 7, 2996–3005. [CrossRef] [PubMed]
- Gershoni, J.M.; Roitburd-Berman, A.; Siman-Tov, D.D.; Freund, N.T.; Weiss, Y. Epitope Mapping. *BioDrugs* 2007, 21, 145–156. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Willison, L.A.N.; Zhang, Q.; Su, M.; Teuber, S.S.; Sathe, S.K.; Roux, K.H. Conformational epitope mapping of Pru du 6, a major allergen from almond nut. *Mol. Immunol.* 2013, *55*, 253–263. [CrossRef] [PubMed]
- 36. Pomés, A. Relevant B Cell Epitopes in Allergic Disease. Int. Arch. Allergy Immunol. 2010, 152, 1–11. [CrossRef]
- 37. Sampson, H.A. Update on food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 2004, 113, 805–819. [CrossRef]
- 38. Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. Lebensmittelanalytik; Bd. fünfte, vo; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; ISBN 978-3-642-34828-0.
- 39. Davis, P.J.; Smales, C.M.; James, D.C. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* **2001**, *56*, 56–60. [CrossRef]
- 40. Li, Z.; Luo, Y.; Feng, L. Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α-lactalbumin and β-lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *233*, 387–394. [CrossRef]
- 41. Jiménez-Saiz, R.; Belloque, J.; Molina, E.; López-Fandiño, R. Human Immunoglobulin E (IgE) Binding to Heated and Glycated Ovalbumin and Ovomucoid before and after in Vitro Digestion. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10044–10051. [CrossRef]
- 42. Bu, G.; Luo, Y.; Chen, F.; Liu, K.; Zhu, T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, *93*, 211–223. [CrossRef]
- Verhoeckx, K.C.M.; Vissers, Y.M.; Baumert, J.L.; Faludi, R.; Feys, M.; Flanagan, S.; Herouet-Guicheney, C.; Holzhauser, T.; Shimojo, R.; van der Bolt, N.; et al. Food processing and allergenicity. *Food Chem. Toxicol.* 2015, *80*, 223–240. [CrossRef]
- 44. Teodorowicz, M.; Van Neerven, J.; Savelkoul, H. Food Processing: The Influence of the Maillard Reaction on Immunogenicity and Allergenicity of Food Proteins. *Nutrients* **2017**, *9*, 835. [CrossRef]
- 45. Mills, E.N.C.; Sancho, A.I.; Rigby, N.M.; Jenkins, J.A.; Mackie, A.R. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 963–969. [CrossRef] [PubMed]
- Paschke, A.; Besler, M. Stability of bovine allergens during food processing. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002, 89, 16–20. [CrossRef]
- 47. Fiocchi, A.; Bouygue, G.R.; Sarratud, T.; Terracciano, L.; Martelli, A.; Restani, P. Clinical tolerance of processed foods. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2004**, *93*, S38–S46. [CrossRef]
- 48. Biller, J.; Morschheuser, L.; Riedner, M.; Rohn, S. Development of optimized mobile phases for protein separation by high performance thin layer chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1415*, 146–154. [CrossRef]
- 49. Morlock, G.; Schwack, W. Hyphenations in planar chromatography. J. Chromatogr. A 2010, 1217, 6600–6609. [CrossRef]
- 50. Morlock, G.; Schwack, W. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1157–1171. [CrossRef]
- 51. Morlock, G.E.; Klingelhöfer, I. Liquid Chromatography-Bioassay-Mass Spectrometry for Profiling of Physiologically Active Food. *Anal. Chem.* 2014, *86*, 8289–8295. [CrossRef] [PubMed]
- Morschheuser, L.; Mink, K.; Horst, R.; Kallinich, C.; Rohn, S. Immunological analysis of food proteins using high-performance thin-layer chromatography-immunostaining. *J. Chromatogr. A* 2017, 1526, 157–166. [CrossRef]
- 53. Meisen, I.; Mormann, M.; Müthing, J. Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: A versatile triad advancing glycosphingolipidomics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811*, 875–896. [CrossRef]
- Morschheuser, L.; Mükusch, S.; Riedner, M.; Seitz, H.; Rohn, S. High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2016, 1008, 198–205. [CrossRef]
- 55. Widmer, V.; Handloser, D.; Reich, E. Quantitative HPTLC Analysis of Artemisinin in Dried Artemisia annua L.: A Practical Approach. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2007, 30, 2209–2219. [CrossRef]

- 56. Reim, V.; Rohn, S. Characterization of saponins in peas (*Pisum sativum* L.) by HPTLC coupled to mass spectrometry and a hemolysis assay. *Food Res. Int.* 2015, 76, 3–10. [CrossRef]
- Morschheuser, L.; Wessels, H.; Pille, C.; Fischer, J.; Hünniger, T.; Fischer, M.; Paschke-Kratzin, A.; Rohn, S. HPTLC-aptastaining— Innovative protein detection system for high-performance thin-layer chromatography. *Sci. Rep.* 2016, *6*, 26665. [CrossRef] [PubMed]
- Olsen, J.V.; Ong, S.-E.; Mann, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol. Cell. Proteom.* 2004, 3, 608–614. [CrossRef]
- 59. Vanaman, T.C.; Brew, K.; Hill, R.L. The Disulfide Bonds of Bovine α-Lactalbumin. J. Biol. Chem. 1970, 245, 4583–4590. [CrossRef]
- 60. Järvinen, K.M.; Chatchatee, P.; Bardina, L.; Beyer, K.; Sampson, H.A. IgE and IgG binding epitopes on β-lactalbumin and β-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2001**, *126*, 111–118. [CrossRef] [PubMed]
- 61. Wal, J.-M. Bovine milk allergenicity. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2004, 93, S2–S11. [CrossRef]
- 62. Monaci, L.; Tregoat, V.; Van Hengel, A.J.; Anklam, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 223, 149–179. [CrossRef]
- 63. Maynard, F.; Jost, R.; Wal, J.-M. Human IgE Binding Capacity of Tryptic Peptides from Bovine α-Lactalbumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, *113*, 478–488. [CrossRef]
- 64. Farrell, H.M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G.T.; Brown, E.M.; Butler, J.E.; Creamer, L.K.; Hicks, C.L.; Hollar, C.M.; Ng-Kwai-Hang, K.F.; Swaisgood, H.E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. J. Dairy Sci. 2004, 87, 1641–1674. [CrossRef]
- 65. Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Stuhldreier, M.C.; Temps, F.; Tholey, A.; Schwarz, K. Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate toβ-lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry. J. Biomol. Struct. Dyn. 2014, 32, 1103–1117. [CrossRef]
- 66. Kawakishi, S.; Kaneko, T. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. J. Agric. Food Chem. 1987, 35, 85–88. [CrossRef]
- 67. Maynard, F.; Chatel, J.-M.; Wal, J.-M. Immunological IgE Cross-Reactions of Bovine and Humanα-Lactalbumins in Cow's Milk Allergic Patients. *Food Agric. Immunol.* **1999**, *11*, 179–189. [CrossRef]
- Bu, G.; Luo, Y.; Zheng, Z.; Zheng, H. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α-lactalbumin and β-lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agric. Immunol.* 2009, 20, 195–206. [CrossRef]
- 69. Davey, B. Antigene. In Immunologie; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 1991; pp. 106–124.
- Sélo, I.; Clément, G.; Bernard, H.; Chatel, J.M.; Créminon, C.; Peltre, G.; Wal, J.M. Allergy to bovine β-lactoglobulin: Specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin. Exp. Allergy* 1999, 29, 1055–1063. [CrossRef] [PubMed]
- Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Schreiner, M.; Rohn, S. Reactivity and Stability of Glucosinolates and Their Breakdown Products in Foods. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 11430–11450. [CrossRef] [PubMed]
- 72. Schmitt, D.A.; Nesbit, J.B.; Hurlburt, B.K.; Cheng, H.; Maleki, S.J. Processing Can Alter the Properties of Peanut Extract Preparations. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1138–1143. [CrossRef]
- 73. Maleki, S.J.; Hurlburt, B.K. Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **2005**, *87*, 1475–1479.
- 74. Jiménez-Saiz, R.; Benedé, S.; Molina, E.; López-Expósito, I. Effect of Processing Technologies on the Allergenicity of Food Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, 55, 1902–1917. [CrossRef]
- Paschke, A. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 959–962. [CrossRef]
 [PubMed]
- 76. Rosenberg, A.S. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. AAPS J. 2006, 8, E501–E507. [CrossRef] [PubMed]
- 77. Doke, S.; Nakamura, R.; Torii, S. Allergenicity of food proteins interacted with oxidized lipids in soybean-sensitive individuals. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 1231–1235. [CrossRef]
- Stanic-Vucinic, D.; Cirkovic-Velickovic, T. The modifications of bovine β-lactoglobulin: Effects on its structural and functional properties. *J. Serb. Chem. Soc.* 2013, 78, 445–461. [CrossRef]
- 79. Bleumink, E.; Berrens, L. Synthetic approaches to the biological activity of beta-lactoglobulin in human allergy to cows' milk. *Nature* **1966**, *212*, 541–543. [CrossRef]
- Lu, Y.; Li, S.; Xu, H.; Zhang, T.; Lin, X.; Wu, X. Effect of Covalent Interaction with Chlorogenic Acid on the Allergenic Capacity of Ovalbumin. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 9794–9800. [CrossRef]
- 81. Xu, H.; Zhang, T.; Lu, Y.; Lin, X.; Hu, X.; Liu, L.; He, Z.; Wu, X. Effect of chlorogenic acid covalent conjugation on the allergenicity, digestibility and functional properties of whey protein. *Food Chem.* **2019**, *298*, 125024. [CrossRef]
- Wijesinha-Bettoni, R.; Gao, C.; Jenkins, J.A.; Mackie, A.R.; Wilde, P.J.; Mills, E.N.C.; Smith, L.J. Heat Treatment of Bovine α-Lactalbumin Results in Partially Folded, Disulfide Bond Shuffled States with Enhanced Surface Activity. *Biochemistry* 2007, 46, 9774–9784. [CrossRef]
- FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine: Rockville, MD, USA, 2018; pp. 1–41.
- 84. Kromidas, S.; Klinkner, R.; Mertens, R. Methodenvalidierung im analytischen Labor. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1995**, 43, 669–676. [CrossRef]

- 85. Wadhwa, M.; Knezevic, I.; Kang, H.-N.; Thorpe, R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. *Biologicals* 2015, 43, 298–306. [CrossRef] [PubMed]
- 86. Nowatzke, W.L.; Oliver, K.G.; Cho, C.Y.; Rallabhandi, P.; Garber, E.A.E. Single-Laboratory Validation of the Multiplex xMAP Food Allergen Detection Assay with Incurred Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 484–498. [CrossRef] [PubMed]

6.2 Publikation II

Benzyl isothiocyanate-modified α-lactalbumin – Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography for analyzing modified peptides

Svenja Badekow*, Mascha Treblin*, Jenny Spöttel*, Sascha Rohn

Journal of Chromatography B 1181, 122937

Impact Factor: 3.205 (2021)

* geteilte Erstautorenschaft

<u>Synopse</u>

Dieses Forschungsprojekt hatte zum Ziel die eindimensionale HPTLC-Analyse durch eine Entwicklung in eine zweite Dimension mit einer anderen Laufmittelzusammensetzung zu optimieren. Mit Hilfe der 2D-HPTLC-Analyse kann eine höhere Auflösung bei der Trennung von komplexen Peptidgemischen erzielt werden, sodass eine bessere Differenzierung von Proteinmodifikationen denkbar ist.

Der Schwerpunkt dieser Publikation lag auf der Analyse und Bewertung des tryptischen Abbauverhalten von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA mit Hilfe der 2D-HPTLC. Um die Wiederholbarkeit der Peptidtrennung zu bestimmen, wurden die unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteinhydrolysate sechsmal getrennt. Die statistische Analyse zeigte, dass die 2D-HPTLC-Methode genau genug ist, um die resultierenden Peptidmuster zu vergleich. Durch den Vergleich der spezifischen Spotmuster der unmodifizierten und BITC-modifizierten Peptide konnten die komplexen Peptidgemische charakterisiert werden. Es konnten Rückschlüsse hinsichtlich der Unterschiede in der Polarität, in dem chromatographischen Verhalten und dem proteolytischen Abbauverhalten der Proteine gezogen werden.

Alle Arbeiten dieses Forschungsprojektes wurden an der Universität Hamburg durchgeführt. Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt 30 %.

Contents lists available at ScienceDirect





Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

Benzyl isothiocyanate-modified α -lactalbumin – Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography for analyzing modified peptides

eu peptides

Svenja Badekow^{a,1}, Mascha Treblin^{a,1}, Jenny Spöttel^{a,1}, Sascha Rohn^{a,b,*}

^a University of Hamburg, Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg, Germany
 ^b Technische Universität Berlin, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Department of Food Chemistry and Analysis, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords: α-lactalbumin Benzyl isothiocyanate 2D-HPTLC Tryptic digestion Protein modification

ABSTRACT

In complex food matrices, non-directed reactions between food proteins and secondary plant metabolites (SPM) are conceivable. In this study, the interaction between the bioactive metabolite from garden cress (Lepidium sativum) and selected Brassicaceae – benzyl isothiocyanate (BITC) – and the dairy protein α -lactalbumin (α -LA) was investigated. It was focused on monitoring the proteolytic degradation behaviour of unmodified and BITCmodified α -LA with two-dimensional high-performance thin-layer chromatography (2D-HPTLC). The twodimensional approach of HPTLC offers high resolution in the separation of complex peptide mixtures and might enable differentiation of protein modifications. Based on the specific peptide patterns of native and modified peptides, conclusions can be drawn about differences in protein/peptide polarity, location of a modification, and digestibility. The aim was to characterize tryptically hydrolyzed unmodified and BITCmodified peptides using the 2D method and to investigate the influence of BITC modification of α -LA on polarity and digestibility. To determine the repeatability of peptide separation by 2D-HPTLC, the unmodified and BITC-modified protein hydrolyzates were separated six times. The absolute standard deviations between the retardation factors of the individual peptide spots varied between 0.52 and 4.79 mm for the x-coordinates and between 0.41 and 6.47 mm for the y-coordinates for all three samples. Here, the mean relative standard deviations ranged from 5.80 to 10.4% for the x-coordinates and from 5.91 to 18.3% for the y-coordinates. The results of the tryptic hydrolysis indicated that, depending on the concentration of BITC used, the modification sterically hinders the cleavage sites for the enzyme, resulting in a reduced digestibility. Covalent binding of the hydrophobic BITC altered the digestibility and polarity of the protein, leading to a difference in peptide patterns between the unmodified and modified α -LA. It was concluded that the reaction was undirected, resulting in a mixture of unmodified and modified peptides, and that elongated modified peptides were formed by BITC blocking of trypsin cleavage sites.

1. Introduction

In complex food matrices, non-directed reactions between the single ingredients may occur during food processing. Especially, the covalent modification of proteins with bioactive compounds is of particular interest, as it can affect functional and technological properties of both – the proteins as well as the bioactive compounds. For example, covalent interactions between proteins from plants, eggs, meat, and dairy products and polyphenols, carbohydrates, and organosulfur compounds have

been described in the literature so far [1–9]. The changes mainly concern polarity and solubility as well as allergenicity and protein quality [3,10–15] or bioactivity of the minor compounds such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and antidiabetogenic activity [1,15–21]. In the past, several studies already described such food-borne protein adducts. Especially, studying interactions of whey proteins with secondary plant metabolites is quite prominent, as β -lactoglobulin (β -LG)/ α -lactalbumin (α -LA) are eminent model proteins and such interactions literally occur in dairy products when recipes also include

 * Corresponding author.

https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122937

Received 27 July 2021; Received in revised form 1 September 2021; Accepted 4 September 2021 Available online 8 September 2021 1570-0232/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

E-mail address: rohn@tu-berlin.de (S. Rohn).

¹ These authors contributed equally to this work.

herbs, vegetables, or fruits [1,13,15,22]. Whey proteins provide a high nutritional quality, which is based on their high biological value with essential branched and sulfur-containing amino acids [23]. α -LA is the second most abundant whey protein and accounts for approximately 2–5 % of the protein fraction in cow's milk [24]. The molecular weight is 14.2 kDa and the primary structure consists of 123 amino acids with a rich content of conditionally essential (e.g., cysteine) and essential (e.g., leucine, isoleucine, lysine, and tryptophan) amino acids, meaning that there is a certain probability of reactive protein side chains [25–27].

Covalent modifications can occur between whey proteins and isothiocyanates (ITC). ITC result from a degradation of glucosinolates, which are a major class of secondary plant compounds in the plant order Brassicales (e.g., mustard, broccoli, kale, or cauliflower) [28,29]. With regard to the modifications mentioned above, it was observed that modification of β -LG with allyl isothiocyanate (AITC) leads to blockage of the cleavage sites of the enzyme trypsin. Therefore, longer peptides are formed during hydrolysis and the profile of bioactive peptides changes [16]. Furthermore, an altered digestibility and antigenicity of α -LA was detected, triggered by steric hindrance of the cleavage sites for the enzyme by conjugation with benzyl isothiocyanate (BITC) [30]. Such reactions and the associated changes in protein properties have also been observed in food matrices like vegetable-enriched bread or in curd after the addition of ITC-containing garden cress (*Lepidium sativum* L.) [1,31].

The reactions described (in food) are always non-directed, as reactivity is heavily influenced by many factors; mainly those related to protein denaturation, as unfolding might expose buried reaction sites. Consequently, a systematic evaluation of modifications is even more complex and needs special efforts for their identification in contrast to e. g., (genetically-driven) phosphorylations with fixed reaction sites. Different approaches are conventionally applicable to systematically investigate traditional and emerging posttranslational protein modifications (PTM). In the so called bottom-up approach, proteins or protein derivatives are enzymatically hydrolyzed and the peptides are analyzed by mass spectrometry following chromatographic separation. Usually, high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) is used for this approach. Proteins/peptides, but also prominent PTM can be identified easily [32,33]. However, high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) can be an alternative for the characterization of peptide mixtures. In particular, this method can be suitable for the detection of PTM resulting from nondirected reactions as described above. Compared to HPLC, where PTM can be often lost in the pre-column or at the beginning of the separation column, HPTLC is a non-discriminant approach, as analytes are detected, even when they remain unseparated at the application band [34,35]. Other advantages of HPTLC include low analytical costs and the ability to measure multiple samples simultaneously. A wide range of stationary and mobile phases are available, allowing a large polarity range to be covered and separation problems to be addressed specifically and quickly [35-38].

For the study of complex peptide mixtures and/or PTM, the use of two-dimensional HPTLC (2D-HPTLC) is recommended as increased resolution is obtained compared to one-dimensional HPTLC [34,37,39]. In 2D-HPTLC it is possible to monitor the first dimension by applying a reference standard (in the lower right corner). The same is valid for the second dimension by applying a standard in the upper left corner that is "used" in the second development of the "pre-separated" analytes. Internal standards for the different properties of the various peptides can also be used by applying and separating them together with the sample spot. The external calibration for quantification is difficult, because here the influence of the separation (e.g., broadening etc.) cannot be easily predicted and controlled/reproduced. For one of the both dimensions it will be always a compromise. Similar to 2D gel electrophoresis, the mixture is separated in two directions, with the additional advantage that different solvent systems are selectable for both dimensions. Using this property, the retention behavior in the second dimension is altered

by using a different retention mechanism, resulting in less analyte overlap. For example, when changing from an acidic to a basic solvent system, the ionizable groups of peptides change their degree of dissociation depending on their specific pK values [37,39,40]. In this context, higher separation selectivity for tryptic digested bovine albumin was obtained by using a normal- and a reversed-phase system [40]. It is also crucial that the 2D-HPTLC method requires no significant additional work or equipment, as the second development is performed directly on the same plate after the first solvent was completely evaporated. In the past, 2D-HPTLC has been successfully used for the mapping of peptides, but also for studying protein interactions with other compounds, such as in the food-borne protein adducts [37,39].

Another main advantage for the use of HPTLC is the large number of different detection and coupling possibilities. Various physical (e.g., visualization or scanning under white-light, ultraviolet-light, and luminescence), microchemical (e.g., dipping or spraying of different derivatization reagents), and effect-directed (e.g., biochemical and microbiological) methods are available for detection [35,41]. The diverse detection options enable targeted research and a visual impression after separation. An example of effect-directed detection is the specific antigen-antibody reaction. This method, also called immunostaining, has been used in a combined strategy with HPTLC in several studies for the analysis of the biological function of proteins [30,35,38]. An important and promising option to identify the amino acid sequence of the peptides after separation is the coupling of HPTLC to mass spectrometry [42]. Furthermore, specific statements can be made about derivative formation, because the modification can be localized within the amino acid sequence [33].

The aim of this study was to evaluate 2D-HPTLC as a simple, rapid, and inexpensive method for the detection of food-borne protein modifications. 2D-HPTLC was chosen because specific peptide patterns can be obtained and compared. By comparing the peptide patterns of native and modified proteins, conclusions might be drawn, e.g., with regard to variations in polarity and digestibility of the proteins. For the studies, α -LA was used as a model protein and modified with different concentrations of BITC, one of the main prominent and reactive metabolites of glucosinolates. Subsequently, the repeatability of the separation should be determined, which is performed via statistical analysis after multiple separations. This is to verify whether the method is accurate enough for a comparison of the peptide patterns. Afterwards, the comparison of patterns should be used to characterize to which extent a modification with BITC affects the chromatographic behavior or the polarity and digestibility of α -LA.

2. Material and methods

2.1. Materials

Ammonia, 2-butanol, 1,4-dioxane, and sodium bicabonate were purchased from Grüssing GmbH (Filsum, Germany). Acetic acid, acetone, and formic acid (MS grade) were purchased from VWR International GmbH (Darmstadt, Germany). Acetonitrile (MS grade) and methanol (MS grade) were purchased from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). Benzyl isothiocyanate, dithiothreitol, α -lactalbumin (α -LA) from bovine milk, pyridine (HPLC grade), and trypsin were all purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany). HPTLC silica gel 60 plates (glass-backed, 20 × 10 cm) as well as urea were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Fluorescamine was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany). All solvents were of ACS grade unless otherwise specified. The water used was double distilled with a water purification system (ELGA Lab-Water, Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle, Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of BITC protein conjugates

Synthesis of BITC-protein conjugates was performed according to Spöttel et al. [30]. First, the lyophilized powder of α -LA was dissolved in water (c = 0.0714 mM). For the modification of α -LA, two different concentrations of BITC dissolved in 1,4-dioxane (3.77 mM and 113.1 mM) were prepared. After adding the solubilized protein to the ligand solution, the incubation was carried under stirring for 20 h at 37 °C. The control sample was treated under the same conditions, except that no BITC was added. The reaction mixtures were transferred into dialysis tubes (Spectra/Por, MWCO 3.5 kDa, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) and dialyzed overnight against water to remove unreacted BITC. All samples were lyophilized and the concentrated protein adducts were obtained as colorless powder.

2.2.2. Tryptic hydrolysis of α -lactalbumin

Both, the synthesized protein conjugates and the control sample were hydrolyzed with the enzyme trypsin using a protocol according to Spöttel et al. [30]. Briefly, an enzyme-to-protein ratio of 1:100 was chosen for this reaction. To remove excessive unreacted BITC and undigested proteins, including trypsin, samples were purified by solid phase extraction using Chromabond® C18 modified silica gel cartridges (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) as sorbents. All samples were dried with nitrogen gas and again dissolved with 0.1 % formic acid in water for the following analysis.

2.2.3. Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography (2D-HPTLC)

2D chromatographic separation was performed according to Treblin et al. [43]. First, HPTLC plates were pre-washed with methanol and activated for 10 min at 100 °C. For applying the samples, an HPTLC autosampler (ATS4, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland) was used. Under a flow of gaseous nitrogen, 10 µL of each sample were sprayed as a band with a length of 1 mm onto the HPTLC plates. The application position was located in the lower left corner of the HPTLC plate with the x- and y-coordinates of 8 mm, respectively. Each development was carried out in a twin-through chamber up to a solvent front height of 80 mm at room temperature and pressure. The separation of the first dimension was performed with a solvent system of 2-butanol/pyridine/ ammonia/water (39/34/10/26, v/v/v/v) and the second one with a composition of 2-butanol/pyridine/acetic acid/water (44/32/8/20, v/ v/v/v). The mobile phases were evaporated overnight after each dimension. Subsequently, all peptides were subjected to a specific staining reaction with fluorescamine (0.05 % in acetone) by immersing the plate in the reagent using the chromatogram immersion device III (speed level 1, time 1 s; CAMAG AG, Muttenz, Switzerland). Visualization of the dried plates was performed with a photoducumentation system (TLC visualizer, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland) under ultraviolet light (254 nm, 366 nm). The entire operation of the aforementioned devices was carried out using the winCats software (version 1.4.8, CAMAG AG, Muttenz, Switzerland).

2.2.4. Statistical analysis of 2D-HPTLC

As part of the statistical analysis, the repeatability of the described separations was determined. For this purpose, the samples were separated several times (n = 6) and the x- and y-coordinates of equal spots were compared with each other. To check whether a normal distribution is given, the Kolmogorov-Smirnov test was performed. When the normal distribution was confirmed, suspected outliers were checked using DIX-ON'S Q test ($\alpha = 0.05$). In addition, the mean values as well as the standard deviations were determined.

3. Results

As stated in the introduction, the study aimed at applying HPTLC for

studying to which extent the modification of α -LA with BITC affects tryptic hydrolysis of the posttranslationally modified proteins and to characterize the corresponding peptide profile formed. For this purpose, two syntheses with different contents of BITC (BITC- α -LA derivative "low" and BITC- α -LA derivative "high") and a control sample without any addition of BITC were prepared and subsequently tryptically digested. The resulting hydrolyzates were separated using a normalphase (NP) 2D-HPTLC system according to Treblin et al. [43]. By 2Dseparation, peptide patterns that might enable differentitation of the modified proteins were obtained. The most intense and well separated spots were selected for each sample and numbered equally on all HPTLC plates. Within the control sample and the two protein derivatives, it was also tried to introduce an equal labelling for the separated peptide spots as far as possible. The combined numbering allows comparison of the two BITC-modified proteins and the control sample.

3.1. Comparison of the retention behavior of BITC-modified and unmodified α -lactalbumin

Fig. 1a, d, and g shows 2D-HPTLC chromatograms of the peptides of the control sample and the two protein derivatives. The numbering of the identified peptide spots can be found in Fig. 1b, e, and h. In the control sample, 23 spots were identified (Fig. 1b). The spots in the lower left quarter of the HPTLC plate (Nos. 1–14) showed comparatively high intensities, with spots Nos. 9 and 13 in particular, showing the highest intensities and largest spot areas of all. Despite the lower intensities of spots Nos. 15–23, these were still included in further evaluation due to their well separation and their coverage of a wide range of peptide polarities.

In direct comparison between the BITC- α -LA derivative "low" (Fig. 1d, e) and the control sample (Fig. 1a, b), HPTLC chromatograms looked very similar in terms of retention behavior and spot intensities. However, two additional spots (A and B) were detected in the BITC- α -LA derivative "low" (Fig. 1d, e), which were not recognized in the control sample.

In contrast, when considering the spot pattern of the BITC-α-LA derivative "high", which had a 30-fold higher degree of modification compared to the BITC-α-LA derivative "low", large differences compared to the control sample and the BITC- α -LA derivative "low" were observed (Fig. 1g, h). The hydrolyzate of the BITC- α -LA derivative "high" seems to have a lower concentration of peptides, in general. Detection of the peptide spots derivatized with fluorescamine was only possible when they were treated with a longer UV-light exposure time in the photodocumentation device than for the control sample and the BITC-α-LA derivative "low". For further verification, quantification of the peptide content in the samples should be performed in parallel. For example, the well-known o-phthaldialdehyde (OPA) assay can be used to determine the amount of free amino groups and respectively, chain length of the peptides in order to determine the exact peptide concentration. Moreover, spot intensities, especially in the lower left area of the HPTLC plate of the BITC-α-LA derivative "high", became much lower than the other two samples. Consequently, no unambiguous assignment to peptide spots Nos. 1–6 of the control sample or the BITC-α-LA derivative "low" was possible. For the BITC-α-LA derivative "high", only two intense spots could be detected in this area instead (spots C and D). In addition, several spots (Nos. 19-23) of the control sample and the BITC-α-LA derivative "low" were not visible anymore in the BITC-α-LA derivative "high", while the intensity of the spots A and B increased further in the BITC-α-LA derivative "high".

While spots Nos. 9 and 13 in the BITC- α -LA derivative "low" and the control sample had very high intensities compared to the other spots (Nos. 1–8, 10–12, 14–23), they showed similar intensities compared to the rest of the spots in the BITC- α -LA derivative "high". In addition, a large and intense spot (E) was visible in the upper right corner of the HPTLC plate in the BITC- α -LA derivative "high". This was not detected in the BITC- α -LA derivative "low" or the control sample. However, it can



Fig. 1. a-i: 2D-HPTLC analysis of tryptically digested α -LA and α -LA-BITC derivatives; (**a-c**) α -LA control sample, (**d-f**) BITC- α -LA derivative "low" (c_{BITC} = 3.77 mM), (**g-i**) BITC- α -LA derivative "high" (c_{BITC} = 113.1 mM); (**c**, **f**, **i**) Coordinates of the identified peptide spots with associated standard deviations of both directions. Each sample was analyzed several times (n = 6) and the mean value of the coordinates was formed.

be assigned to residual (pure) BITC, as in previous one-dimensional HPTLC experiments, a BITC standard was measured that had the same value for the y-coordinate.

3.2. Repeatability of the 2D-HPTLC separation

To evaluate the repeatability of the chromatographic separation, the hydrolyzates of the control sample, the BITC- α -LA derivative "low" and the BITC- α -LA derivative "high" were each separated six times. Thereby, one repetition includes the separation in the first dimension (basic, y-coordinates) and the second dimension (acidic, x-coordinates). The mean values and standard deviations of the spot positions were calculated for each of the six developments of the three samples. The results are shown in Fig. 1c, f, and i, where the mean values of the x- and y-coordinates have been plotted in a coordinate system each and the standard deviations are shown as error bars.

The absolute standard deviations for determining the repeatability of the method varied from 0.52 to 3.31 mm (average 1.67 mm) for the x-coordinate and from 1.55 to 6.47 mm (average 3.54 mm) for the y-co-ordinate for the control sample. For the BITC- α -LA derivative "low", absolute standard deviations of 0.63–3.83 mm (average 1.94 mm) were obtained for the x-coordinate and 0.41–3.90 mm (average 2.14 mm) for the y-coordinate. The absolute standard deviations for the BITC- α -LA

derivative "high" were 1.10–4.79 mm (average 3.22 mm) for the x-coordinate and 1.10–2.26 mm (average 1.57 mm) for the y-coordinate. In relation to the retardation factors, mean relative standard deviations were calculated for the x- and y-coordinates of 5.8% and 18.3% for the control sample, 7.1% and 11.5% for the BITC- α -LA derivative "low", and 10.4% and 5.9% for the BITC- α -LA derivative "high". The absolute and relative standard deviations were in the same range for the three samples and no trend was observed for the x- and y-coordinates either.

In order to compare the peptide patterns of the different samples, the calculated mean values and standard deviations were transferred to mutual coordinate systems for the control sample with the BITC- α -LA derivative "low" and BITC- α -LA derivative "high", respectively. In Fig. 2a, the x- and y-coordinates of the peptide spots from the control sample and from the BITC- α -LA derivative "low" were compared. All equally numbered spots were overlapping when standard deviations (error bars) were considered. Thus, no change in retention behavior could be observed for the BITC- α -LA derivative "low" compared to the control sample.

When comparing the retention behavior of the peptide spots of the BITC- α -LA derivative "high" with the peptide spots of the control sample in a mutual coordinate system, it became apparent that all spots of the BITC- α -LA derivative "high" tended to have higher retardation factors in the first dimension (y-coordinate) (Fig. 2b). However, when the error



Fig. 2. a-b: Standard deviations of x- and y-coordinates of the selected peptide spots. (a) α -LA control sample (circles) directly compared to the BITC- α -LA derivative "low" (squares, c_{BTTC} = 3.77 mM); (b) α -LA control sample (circles) directly compared to the BITC- α -LA derivative "high" (triangles, c_{BTTC} = 113.1 mM).

bars of all samples were considered, it was recognizable that they are mostly overlapping and therefore, the differences in the y-coordinates are non-significant.

4. Discussion

4.1. Effects of the BITC-modification on the retention behavior of α -lactalbumin peptides

Two different derivatives (BITC- α -LA derivatives "low" and "high") were synthesized to investigate the influence of the BITC modification on the properties of the modified peptides using HPTLC. ITC have a high electrophilicity at the carbon atom, which prefers a reaction with the nucleophilic groups of proteins, such as the thiol and amino groups, resulting in the formation of thiocarbamates and thioureas [44–46]. While the thiocarbamate formation is reversible, ITC can form stable, irreversible thioureas with the ε -amino groups of the lysine side chains [47]. In earlier studies, it was already shown by determining the free amino and thiol groups that the binding of ITC to the whey protein β -LG is based on covalent interactions [13]. Moreover, the resulting ITC-modified peptides exhibit increased hydrophobicity compared to the tryptic non-modified peptides [15,16,30].

A previous study showed that hydrolyzates of the five most abundant milk proteins, including α -LA, show consistent spot patterns after 2D-HPTLC separation [43]. Consequently, this method can be used to evaluate changes in the peptide pattern, due to intramolecular interactions and subsequently conclusions can be drawn about changes in selected physicochemical (e.g., polarity, solubility), technofunctional (e.g., gel and foam formation, emulsification), and biological (e.g., digestibility, allergenicity) properties of the proteins.

The results show that when using a low concentration of BITC for the preparation of the BITC- α -LA derivative "low", a high congruence of the spot pattern can be seen compared to the control sample (Fig. 1a, b and 1d, e). Presumably, only few protein modifications are formed during the synthesis using a low amount of BITC, which have no significant effect on the protein and thus, on the tryptic hydrolysis as well as the chromatographic retention behavior.

Due to the increase of the BITC concentration during the synthesis of the derivatives, the resulting chromatograms of the BITC- α -LA derivative "high" (Fig. 1g, h) showed larger differences in the spot pattern of the tryptic peptides compared with the chromatograms of the control sample (Fig. 1a, b), which is reflected in a decrease in spot intensity and number. With an excess of BITC, some spots showed such a strong loss of intensity that they could no longer be detected: Spots Nos. 19–23 of the

control sample disappeared completely in the BITC-α-LA derivative "high". Spots Nos. 1-6 in the lower left corner of the HPTLC plate of the control sample could no longer be assigned to the peptide pattern in the same area of the sample BITC- α -LA derivative "high", as only two significantly detectable peptide spots (C and D) are still visible in this area. It can be assumed that with a higher presence of BITC (especially in the model derivative "high", but also in certain food recipes), a higher degree of protein modification can be achieved [48,49]. Thereby, the enzymatic hydrolysis with the protease trypsin was probably inhibited, leading to a varying pattern of the peptides. As trypsin preferentially cleaves peptide bonds in direct position to the amino acids lysine and arginine, it becomes clear that a covalent binding between the lysine groups of α -LA and BITC could reduce tryptic digestibility due to steric hindrance [12,16,47]. A previous study on the digestibility of AITCmodified B-LG already showed a reduced tryptic hydrolysis induced by AITC modification [16]. A lower enzyme activity could also be expected for other proteases such as LysC and LysN as these proteases also cleave the peptide bonds next to the amino acid lysine [32].

This could also explain the decrease in the number and intensity of spots, especially spots Nos. 19–23, as a consequence of BITC blocking of tryptic hydrolysis, some native, unmodified peptides are no longer formed.

In addition, it should be noted that the introduction of hydrophobic substituents such as BITC can affect the polarity of the peptides, altering the chromatographic retention behavior [48]. It is possible that especially the change of the peptide pattern in the lower left region of the HPTLC plate is due to the increased hydrophobicity of modified peptides. As the method used herein is a normal-phase system, it can be assumed that (non-charged and charged) polar amino acid residues interact with the silanol residues of the stationary phase. These phenomena include electrostatic interactions, hydrogen bonding, and distribution leading to increased retention of polar analytes [50]. The addition of BITC to α -LA results, inter alia, in the modification of lysine, so that peptides containing this amino acid experience decreasing polarity resulting in suppression of the described polar interactions. Thus, the modified peptides.

Moreover, two additional spots (A and B) were detected in the BITC- α -LA derivatives "low" and "high" (Fig. 1d, e and 1 g, h). It can be assumed that the trypsin cleavage sites were blocked by the BITC modification resulting in elongated BITC-modified peptides with altered polarity. This could lead to an altered chromatographic retention behavior which could explain differences in the spot pattern. Another possibility is that these spots are the modified peptides that were located
in the lower, left area of the control sample (spots Nos. 1-6). These would have also experienced a polarity change in the absence of altered digestion and therefore may appear in other areas of the HPTLC plate with higher retardation factors. In addition, in the presence of excess BITC, it is conceivable that the undirectional reaction between BITC and the protein α-LA could result in a mixture of peptides. For example, peptides could remain unmodified or could have been single, double, triple, etc. modified. The non-directional reaction between the two components could also explain the different pattern of the spots. A previous study already showed that adding AITC to ß-lactoglobulin resulted in a mixture of peptides which have been modified differently [16]. Mass spectrometric determination of the peptides (e.g., MALDI-TOF-MS/MS or ESI-MS/MS), even directly from the plate (e.g., HPTLC-MALDI-TOF-MS/MS or HPLC-ESI-MS/MS) should be additionally performed in the future to determine the degree of modification of the separated peptides and to give further insights into the exact chemical structure. It has already been documented that peptides can be identified from 2D-HPTLC by isolating the derivatized analytes along with the stationary phase from the HPTLC plate using a scalpel, resolving them, and then measuring them by MALDI-TOF-MS/MS [43]. This could enable the identification of the modified amino acid in addition to the determination of the degree of modification (one, two three etc. reactions sites) [43]. A direct coupling of the TLC plate with the mass spectrometer can lead to intensity loss and diffusion of the analytes due to the matrix application [43,51]. It should be noted that the present work is only a qualitative study to identify the modified peptides based on the comparison of the different peptide patterns of the different samples. In a previous work, tryptically hydrolyzed untreated and BITC-treated α -LA derivatives were separated in a one-dimensional HPTLC [30]. There, about 11 bands could be observed in the control sample, but some of them still overlapped and could not be well separated. With a 2D-HPTLC approach, 23 spots were identified in the control sample and even more peptide spots with low intensity could be detected. In the present work, the derivatives also showed a higher number of spots compared to a previous work, describing the 1D separation [30]. It can be concluded that, when using two-dimensional HPTLC, a better separation of the peptide mixture and thus, a higher chromatographic resolution could be achieved. This is due to the fact that the peptide mixtures are separated in two directions with mobile phases of different pH. The pH variation leads to a change in the dissociable groups of the peptides and thus, to different retention behavior of the analytes. In contrast to this assumption, it has been described in the literature that a change of the pH value does not result in large differences in retention behavior between the two separations [43]. This is evident from the fact that the peptides are almost all located on an imaginary 45° diagonal between the x- and y-axes. Furthermore, it has been reported that major differences between retardation factors in the two dimensions can only be achieved by changing between a normal- and a reversed-phase system [50]. However, both terms are outof-date. It would be more appropriate to refer to adsorption and partition. Nonetheless, the resolution of the 2D-HPTLC method used herein is sufficiently high to detect differences in the peptide pattern, so the influence of BITC modification could be evaluated.

In accordance with the present results, previous investigations also showed that a decrease in band number and intensity resulted with increasing degree of BITC modification [30]. Furthermore, hardly any bands could be detected from the BITC- α -LA derivative "high" in onedimensional chromatographic separation, which could be due to either insufficient exposure to UV-light or lack of resolution of the onedimensional chromatographic separation [30].

4.2. Evaluation of the repeatability

By means of the sixfold 2D chromatographic separation per sample, the repeatability for the method could be determined. The absolute standard deviations between the retardation factors of the individual peptide spots varied in all three samples between 0.52 and 4.79 mm for the x-coordinates and between 0.41 and 6.47 mm for the y-coordinates. Thereby, the mean relative standard deviations ranged from 5.80 to 10.4% for the x-coordinates and from 5.91 to 18.3% for the y-coordinates. In a previous study, milk protein hydrolyzates, resulting from tryptically digestion, were separated eight times each under the same chromatographic conditions as used herein to evaluate the repeatability of the method as well [43]. For the 15 spots identified in α -LA, absolute standard deviations of 1.8-6.3 mm for the x-coordinate and of 2.1-7.3 mm for the y-coordinate were found. The mean relative standard deviations were 8.6% for the x-coordinates and 16.9% for the y-coordinates [43]. Thus, the repeatability of 2D-HPTLC appears to be comparable in both studies, although slightly different sample preparation procedures were performed. In both studies, consistent peptide patterns were found within similar replicate measurements for individual samples.

The repeatability experiments showed that the method is well suited for the qualitative comparison of complex peptide mixtures such as protein hydrolyzates. However, the more complex the samples become (e.g., protein mixtures, foods), the more overlap of the standard deviations of the peptide spots occurs, making it difficult to clearly assign the peptide spots without mass spectrometric verification. In general, the peptide spots should be analyzed by mass spectrometry in order to be able to make unambiguous statements about their identity and, if necessary, to identify changes in the analytes.

The study showed that there is some evidence to that in a proteinrich food such as dairy products, which also contain glucosinolatecontaining herbs or spices, proteolytic degradation with trypsin of ITC-derivatized proteins could be inhibited due to modified lysine side chains that are difficult to cleave. From a nutritional point of view, irreversible binding of food proteins with ITC could not only lead to a decreased bioavailability of the essential amino acid lysine (reducing the biological value of food proteins), but also reduce the availability of health-promoting plant compounds in foods, which is associated with a loss of biological activity or beneficial physiological properties. Although there are already some studies that investigated the reaction of ITC with model proteins, there is insufficient data on the formation of protein conjugates in different food matrices. Therefore, it is important to conduct further investigations using still model approaches ('model foods'; artificial/basic recipes without too many interfering ingredients) to gain a better understanding of physiological effects of isothiocyanatecontaining products. In a previous study, curd and milk were used as model foods and the interaction of secondary metabolites of different cress genus with proteins were investigated [1].

5. Conclusions

In this study, the 2D-HPTLC method was successfully used to investigate unmodified and BITC-modified peptides. Differences between native and modified peptides resulting from tryptic hydrolysis could be detected and serve as indicators for the degradation kinetics of modified proteins. Furthermore, a consistent peptide pattern could be detected within replicate measurements for individual samples. Compared to 1D separation, the 2D-HPTLC method achieved better separation of the peptide mixture and thus higher chromatographic resolution, making the influence of BITC modification obvious through differences in the peptide pattern.

Another important aspect that emerges from this study is that the undirected reaction between the whey protein α -LA and the secondary plant metabolite BITC affects tryptic hydrolysis to different extents depending on the BITC concentration (degree of modification). While small amounts of BITC showed no significant effect on chromatographic retention behavior and tryptic hydrolysis, excessive BITC binding blocks the trypsin cleavage site, resulting in elongated BITC-modified peptides with deviating hydrophobicity and chromatographic retention behavior. It should also be noted that the reaction is non-directional, i.e.,

The 2D-HPTLC method could be used to identify changes in peptide patterns due to intramolecular interactions and to draw conclusions about protein changes such as polarity and digestibility.

In a previous study it was suggested that the 2D-HPTLC method would allow differences between native and modified proteins to be identified and assessed [43]. This hypothesis has now been confirmed in the present study.

Funding

The project is supported by funds of the *Federal Ministry of Food and Agriculture* (BMEL) based on a decision of the *Parliament of the Federal Republic of Germany* via the *Federal Office for Agriculture and Food* (BLE) under the innovation support programme (FKZ: 281A107916).

CRediT authorship contribution statement

Svenja Badekow: Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Mascha Treblin:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft. **Jenny Spöttel:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft. **Sascha Rohn:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] C. Kühn, T. von Oesen, F.S. Hanschen, S. Rohn, Determination of isothiocyanateprotein conjugates in milk and curd after adding garden cress (*Lepidium sativum* L.), Food Res. Int. 108 (2018) 621–627, https://doi.org/10.1016/j. foodres.2018.04.001.
- [2] D. Karefyllakis, S. Salakou, J.H. Bitter, A.J. vanderGoot, C.V. Nikiforidis, Covalent bonding of chlorogenic acid induces structural modifications on sunflower proteins, Chem. Phys. Chem. 19 (2018) 459–468, https://doi.org/10.1002/ cphc.201701054.
- [3] J.K. Keppler, K. Schwarz, A.J. van der Goot, Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential, Trends Food Sci. Technol. 101 (2020) 38–49, https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.023.
- [4] T. Ozdal, E. Capanoglu, F. Altay, A review on protein-phenolic interactions and associated changes, Food Res. Int. 51 (2013) 954–970, https://doi.org/10.1016/j. foodres.2013.02.009.
- [5] J. KROLL, H.M. RAWEL, S. ROHN, Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds, Food Sci. Technol. Res. 9 (2003) 205–218, https://doi.org/10.3136/fstr.9.205.
- [6] T.H. Quan, S. Benjakul, T. Sae-leaw, A.K. Balange, S. Maqsood, Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications, Trends Food Sci. Technol. 91 (2019) 507–517, https://doi.org/10.1016/j. tifs.2019.07.049.
- [7] S.C. Wilde, J.K. Keppler, K. Palani, K. Schwarz, β-Lactoglobulin as nanotransporter - Part I: Binding of organosulfur compounds, Food Chem. 197 (2016) 1015–1021, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.010.
- [8] S. Prigent, A. Voragen, A. Visser, G. van Koningsveld, H. Gruppen, Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), J. Sci. ofFood Agric. 87 (2007) 2502–2510, https://doi.org/ 10.1002/jsfa.
- [9] E. Selinheimo, P. Lampila, M.-L. Mattinen, J. Buchert, Formation of protein oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 3118–3128.
- [10] J. Kroll, H. Rawel, R. Kröck, J. Proll, W. Schnaak, Interactions of isothiocyanates with egg white proteins, Food Nahrung. 38 (1) (1994) 53–60, https://doi.org/ 10.1002/food.19940380110.
- [11] M. HERNANDEZTRIANA, J. KROLL, J. PROLL, J. NOACK, K. PETZKE, Benzylisothiocyanate (BITC) decreases quality of egg white proteins in rats, J. Nutr. Biochem. 7 (1996) 322–326, https://doi.org/10.1016/0955-2863(96)00033-2.
- [12] H.M. Rawel, J. Kroll, I. Schröder, Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation, Nahrung Food. 42 (1998) 197–199, https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(199808)42:03/04<197::AID-FOOD197>3.0.CO;2-B.

- [13] K. Rade-Kukic, C. Schmitt, H.M. Rawel, Formation of conjugates between β-lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties, Food Hydrocoll. 25 (2011) 694–706, https:// doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.018.
- [14] X. Wu, Y. Lu, H. Xu, D. Lin, Z. He, H. Wu, L. Liu, Z. Wang, Reducing the allergenic capacity of β-lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols, Food Chem. 256 (2018) 427–434, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158.
- [15] J.K. Keppler, D. Martin, V.M. Garamus, C. Berton-Carabin, E. Nipoti, T. Coenye, K. Schwarz, Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 1 physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7, Food Hydrocoll. 65 (2017) 130–143, https:// doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.016.
- [16] J.K. Keppler, T. Koudelka, K. Palani, A. Tholey, K. Schwarz, Interaction of β-Lactoglobulin with small hydrophobic ligands - influence of covalent AITC modification on β-LG tryptic cleavage, Food Biophys. 9 (2014) 349–358, https:// doi.org/10.1007/s11483-014-9361-4.
- [17] C. Kühn, T. von Oesen, C. Herz, M. Schreiner, F.S. Hanschen, E. Lamy, S. Rohn, In vitro determination of protein conjugates in human cells by LC-ESI-MS/MS after benzyl isothiocyanate exposure, J. Agric. Food Chem. 66 (2018) 6727–6733, https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01309.
- [18] S.S. Beevi, L.N. Mangamoori, V. Dhand, D.S. Ramakrishna, Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *raphanus sativus* L, Foodborne Pathog. Dis. 6 (2009) 129–136, https://doi.org/ 10.1089/fpd.2008.0166.
- [19] Y.M. Lee, M.R. Seon, H.J. Cho, J.-S. Kim, J.H.Y. Park, Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin, J. Mol. Med. 87 (2009) 1251–1261, https://doi.org/10.1007/s00109-009-0532-6.
- [20] A. Sofrata, E.M. Santangelo, M. Azeem, A.-K. Borg-Karlson, A. Gustafsson, K. Pütsep, Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of *salvadora persica* is highly active against gram-negative bacteria, PLoS One. 6 (2011), e23045, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023045.
- [21] V. Guzmán-Pérez, C. Bumke-Vogt, M. Schreiner, I. Mewis, A. Borchert, A.F. H. Pfeiffer, Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from *tropaeolum majus* reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells, PLoS One. 11 (2016) 1–27, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162397.
- [22] J.K. Keppler, T. Koudelka, K. Palani, M.C. Stuhldreier, F. Temps, A. Tholey, K. Schwarz, Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate to β-lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry, J. Biomol. Struct. Dyn. 32 (2014) 1103–1117, https://doi.org/ 10.1080/07391102.2013.809605.
- [23] G.W. Smithers, Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold', Int. Dairy J. 18 (2008) 695–704, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008.
- [24] R. Jenness, B.L. Larson, T.L. McMeekin, A.M. Swanson, C.H. Whitnah, R. M. Whitney, Nomenclature of the proteins of bovine milk, J. Dairy Sci. 39 (1956) 536–541, https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(56)94782-8.
 [25] W.E. Heine, P.D. Klein, P.J. Reeds, The importance of α-lactalbumin in infant
- [25] W.E. Heine, P.D. Klein, P.J. Reeds, The importance of α-lactalbumin in infant nutrition, J. Nutr. 121 (1991) 277–283, https://doi.org/10.1093/jn/121.3.277.
- [27] R.L. Hill, K. Brew, Lactose synthetase, in, Enzymes (2006) 411–490, https://doi. org/10.1002/9780470122884.ch5.
- [28] F.S. Hanschen, E. Lamy, M. Schreiner, S. Rohn, Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods, Angew. Chemie Int. Ed. 53 (2014) 11430–11450, https://doi.org/10.1002/anie.201402639.
- [29] M.E. Cartea, P. Velasco, Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health, Phytochem. Rev. 7 (2008) 213–229, https:// doi.org/10.1007/s11101-007-9072-2.
- [30] J. Spöttel, J. Brockelt, S. Badekow, S. Rohn, Immunological analysis of isothiocyanate-modified α-lactalbumin using high-performance thin layer chromatography, Molecules 26 (2021) 1842, https://doi.org/10.3390/ molecules26071842.
- [31] M. Krell, L. Cvancar, M. Poloczek, F.S. Hanschen, S. Rohn, Determination of isothiocyanate-protein conjugates in a vegetable-enriched bread, Foods. 10 (2021) 1300, https://doi.org/10.3390/foods10061300.
- [32] P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T.Y. Low, A.J.R. Heck, Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin, Nat. Protoc. 11 (2016) 993–1006, https://doi.org/10.1038/nprot.2016.057.
- [33] E. Ahrné, M. Müller, F. Lisacek, Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS, Proteomics 10 (2010) 671–686, https://doi.org/10.1002/ pmic.200900502.
- [34] V. Panchagnula, A. Mikulskis, L. Song, Y. Wang, M. Wang, T. Knubovets, E. Scrivener, E. Golenko, I.S. Krull, M. Schulz, Heinz-Emil-Hauck, W.F. Patton, Phosphopeptide analysis by directly coupling two-dimensional planar electrochromatography/thin-layer chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1155 (2007) 112–123, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.029.
- [35] L. Morschheuser, S. Mükusch, M. Riedner, H. Seitz, S. Rohn, High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides, J. Chromatogr. B. 1008 (2016) 198–205, https://doi.org/10.1016/j. jchromb.2015.11.055.
- [36] J. Biller, L. Morschheuser, M. Riedner, S. Rohn, Development of optimized mobile phases for protein separation by high performance thin layer chromatography, J. Chromatogr. A. 1415 (2015) 146–154, https://doi.org/10.1016/j. chroma.2015.08.048.
- [37] K. Tscherch, J. Biller, M. Lehmann, M. Trusch, S. Rohn, One- and two-dimensional high-performance thin-layer chromatography as an alternative analytical tool for

S. Badekow et al.

investigating polyphenol-protein interactions, Phytochem. Anal. 24 (2013) 436–445, https://doi.org/10.1002/pca.2459.

- [38] L. Morschheuser, K. Mink, R. Horst, C. Kallinich, S. Rohn, Immunological analysis of food proteins using high-performance thin-layer chromatographyimmunostaining, J. Chromatogr. A. 1526 (2017) 157–166, https://doi.org/ 10.1016/j.chroma.2017.10.046.
- [39] S.P. Pasilis, V. Kertesz, G.J. Van Berkel, M. Schulz, S. Schorcht, HPTLC/DESI-MS imaging of tryptic protein digests separated in two dimensions, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 1627–1635, https://doi.org/10.1002/jms.1431.
- [40] R.Ł. Gwarda, T.H. Dzido, Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography of tryptic bovine albumin digest using normal- and reverse-phase systems with silanized silica stationary phase, J. Chromatogr. A. 1312 (2013) 152–154, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.082.
- [41] G. Morlock, W. Schwack, Hyphenations in planar chromatography, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 6600–6609, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.058.
- [42] G. Morlock, W. Schwack, Coupling of planar chromatography to mass spectrometry, TrAC Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1157–1171, https://doi.org/ 10.1016/j.trac.2010.07.010.
- [43] M. Treblin, T. von Oesen, L.-C. Class, G. Kuhnen, I. Clawin-Rädecker, D. Martin, J. Fritsche, S. Rohn, Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography for the characterization of milk peptide properties and a prediction of the retention behavior – a proof-of-principle study, J. Chromatogr. A. 1653 (2021) 462442, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462442.

- [44] K. Cejpek, J. Valušek, J. Velíšek, Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 3560–3565, https://doi.org/10.1021/jf991019s.
- [45] F.S. Hanschen, N. Brüggemann, A. Brodehl, I. Mewis, M. Schreiner, S. Rohn, L. W. Kroh, Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 7735–7745, https://doi.org/10.1021/jf301718g.
- [46] Y. Zhang, P. Talalay, Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms, Cancer Res. 54 (1994).
- [47] A. Paschke, Aspects of food processing and its effect on allergen structure, Mol. Nutr. Food Res. 53 (2009) 959–962, https://doi.org/10.1002/mnfr.200800187.
- [48] H. Rawel, J. Kroll, S. Haebel, M.G. Peter, Reactions of a glucosinolate breakdown product (benzyl isothiocyanate) with myoglobin, Phytochemistry 48 (1998) 1305–1311.
- [49] H.M. Rawel, J. Kroll, Some aspects of reactions of benzyl isothiocyanate with bovine sarcoplasmic proteins, Food Nahrung. 39 (1995) 465–474, https://doi.org/ 10.1002/food.19950390511.
- [50] R. Gwarda, M. Aletańska-Kozak, D. Matosiuk, T.H. Dzido, Inversion of type of separation system in planar chromatography of peptides, using C18 silica-based adsorbents, J. Chromatogr. A 1440 (2016) 240–248, https://doi.org/10.1016/j. chroma.2016.02.064.
- [51] J. Biller, Die massenspektrometrische Charakterisierung von lebensmittelrelevanten Proteinen und Proteinderivaten mittels HPTLC-MS-Verfahren, Verlag Dr. Hut, Munich, Germany, 2017.

6.3 Publikation III

Characterization of Conjugates between α-Lactalbumin and Benzyl Isothiocyanate – Effects on Molecular Structure and Proteolytic Stability

Jenny Spöttel, Johannes Brockelt, Sven Falke, Sascha Rohn

Molecules 26(20), 6247

Impact Factor: 4.411 (2020)

Synopsis

Die Erkenntnisse der vorangegangenen Arbeiten zeigten, dass infolge einer BITC-Modifikation die biologischen Eigenschaften des Molkenproteins α -LA wie die Verdaubarkeit und Antigenität signifikant verändert wurde. Beispielsweise konnte mit Hilfe der HPTLC-Immunfärbung die Auswirkungen auf die Antigenität der Proteinkonjugate und auf die Restantigenität der Peptide nach enzymatischer Hydrolyse mit Trypsin abgeschätzt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass infolge der kovalenten BITC-Bindung an das Molkenprotein α -LA eine Änderung der Konformation in enger Verbindung mit veränderten antigenen Eigenschaften stehen könnte.

Vor dem Hintergrund, dass vielzählige Proteinfunktionen und -eigenschaften stark von der molekularen Struktur der Proteine abhängig sind, war das Ziel dieses Forschungsprojektes die Untersuchung der Auswirkungen der kovalenten ITC-Proteinmodifikation auf molekularer Ebene. Die strukturelle Charakterisierung von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA sollte dazu dienen, Konsequenzen kovalenter Proteinmodifikationen auf die Proteineigenschaften und -funktionen abschätzen zu können und solche kovalenten Interaktionen zu vermeiden oder sogar zu nutzen, um die Proteinfunktionalität gezielt zu steuern. Die Untersuchungen der molekularen Struktur mit Hilfe der Zirkulardichroismus- (CD-)Spektroskopie, Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure- (ANS-)Fluoreszenz und dynamischer Lichtstreuung (DLS) zeigten, dass die Modifikation Änderungen in der Sekundärstruktur, in der Oberflächenhydrophobizität, in der Größe als auch im Aggregationsverhalten der Proteinderivate hervorrief. Die Quantifizierung der freien Aminogruppen vor und nach der BITC-Konjugation unter Einsatz von α -Phthaldialdehyd (OPA) zeigte einen konzentrationsabhängigen Zusammenhang.

Darüber hinaus lag der Fokus dieser Studie auf der Untersuchung des Einflusses der BITC-Bindung an α -LA auf die Verdaubarkeit durch Trypsin und der

Identifizierung des Reaktions
ortes von BITC in der Aminosäures
equenz von α -LA mittels HPLC-ESI-MS/MS.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut der Biochemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg realisiert. Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt 60 %.



Article



Characterization of Conjugates between α -Lactalbumin and Benzyl Isothiocyanate—Effects on Molecular Structure and Proteolytic Stability

Jenny Spöttel¹, Johannes Brockelt¹, Sven Falke², and Sascha Rohn^{1,3,*}

- ¹ Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; jenny.spoettel@chemie.uni-hamburg.de (J.S.); johannes.brockelt@chemie.uni-hamburg.de (J.B.)
- ² Laboratory for Structural Biology of Infection and Inflammation, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, Notkestr. 85, 22603 Hamburg, Germany; falke@chemie.uni-hamburg.de
- ³ Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Technische Universität Berlin, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin, Germany
- * Correspondence: rohn@tu-berlin.de; Tel.: +49-30-314-72583

Abstract: In complex foods, bioactive secondary plant metabolites (SPM) can bind to food proteins. Especially when being covalently bound, such modifications can alter the structure and, thus, the functional and biological properties of the proteins. Additionally, the bioactivity of the SPM can be affected as well. Consequently, knowledge of the influence of chemical modifications on these properties is particularly important for food processing, food safety, and nutritional physiology. As a model, the molecular structure of conjugates between the bioactive metabolite benzyl isothiocyanate (BITC, a hydrolysis product of the glucosinolate glucotropaeolin) and the whey protein α -lactalbumin (α -LA) was investigated using circular dichroism spectroscopy, anilino-1-naphthalenesulfonic acid fluorescence, and dynamic light scattering. Free amino groups were determined before and after the BITC conjugation. Finally, mass spectrometric analysis of the BITC- α -LA protein hydrolysates was performed. As a result of the chemical modifications, a change in the secondary structure of α -LA and an increase in surface hydrophobicity and hydrodynamic radii were documented. BITC modification at the ε -amino group of certain lysine side chains inhibited tryptic hydrolysis. Furthermore, two BITC-modified amino acids were identified, located at two lysine side chains (K32 and K113) in the amino acid sequence of α -LA.

Keywords: rotein modifications; α -lactalbumin; whey proteins; benzyl isothiocyanate; cd spectroscopy; hydrophobicity; hydrodynamic radius; tryptic digestion; mass spectrometric analysis

1. Introduction

It is well known that a balanced diet is crucial for maintaining good health [1]. With the aim of increasing the consumption of vegetables with their health-promoting secondary plant metabolites, different recipes of traditional foods are improved with higher amounts of vegetables. Especially, vegetables of the plant order Brassicales are associated with multiple health-promoting properties, largely due to the glucosinolates (GLS) or their hydrolysis products, in particular, isothiocyanates (ITC) [2–5]. For example, some studies reported anti-inflammatory, antibacterial, as well as antidiabetogenic effects, and it has even been shown that consumption of vegetables rich in GLS can reduce the risk of developing certain types of cancer [6–16].

Due to their high electrophilicity, ITC can interact with proteins in a diverse bunch of foods. They react with nucleophilic groups such as thiol and amino groups in proteins to form thiocarbamates and thioureas (Figure 1), and thus have a significant influence on various protein properties [5].



Citation: Spöttel, J.; Brockelt, J.; Falke, S.; Rohn, S. Characterization of Conjugates between α-Lactalbumin and Benzyl Isothiocyanate—Effects on Molecular Structure and Proteolytic Stability. *Molecules* **2021**, 26, 6247. https://doi.org/10.3390/ molecules26206247

Academic Editor: Farid Chemat

Received: 28 September 2021 Accepted: 12 October 2021 Published: 15 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/).



Figure 1. Reaction of benzyl isothiocyanate (BITC) with nucleophilic groups, e.g., of protein side chains. Top: reaction with an amino group to form a thiourea. Bottom: reaction with a thiol group to form a dithiocarbamate, redrawn from [17].

In addition to the formation of reaction products in complex food matrices during food production and processing, interactions between proteins and ITC in the human organism are also conceivable [18–20]. In most cases, such reactions are often considered negatively because they can reduce the bioavailability of the health-promoting secondary metabolites and essential amino acids, as well as affect the physicochemical properties and functionality of proteins [6,9]. However, there might also be a possibility of using the knowledge on the interactions as an opportunity to selectively alter the properties and functionality of proteins [1,7,9,21–23].

Recent research is focusing more and more on the interactions between different food compounds/ingredients. Besides being a good model for studying protein alterations, whey proteins are also very important food proteins. They are of particular interest due to their high content of branched, sulfur-containing, and further essential amino acids. In addition to their outstanding nutritional quality, their functional properties (e.g., gelling, emulsifying, foaming) make them valuable ingredients in different foods/recipes. Furthermore, they have good solubility in a wide pH range and can serve as carriers for bioactive substances, as their structure is characterized by different domains and hydrophobic pockets [1,24–27]. Next to β -lactoglobulin (β -LG), α -lactalbumin (α -LA) is the second most abundant whey protein in cow's milk [24]. α -LA is an acidic, monomeric protein with a molecular weight of 14.2 kDa, whose amino acids are well characterized, and its sequence is composed of 123 amino acids [28–35]. The structure of α -LA is further characterized by four disulfide bonds involving all eight cysteines and a calcium-binding site, which ensures the correct folding and high molecular stability of α -LA [24,36–39]. While the secondary structure of native α -LA consists of 26% α -helices, 14% β -sheets, and 60% disordered structures [36], the tertiary structure is built up from two domains: a large α -domain and a small β -domain (Figure 2) [37].

Previous studies showed that the interaction of β -LG with secondary plant metabolites can mask the bitter taste of the latter and contribute to its stabilization and solubility [40,41]. In addition, it was found that the covalent modification with ITC affected the physiological and technofunctional properties of proteins. For example, it was documented that the binding of ITC to several proteins resulted in a change in protein conformation [9,42–44]. Further studies proved that the binding of allyl isothiocyanate (AITC, a hydrolysis product of the glucosinolate sinigrin) to β -LG resulted in a change in the folding and structure of the protein accompanied by an optimization of technofunctional properties such as heat aggregation, foam formation, and emulsification compared to untreated protein [1]. Derivatization of AITC to whey protein isolate also showed an effect on secondary structure depending on pH value. This was accompanied by changes in physicochemical properties such as aggregation, charge, and hydrophobic regions of the protein surface [9]. In addition, it was reported that the binding of the hydrophilic lysine side chains with hydrophobic ligands, such as those represented by the ITC, resulted in a decrease in water solubility and isoelectric point [45,46]. Similarly, Rawel et al. (2002), who studied the interaction of ITC with various plant proteins, showed that the derivatives exhibited a decreased solubility and a reduced number of free ε -amino groups, which was accompanied by increased hydrophobicity. In addition, inhibition of tryptic degradation of the ITC derivatives was documented as well [42]. It was reported that, depending on the amount of AITC used, steric blocking of the tryptic cleavage sites of β -LG was caused, resulting in elongated peptides and affecting the amount of bioactive peptides after proteolytic hydrolysis [7].



Figure 2. Ribbon model of the conformational structure of bovine α -lactalbumin (PDB ID 1F66S), redrawn from [37].

In a recent publication, the allergenic properties of unmodified and BITC-modified α -LA and their hydrolysates have already been estimated [47]. A significant influence on the allergenicity of the protein conjugates, but also on the residual antigenicity of the peptides after tryptic digestion, was found. It was hypothesized that as a result of the BITC-addition, there was a change in protein conformation and a corresponding influence on allergenic properties [47]. However, this needs confirmation, as the effects of covalent interactions are complex and can influence protein folding or the three-dimensional structure successively, being crucial for technofunctional and functional properties (e.g., viscosity, gelling, foam formation, solubility, emulsification, color, smell, and taste), as well as biological characteristics such as digestibility [48–50]. Although the reactions of ITC and whey proteins have already been studied several times, it is not yet possible to predict the effect of modification on protein structure and function [1,51]. Further structural characterization of unmodified and ITC-modified proteins remains highly important to estimate the impact on protein structure and functionality and to avoid or even use such covalent modifications to optimize protein functionality in the future.

Based on those findings, the present study aimed at characterizing the influence of the binding benzyl isothiocyanate (BITC), which is a degradation product of the glucosinolate glucotropaeolin to the whey protein α -LA as a model. It was hypothesized that BITC-conjugation affects the structure and conformation of α -LA and, consequently, its properties and functions. The molecular and supramolecular properties of α -LA, as well as digestibility by trypsin upon interaction with BITC, were investigated. For this purpose, an estimation of the secondary structure elements by circular dichroism spectroscopy and an investigation of the surface hydrophobicity using a hydrophobic probe of the BITC- α -LA conjugates were performed. Furthermore, the size of the BITC-adducts and the aggregation behavior were studied using dynamic light scattering. Finally, digestibility with the protease trypsin before and after ITC conjugation was analyzed.

2. Results

2.1. Determination of Free Amino Groups Using O-Phthaldialdehyde

In the present study, free amino groups in untreated and BITC-modified α -LA were determined. The aim was to characterize the effect of BITC conjugation on the amount of residual free amino groups of α -LA and to describe the degree of modification based on the change in spectrophotometrical absorbance. Table 1 lists the average contents of the free amino groups along with the standard deviation (SD) as a function of the molar ratios used (B_{BITC/ α -LA}).}

Table 1. Free amino group content of the unmodified α -LA and BITC- α -LA derivatives.

Sample	$B_{BITC/\alpha-LA}$	Free-NH ₂ Content (%)	SD (%)
α-LA control	0	100	-
BITC-α-LA derivative "minimal"	10	87.2	3.6
BITC- α -LA derivative "minor"	25	88.0	2.0
BITC-α-LA derivative "low"	50	79.3	2.1
BITC-α-LA derivative "medium"	500	61.8	17.5
BITC-α-LA derivative "high"	1000	59.9	15.4
BITC- α -LA derivative "very high"	1500	59.0	8.8

The measurement of the α -LA control (B_{BITC/ α -LA} = 0) represents the maximum amount of free amino groups in the unmodified protein and sets the basis for the evaluation of residual amounts. To facilitate comparison of the spectra, normalization to the free amino group content of the α -LA control was performed. Table 1 shows a decrease in the amount of free amino groups from 100% to 59.0% with increasing B_{BITC/ α -LA} from 0 to 1500. The mean percental amount of free amino groups available in the α -LA derivatives with a B_{BITC/ α -LA} molar mass ratio of 10 and 25 decreased by approximately 12–13%. While a further reduction in accessible amino groups to 79.3 \pm 2.1% was noted at a molar mass ratio B_{BITC/ α -LA} of 50, the results indicated saturation when molar mass ratios B_{BITC/ α -LA} from 50 to 1000 or 1500, a further decrease of free amino groups was noted with 61.8 \pm 17.5%, 59.9 \pm 15.4%, and 59.0 \pm 8.8%, respectively.

2.2. Investigation of Secondary Structure by Far-UV Circular Dichroism Spectroscopy

For evaluating structural changes of α -LA derivatives, circular dichroism (CD) spectroscopy was performed in the far UV range from 185 to 260 nm to investigate the possible influence of BITC conjugation on the secondary structure of α -LA. Spectra of ellipticity as a function of wavelength were recorded for all samples studied. Figure 3 shows averaged normalized CD spectra obtained for the three BITC- α -LA derivatives, "low", "medium", and "high"; the untreated control sample; and the α -LA in the native state.

The CD spectrum of the native α -LA showed a positive maximum at 190 nm and two negative bands at approximately 208 and 220 nm. The CD spectra of the BITC protein derivatives possess a similar shape with minor changes that became more concise with increasing concentrations of BITC used for treatment. While the values of the molar ellipticity of the positive band at approximately 190 nm and those of the negative bands at 208 and 220 nm showed no significant changes between the native, the untreated control sample, and the BITC- α -LA derivative "low," a decrease in the positive molar ellipticity at 190 nm and an increase in the negative molar ellipticity of the minima at 208 and 220 nm was noted with increasing BITC concentration in the BITC- α -LA derivatives "medium" and "high".



Figure 3. Far-UV CD spectrum of α -LA in the absence and presence of BITC.

To gain a better understanding of the structural effects of BITC conjugation, the CD spectra of all samples were subjected to quantitative measurement to evaluate the secondary structure and/or to estimate the changes caused in the secondary structure. Quantitative determination of the percentages of secondary structures of three BITC- α -LA derivatives "low", "medium" and "high"; the untreated control sample; and the native α -LA was performed using the K2d method in DichroWeb (http://dichroweb.cryst.bbk.ac. uk/html/links.shtml; accessed on 10 October 2021) and is summarized in Table 2.

Sample	Temperature (°C)	α-Helix (%)	β-Sheet (%)	Random Coil (%)
LA (native)	20	30	12	58
α-LA control	20	29	13	58
	80	15	15	70
BITC-α-LA-derivative	20	24	19	57
"low"	80	19	12	69
BITC-α-LA-derivative	20	20	25	56
"medium"	80	18	19	63
BITC-α-LA-derivative	20	17	28	55
"high"	80	16	26	58

Table 2. Quantification of the secondary structural composition of the proteins at 20 °C and 80 °C.

The results showed that native α -LA consisted of approximately 30% α -helix, 12% β -sheet, and 58% regions of low structural complexity. Binding of BITC induced variations in the content of α -helix and β -sheet structures. With increasing BITC concentration, the amount of α -helix successively decreased from 29% to 17% and, at the same time, the amount of β -sheet structures increased from 12% to 28%. No significant change due to BITC conjugation was observed for the regions with lower structural complexity.

2.3. Investigation of Temperature-Induced Conformational Changes Using Far-UV CD Spectroscopy

In the following, under the aspect of evaluating the temperature-induced conformational changes of BITC- α -LA derivatives, far-UV CD spectroscopy was performed at different temperatures. Knowledge about the temperature-dependent folding stability of α -LA is of great interest in food technology, as it significantly influences the functional and nutritional properties of foods (e.g., dairy products in the case of α -LA). For this purpose, CD spectra of the untreated and BITC-treated α -LA were recorded in a temperature range from 30 to 80 °C with a heating interval of 2 °C/min. Figure 4 shows the CD spectra of the unmodified α -LA control (a) and the BITC- α -LA derivatives "low" (b), "medium" (c), and "high" (d).



Figure 4. CD spectra of the BITC- α -LA derivatives recorded at different temperatures ranging from 30 to 80 °C. Control sample (**a**), BITC- α -LA derivative "low" (**b**), BITC- α -LA derivative "medium" (**c**), and BITC- α -LA derivative "high" (**d**).

The CD spectrum obtained for the α -LA control (Figure 4a) showed a decrease in the molar ellipticities of the double minimum and an increase in the molar ellipticities of the maximum at 190 nm in the temperature range from 30 to 50 °C. While the molar ellipticity of the minimum at 208 nm continued to decrease with increasing temperature (60–80 °C), the molar ellipticity of the minimum at 222 nm increased. In parallel, a decrease of the maximum at 190 nm was observed in the temperature course from 60 to 80 °C.

In the CD spectra of the BITC- α -LA derivatives "low" and "medium" (Figure 4b,c), a steady decrease in the molar ellipticity of the maximum and an increasing molar ellipticity of the minimum at 222 nm could already be observed for temperatures ≥ 40 °C. A significant difference between these two derivatives was that with increasing temperature (from about 60 °C, analogous to the control) in the derivative "low", the minimum at 208 nm showed a slight decrease in molar ellipticity, while in the derivative "medium" no significant change was observed. It should be emphasized that the differences with increasing temperature were only slightly lower for the BITC- α -LA derivative "medium", while no significant changes were documented for the BITC- α -LA derivative "high" when evaluated as a function of temperature. In summary, the differences in the CD spectra as a function, Furthermore, the observations described can be supported by comparing the approximated secondary structure compositions for the different derivatives at the different temperatures applied (Table 2; 20 °C and 80 °C), corresponding to the CD spectra shown in Figure 4.

2.4. Investigation of Surface Hydrophobicity Using Anilino-1-Naphthalenesulfonic *Acid (ANS) Fluorescence*

In the following, the effect of BITC conjugation on the surface hydrophobicity of α -LA was investigated using the extrinsic fluorescent dye anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS). It can be used to evaluate conformational changes in proteins and to characterize hydrophobic binding sites on the surface of proteins [1,52–60]. In Figure 5, the mean ANS fluorescence intensities of the untreated α -LA control sample and BITC- α -LA derivatives "low", "medium", "high", and "very high" are plotted against wavelength.



Figure 5. Mean fluorescence intensities versus wavelength of the ANS assay of the BITC- α -LA derivatives.

Low fluorescence emission was observed in the presence of unmodified α -LA (Figure 5, red curve). Depending on the degree of BITC modification, a difference in fluorescence intensity between the measured samples was documented. While the control sample showed a low fluorescence intensity compared to the BITC-treated protein derivatives, a significant increase in ANS fluorescence and a shift of the fluorescence maximum was observed with an increasing degree of modification. Measurement of the ANS fluorescence of the BITC- α -LA derivative "low" showed only a slight increase in intensity and hardly any effect on the position of the fluorescence maximum (Figure 5, dark green curve). With an increasing degree of modification of the α -LA derivatives, the ANS quantum yield could be increased up to a threefold value, and a blue shift of the fluorescence maximum was observed.

2.5. Determination of the Hydrodynamic Radius Using Dynamic Light Scattering

Using dynamic light scattering, the hydrodynamic radius and aggregation behavior of the untreated protein and BITC- α -LA- derivatives were evaluated. Figure 6 shows the size distribution histograms of the untreated α -LA protein control and the BITC- α -LA derivatives "low", "medium", "high", and "very high". For each sample, 20 scans were acquired, resulting in the average hydrodynamic radius and the correspondingly standard deviation (Table 3).



Figure 6. Distribution of hydrodynamic radii of the α -LA control and the BITC- α -LA derivatives.

Table 3. Averaged hydrodynamic radii (R_H) a	along with standard deviations (SD) of α -LA control
and BITC- α -LA derivatives ($n = 20$ scans).	

Sample	No.	R _H (±SD) (nm)	No.	R _H (±SD) (nm)
α-LA control	Ι	1.8 (±0.2)		
BITC-α-LA-derivative "low"	I III V	2.4 (±0.5) 13.8 (±3.2) 57.8 (±11.5)	II IV	2.9 (±0.7) 15.8 (±3.5)
BITC-α-LA-derivative "medium"	Ι	83.8 (±18.3)	II	89.4 (±14.9)
BITC-α-LA-derivative "high"	I III	2.0 (±0.3) 61.0 (±13.6)	II	55.5 (±11.3)
BITC-α-LA-derivative "very high"	I III	51.6 (±11.7) 68.6 (±15.6)	II	62.1 (±11.8)

For the untreated α -LA control, the hydrodynamic radius was 1.8 ± 0.2 nm, indicative of monomeric α -LA. Moreover, only a single signal with a small peak width was observed in the histogram of the unmodified α -LA control, leading to the assumption that the solution was monodisperse and homogeneous. In contrast, multiple particle sizes and broader peaks were observed for the BITC- α -LA derivatives. Depending on the degree of modification, increased hydrodynamic radii from 13.8 to 89.4 nm were observed, indicating a polydisperse and inhomogeneous solution of large multimers.

2.6. LC-ESI-MS/MS Analysis of Unmodified and BITC-Modified α -LA Hydrolysates

One aim of these approaches was to identify the side chains of the α -LA protein modified with BITC and to investigate the influence on the digestibility of the protein derivatives. For this purpose, the four different BITC- α -LA derivatives, "low", "medium", "high" and "very high", with different BITC concentrations and the unmodified α -LA control sample were subjected to tryptic digestion. The protein hydrolysates were then analyzed by LC-MS/MS. The comparison of the total ion chromatogram of the α -LA control and the BITC- α -LA derivatives "low" and "very high" is shown exemplarily in Figure 7.

Table 4. Summary of all identified peptides after tryptic hydrolysis of the unmodified control sample (K) and BITC- α -LA
derivatives. The numbering, the corresponding peptide mass, and the associated retention time are listed. Peptides that
have been modified are marked with an "*", while elongated peptides resulting from BITC modification were highlighted
with "**".

No.	Peptide Sequence	Mass (m/z)	Control	Low	Medium	High	Very High
1	EQLTK	618.35	10.7	10.9	11.2	11	11.2
1 *	EQLTK + BITC	767.56	-	29.7	29.8	30.5	30.3
2	CEVFR	653.31	19.1	-	-	-	-
3	ELK	389.24	4.5	4.5	4.6	4.5	4.6
3 *	ELK + BITC	538.45	-	-	-	-	29.3
3 **	ELKDLK + BITC	894.17	-	-	27.0	26.9	26.8
4	DLK	375.22	5.2	5.3	5.3	5.2	5.2
	GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYD-						
5	TQAIVQNNDST-	4654.15	-	-	-	-	-
	EYGLFQINNK						
6	IWCK	549.29	18	-	-	-	-
7	DDQNPHSSNICNISCDK	1889.78	16.6	17.0	16.8	17	18.1
8	FLDDDLTDDIMCVK	1642.73	-	-	-	-	-
9	Κ	147.11	-	-	-	-	-
9 **	KILDK + BITC	765.61	-	23.4	23.3	23.2	23.3
10	ILDK	488.31	16.1	16.1	16.1	16.1	16.0
10 *	ILDK + BITC	637.52	-	-	-	32.5	32.7
11	VGINYWLAHK	1220.65	20.9	20.9	20.3	21.3	20.7
12	ALCSEK	650.32	16.4	15.9	15.8	15.7	16.2
12 **	ALCSEKLDQWLCEK + BITC	1815.1	-	-	-	-	31.8
13	LDQWLCEK	1034.50	20	21.2	23.5	24.5	23.2
13 *	LDQWLCEK + BITC	1183.71	-	34.1	33.8	34.4	33.4
14	L	132.10	-	-	-	-	-



Figure 7. Total ion chromatograms (TIC) of the tryptically hydrolyzed untreated α -LA (red) and the tryptically hydrolyzed BITC- α -LA derivatives "low" (green) and "very high" (orange). The main peptide signals were labeled numerically. Identical peptide sequences are marked with the same number, corresponding peptides that have been modified are marked with an "*", while elongated peptides resulting from BITC modification were highlighted with "**". The numbering of the peptides is given in Table 4.

Upon reaction of α -LA with BITC and subsequent hydrolysis to peptides, new signals representing BITC-modified peptides were observed. A corresponding decrease in signal intensity of the unmodified peptides was noted as well. Overall, it was found that a mixture of modified and unmodified peptides was the result for the BITC derivatives. The elution of the protein hydrolysates took place between 5 and 35 min.

The *PeptideMass* tool at www.expasy.org (accessed on 20 September 2021) was used to run an in silico tryptic hydrolysis of the α -LA protein. Here, the theoretically generated peptides, as well as their mass and positions in the protein sequence, were provided. The protein sequence of α -LA was taken from the UniProtKB database (http://www.uniprot. org/; accessed on 20 September 2021); under UniProt entry name LALBA_BOVIN and file number P00711). Theoretically, tryptic hydrolysis of native, unmodified α -LA generates 14 peptides. Table 4 lists all identified amino acid sequences of the control sample as well as the derivatives.

Of the 14 theoretical peptides, 10 could be detected in the α -LA control, whereas 8 unmodified peptides could still be identified in all BITC- α -LA derivatives. The peptide sequences IWCK and CEVFR could only be observed for the control. In addition to the eight unmodified peptides of the derivatives, several modified peptides were detected. A total of 11 peptides were identified for the BITC- α -LA derivative "low", 12 peptides for the BITC-α-LA derivative "medium," 13 peptides for the BITC-α-LA derivative "high," and 15 peptides for the BITC- α -LA derivative "very high". Compared to the native protein, a higher number of peptides were identified after BITC conjugation because of the total sum of unmodified and modified peptides. Furthermore, a concentration-dependent modification of the peptides was observed (Table 4). While the modified N-terminal and C-terminal sequences EQLTK and LDQWLCEK, respectively, were identified in all derivatives, other peptides were only derivatized at higher BITC concentrations. For example, the modification of the peptide sequence ILDK could only be identified in the derivatives "high" and "very high" and the sequence ELK only in the derivative "very high". With an increasing degree of modification, longer peptide sequences were detected. These peptides were ELKDLK (No. 3**), KILDK (No. 9**), and ALCSEKLDQWLCEK (No. 12**). BITC-modified ELKDLK was detected in the derivatives "medium", "high", and "very high", whereas BITC-modified KILDK was identified only in the derivatives "high" and "very high". The modified peptide sequence ALCSEKLDQWLCEK was only observed in the derivative "very high". Furthermore, as obvious from Figure 6 and Table 4, BITC-modified peptides were eluted at later retention times. For example, the unmodified peptide EQLTK was eluted at 10–11 min in the α -LA control and derivatives, whereas the corresponding modified peptide was eluted at 30 min. Similar effects have been observed for the peptides ELK, ILDK, and LDQLCEK.

Identification of BITC-Modified Amino Acids

In mass spectrometry, information about the amino acid sequence of peptides/proteins can be obtained using different fragmentation methods [61]. On the one hand, it is possible to reconstruct the amino acid sequence of peptides and identify proteins from the fragmentation patterns. On the other hand, post-translational modifications such as BITC modification can be identified and localized as well. Depending on the fragmentation method chosen, different breaking points in the backbone of the peptides can be observed. For example, fragmentation yields *a*- and *x*-ions before peptide binding, *b*- and *y*-ions in peptide binding, and *c*- and *z*-ions following peptide binding. While the fragments of the *C*-terminal series are defined as *x*-, *y*-, and *z*-ions, the fragments of the *N*-terminal series are designated as a, b, and c (Figure 8). The labile amide bond in peptides is particularly susceptible to fragmentation, resulting in a breakage of the backbone between individual amino acids and resulting in *N*-terminal *b*-ion series and *C*-terminal *y*-ion series. Peptide bond fragmentation produces a ladder-like representation of the amino acid sequence in the MS/MS spectrum [62,63].



Figure 8. Designation of N- and C-terminal peptide fragments; redrawn from [62,63].

In the present study, a modified amino acid could be identified in the peptide sequences ELKDLK and KILK. As an example, the results are presented using the MS/MS spectra of the derivative "very high". To identify the modified amino acid, the y- and *b*-fragment ions for the corresponding peptides were first calculated using the proteomic tool of the Institute for Systems Biology, Seattle, WA, USA (http://db.systemsbiology.net: 8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html; accessed on 20 September 2021). As posttranslational modifications with BITC (M = 149.21 g/mol) change the mass of an amino acid or peptide, the masses for all y- and b-ions were calculated in the case of modification at the corresponding amino acid (marked with *). Tables 5 and 6 show the numbering of the y- and b-fragment ions and their masses in the native or BITC-modified state (marked with *) for the sequences ELKDLK and KILDK; the identified y- and b-fragment ions of the modified peptides were illustrated in bold font. Figure 9a,b show the MS/MS spectra of the double- and single-charged ions with an m/z of 447.72 and an m/z of 894.46, which can be assigned to the modified peptide ELKDLK. Figure 9c shows the MS/MS spectrum of the modified peptide KILDK with an m/z of 765.38. The identified y- and b-fragment ions of the modified peptides were highlighted in orange and green in Figure 9 according to the nomenclature from the Tables 5 and 6.

Sequence	No.	<i>b</i> -Ions	b*-Ions	y-Ions	y*-Ions	No.
Е	1	130.05	279.26	745.45	894.66	6
L	2	243.13	392.34	616.40	765.61	5
K	3	371.23	520.44	503.32	652.53	4
D	4	486.26	635.47	375.22	524.43	3
L	5	599.34	748.55	260.20	409.41	2
K	6	727.43	876.64	247.11	296.32	1

Table 5. Mass of unmodified and modified *y*- and *b*-fragment ions of the sequence ELKDLK.

Table 6. Mass of unmodified and modified *y*- and *b*-fragment ions of the sequence KILDK.

Sequence	No.	<i>b</i> -Ions	b*-Ions	y-Ions	y*-Ions	No.
K	1	129.10	278.31	616.40	765.61	5
Ι	2	242.19	391.40	488.31	637.52	4
L	3	355.27	504.48	375.22	524.43	3
D	4	470.30	619.51	262.14	411.35	2
K	5	598.39	747.60	147.11	296.32	1



Figure 9. MS/MS spectra of the singly modified peptides ELKDLK of $[M + 2H]^{2+}$ with m/z 447.72 (a) and of $[M + H]^+$ with m/z 894.46 (b) and KILDK of $[M + H]^+$ with m/z 765.38 (c). The *b*-fragment ions are shown in green and the *y*-fragment ions are shown in orange.

The signals in the mass spectrum of the modified peptide ELKDLK could be assigned to the theoretically calculated *y*- and *b*-ions. A nearly complete *y*- and *b*-ion series was observed, enabling the amino acid sequence of peptide ELKDLK to be identified at a retention time between 26.7 and 26.9 min (Figure 9a,b, Table 5). Similary, the *y*- and *b*-fragment ions identified the modified peptide KILDK at a retention time of 22.7 min (Figure 9c, Table 6).

The chemical modification with BITC resulted in a change in the mass of the amino acid or peptide. Thus, the modified amino acid could be identified by corresponding deviating masses of the *y*- and *b*-fragment ions. In the mass spectrum of the modified peptide ELKDLK, the *b*6-, *b*5-, and *b*4- as well as the *y*6-, *y*5-, and *y*4-fragment ions could be detected with the additional mass of BITC. The *b*3- and *b*2, as well as the *y*3 and *y*2-fragment ions, had the mass of the unmodified state, leading to the conclusion that the modification with BITC was present at the central lysine in the amino acid sequence of ELKDLK (Figure 9a,b, Table 5). The mass differences of the *y*- and *b*-fragment ions of the

modified peptide KILDK indicated that the BITC-modification occurred at the first lysine of the peptide sequence (Figure 9c, Table 6). However, for the remaining modified peptides, whose masses and sequence could be identified, no clear identification of the modified amino acid was possible due to insufficient detection of the modified *y*- and *b*-fragment ions. Peptides that have been modified are marked with an "*".

3. Discussion

3.1. Determination of Free Amino Groups Using O-Phthaldialdehyde

Due to the electrophilic carbon atom of an ITC, a reaction with nucleophiles, such as hydroxy, amino, and thiol groups of protein side chains, is conceivable. While the reactions with thiol groups yield reversible reaction products (dithiocarbamates), the products from the reaction with amino groups are irreversible (thioureas) [17]. Therefore, it was assumed that with increasing BITC concentration (increasing molar ratio $B_{BITC/\alpha-LA}$), an increasing degree of modification of the freely accessible amino groups was achieved, making them unavailable for the reaction with *ortho*-phthaldialdehyde (OPA) and thus, leading to a decrease in absorption.

A total of 13 potential reaction sites for BITC in α -LA were assumed, comprising 12 ε -amino groups of the amino acid lysine (K) and the α -amino group of the *N*-terminal amino acid glutamic acid (E).

The results showed a decreasing trend in the relative mean contents of free amino groups from 100% to 59.0% with increasing concentration of BITC for the derivatization of protein conjugates, indicating the formation of thiourea derivatives and an increasing degree of modification of the protein [1,64,65]. Rade-Kukic et al. (2011) already reported a concentration-dependent reaction between AITC and the whey protein β -LG, observing a decrease in free amino groups with an increasing concentration of AITC present [1]. Similarly, reactions of proteins such as ovomucoid, conalbumin, ovalbumin, myoglobin, insulin, bovine soap albumin, and lysozyme with ITC showed a decrease in the percentage of mean free amino group contents as a function of the amount of ITC used, which was attributed to the formation of thiourea derivatives [43,45,46,66–68]. However, a major difference was that those studies used trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) to determine the free amino groups in ITC-protein conjugates. In that alternative method, proteins react with TNBS to form a trinitrobenzene derivative that can be determined photometrically at 416 nm [69]. As some studies concluded that the methods were comparable [70], these results were used for comparison.

Furthermore, a previous study showed that the reaction between AITC and mustard with ITC/protein ratios between 25 and 200 was accompanied by a concentrationdependent decrease in the number of free amino groups from 100% to a maximum of 70%. They described that above an AITC/protein ratio of 100, a constant amount of free amino groups was observed [71]. This result supports the assumption of the present study that there is a stagnant decrease of the free amino groups above a molar mass ratio of 500.

Moreover, a correlation between the decrease in free amino groups and the solubility of ITC-modified bovine sarcoplasma proteins as a function of the ITC concentration used has been reported in the literature [69]. Rawel et al. (1998) showed that the interactions of ITC with various plant proteins affected the physicochemical properties of the proteins by increasing the derivatization of the proteins with ITC. Both solubility and the amount of free ε -amino groups decreased while hydrophobicity increased [42]. Further studies confirmed the correlation between the decrease in free amino groups and the solubility of the derivatives as a function of the amount of ITC used [45,69]. Additionally, the decrease in hydrophobicity of myoglobin as a result of ITC conjugation was confirmed using a hydrophobic fluorescent probe and RP-HPLC [67].

3.2. Influence of BITC Conjugation on Secondary Structure of α -LA

Far-UV CD spectroscopy was performed to investigate the effect of BITC conjugation to α -LA on the secondary structure of the protein. Circular dichroism (CD) is the differential absorption of left and right circularly polarized light by optically active (chiral) molecules. Using CD spectroscopy, the wavelength-dependent absorption difference ΔA of left- and right-circularly polarized light is measured, which is defined as dichroism. It is an analytical method that takes advantage of the optical activity of chiral molecules to elucidate the structure of molecules [48,72–74]. The reason for the different absorption is that chiral molecules have different refractive indices for right- and left-circularly polarized light [72,74]. In the CD measurements, equal but alternating amounts of left- and right-circularly polarized light of one wavelength pass through an optically active medium. Each light absorption causes a change in the light intensity and consequently in the amplitude of the incident wave. When a chiral substance absorbs left- and right-circularly polarized light to different extents, different amplitudes of the circularly polarized waves result, and the superimposed light is no longer linear but elliptically polarized light [48,72,73,75].

In addition to chiral carbon atoms, optically active chromophores in asymmetric molecular structures such as α -helix, β -sheet can also possess optical activity. Therefore, CD spectroscopy is widely used to analyze the structures of biomolecules such as proteins and DNA [75,76]. In proteins, the peptide bonds are the absorbing group. Their ellipticity changes depending on their conformation. In CD spectroscopy of proteins, the spectra in the ultraviolet region can be divided into near and far UV regions. While CD signals in the short-wave UV region of 170–260 nm (far UV region) are due to peptide binding, aromatic amino acids and disulfide bridges absorb in the long-wave UV region (near UV region) of 250–300 nm [48,72,73]. Thus, near-UV CD spectroscopy can provide information about the tertiary structure of proteins, while far-UV CD spectroscopy allows conclusions about the secondary structure of proteins or is suitable for characterizing the secondary structure of proteins [49,77–84].

Far UV CD spectroscopy was performed to evaluate the impact of conjugation of BITC on the conformational changes in the secondary structure of α -LA. The CD spectra of all samples in Figure 3 showed positive maxima at 190 nm and negative bands at approximately 208 and 220 nm. The CD bands in Figure 3 were attributed to electronic transitions of a peptide bond in the far UV region [75]. In this spectral region, the amides within the secondary structure components of a protein strongly absorb circularly polarized light and exhibit different numbers of electronic transitions for a given wavelength. Therefore, the CD spectrum of proteins in the far UV region is dominated by the absorption of the peptide bonds, and the absorption is dependent on the orientation and environment of the amide bond [85]. The peptide bond absorption is due to two electronic transitions: a strongly pronounced CD band of the $\pi \to \pi^*$ transition at 190 nm and a broader but weaker CD band of the des $\eta \to \pi^*$ transition between 210 and 220 nm (Figure 10A) [48,72,73,75,76,85–87]. In Figure 10B, the characteristic CD spectra of three secondary structures are shown for comparison with the experimentally obtained CD spectra (Figure 3). The CD spectrum of a "pure" α -helical structure shows two negative bands at 208 nm ($\pi \to \pi^*$) and 222 nm ($n \to \pi^*$) and a positive maximum at approximately 190 nm ($\pi \to \pi^*$) (orange) [87]. In "pure" β -sheet structures, a negative signal is observed at near 215 nm ($n \rightarrow \pi^*$) and a positive signal at about 196 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) [87]. The CD spectrum of the disordered structures stands out clearly. Here, a positive CD band at 212 nm and a negative one at 195 nm are characteristic [75,85].



Figure 10. (**A**) Energy level diagram with electronic transitions of a peptide bond in the far UV region. Bonding, non-bonding, and antibonding p-orbitals (π_b , π_{nb} and π^*) and two free electron pairs at the oxygen (η and η /) are shown [75,76]. (**B**) Characteristic CD spectra in the far UV region of "pure" α -helix, β -sheet, and disordered structures, redrawn from [85].

For quantification of the secondary structural elements of a protein sample, the far-UV CD spectrum obtained is understood as the empirical sum of the fractional multiples of the characteristic spectra for each type of secondary structure type [86,88–90]. For quantitative analysis of the CD spectrum of a protein and estimation of the proportions of secondary structures, the experimentally obtained far-UV CD spectrum of a protein is understood as a linear combination of the three most abundant secondary structures (α -helix, β -sheet, and random coil) at a given wavelength. In reality, combinations or superpositions of several CD spectra of the respective secondary structure types are obtained. As there is a correlation between the far-UV CD spectra and the secondary structure of the proteins, CD spectroscopy can be used to determine the proportions of secondary structures and to study changes in secondary structure [86,88–90].

The far-UV spectra of the native and unmodified α -LA (Figure 3, black and red curves) showed a positive maximum at 190 nm and two negative bands at approximately 208 and 220 nm, which is characteristic of an $\alpha + \beta$ class protein [60,91]. In agreement with the results of other studies, quantitative determination of the amount of secondary structures confirmed that native α -LA consists of 30% α -helix, 12% β -sheet, and 58% of regions with low structural complexity (Table 2) [36,92,93]. It has been described in the literature that the secondary structure of native α -LA consists of 26% α -helices, 14% β -sheets, and 60% disordered structures [36], and the tertiary structure consists of two domains [36,37,94]. Although a large cleft separates the large α -domain from the small β -domain, they are held together by an ionic calcium bond and the four disulfide bridges [35,36,95]. Three pH-stable α -helices (H1 (5–11), H2 (23–34) and H3 (86–98)) and a pH-dependent α -helix (H4 (105–110) and two smaller 310 helices: (h1 (18–20) and h3 (115–118)) build the large α -domain, with the flexible loop region at positions 105–110 adopting a helical structure for pH values between 6.5 and 8 [96]. The &-domain consists of three antiparallel &-sheets (S1 (41-44), S2 (47-50), S3 (55-56)), a short 310 helix (h1b (18-20), h2 (77-80), h3c (115-118)), and loops and disordered structures [32,37,95,97].

The unmodified α -LA control also showed comparable amounts of secondary structural elements, suggesting that neither the synthesis nor the work-up conditions have an effect on the structural properties of the protein. While the values of the molar ellipticity of the positive band and the negative bands between the BITC- α -LA derivative "low" and the control samples showed no significant differences (Figure 3, dark green curve), the quantitative determination of the secondary structures of the BITC- α -LA derivative "low" showed a slight decrease in the α -helical structure to 24% and an increase in the β -sheet content to 19%. The amount of lower complexity secondary structures remained almost constant. As a result of increasing the concentration of BITC used to synthesize the BITC- α -LA derivatives "medium" and "high," derivatization with BITC caused a decrease in band intensity at all wavelengths (Figure 3, light green and yellow curves). Increasing derivatization with BITC caused a further decrease in the α -helix content to 20 and 17%, with a concomitant increase in the ß-sheet structure content to 25 and 28%. The content of disordered structures remained unchanged. The results showed an influence on the secondary structure as a consequence of the BITC conjugation. As the degree of derivatization increased, a significant perturbation or successive change in the secondary structure of α -LA was documented. In summary, with increasing input concentration of BITC, a steady loss of α -helical fractions with a concomitant increase in the fractions of β -sheets was observed. Comparable results were recently obtained in a study investigating the conjugation of α -LA with polysaccharides [98]. The spectra of a pure and a conjugated protein were recorded by far UV-CD spectroscopy. Depending on the polysaccharides used, different degrees of reductions in α -helix fractions were observed [98]. Likewise, protein modification with, for example, polyphenols, oligosaccharides, and allicin showed a change in the secondary structure or conformation of proteins [99–101]. Rade-Kukic et al. (2011) also observed a change in secondary and tertiary structure depending on the amount of AITC bound to β -LG [1]. According to Kelly et al. (2005), an increase in molar ellipticities characteristic of α -helices may imply higher structural compactness. Conversely, the decrease in molar ellipticity of BITCtreated proteins would indicate less dense structures [73]. Similar findings were provided by the work of Das et al. (2014), who modified lysozyme, a structurally similar protein to α -LA, with different concentrations of ellipticin and then investigated the secondary structure using far-UV CD spectroscopy. By decreasing the band intensity between 208 and 230 nm, it was concluded that the typical α -helical structure of the protein was destabilized and unfolded as a result of the conjugation of ellipticin [102]. Chemical modification such as acetylations and sulfamidations as well as reactions with other secondary plant compounds such as polyphenols also resulted in similar restructuring and disruption of the secondary structure of the proteins, as reported by Gerbanowski et al. (1999), Schwenke et al. (2000), and Rawel et al. (2002, 2003) [60,91,103,104]. Sun et al. (2018) demonstrated that the addition of tetracycline hydrochloride (TCH) caused a loosening of the protein structure of lactoferrin. The CD spectra showed a decrease in negative band intensity as a result of the increasing degree of derivatization with TCH. They explained the reduction by breaking of hydrogen bonds due to TCH conjugation of lactoferrin and hypothesized that the altered secondary structure might also affect physiological functions [51].

It should be mentioned that the analysis of the amounts of β -sheets is complicated because this secondary structure produces only a relatively weak signal and cannot always be clearly differentiated from the signals of unfolded or disordered regions. Although it is not possible to obtain more detailed information about the exact secondary structure of proteins using CD spectroscopy, the additional value of the method is the ability to indicate denaturation or a structural change resulting from chemical modification and the ability to estimate the amounts of secondary structures, including α -helix, β -sheet, and disordered structures. For such studies, comparison with a CD spectrum of the native protein is indispensable [48,105]. More sensitive methods that can decipher smaller changes at the molecular level include fluorescence techniques [48,105].

3.3. Influence of BITC Conjugation on Temperature-Induced Conformational Changes of α -LA

The results of the CD experiments of the untreated α -LA control (Figure 4a) showed a decrease in the molar ellipticities of the double minimum and an increase in the molar ellipticities of the maximum at 190 nm in the temperature range from 30 to 50 °C, which could be indicative of higher structural compactness in the secondary structure according to Kelly et al. (2005) [73]. By further increasing the temperature (60–80 °C), a decrease in the minimum at 208 nm and the maximum at 190 nm, as well as a simultaneous increase in the minimum at 222 nm, were observed. These observations are indicative of a loss or a change of the secondary structure due to the increasing temperature.

Similar results were documented in the work of Lam et al. (2015). Although their focus was on the thermal pretreatment of the protein α -LA and subsequent study of the effect using CD spectroscopy, certain parallels are noted. They were able to observe a

decreased mean ellipticity curve when the temperature was increased from 25 to 65 °C, suggesting increased order in the secondary structures of α -LA. By further increasing the temperature to 95 °C, a loss of secondary structure was assumed, which was reflected in

temperature to 95 °C, a loss of secondary structure was assumed, which was reflected in an increase in the mean ellipticity curve in the wavelength range from 190 to 230 nm. They hypothesized that the protein underwent increased conformational entropy at temperatures up to 65 °C, which would result in the higher ordering of the polypeptide chains, whereas denaturing processes predominated at temperatures of 95 °C. Due to the fact that hydrogen bonds are broken at these temperatures, loss of secondary structure may consequently occur [28]. Another study confirmed that α -LA denatures irreversibly at temperatures above 90 °C [106].

For quantification of the α -helical portion of a protein, for example, CD data of molar ellipticity at 222 nm can be used, where the α -helical structure has a characteristic minimum ellipticity [85,107]. When comparing signals at a wavelength of 222 nm, differences between a folded and an unfolded protein can be large. However, an analogous method for estimating β -sheet or random coil structures does not exist [90,108]. For the derivatives (Figure 4b–d), an increase in the molar ellipticity of the minimum at 222 nm and a decrease in the maximum at 190 nm could already be noted at temperatures above 40 °C, suggesting a decrease in the α -helical fraction due to the temperature increase. In the α -LA control, the described effects could be observed only above a temperature of 60 °C.

Although the secondary structure appears relatively stable, it can be hypothesized that in addition to a dominant loss of the α -helical structure, an increase in the fractions of random coil or extended structures also affects the minimum at 209 nm. Thus, the decrease in the molar ellipticity of the minimum at 209 nm at temperatures above 50 °C for the α -LA control and for the BITC- α -LA derivative "small" could indicate a change in secondary structure. Considering Figure 10B, which shows the characteristic CD spectra of pure secondary structures, this relationship can be better visualized. While the fraction of the yellow curve (characteristic CD spectrum for proteins with pure α -helical structure) is decreased, the fraction of the blue (characteristic CD spectrum for proteins with random coil structure) and red (characteristic CD spectrum for proteins with random coil structure) curves can be increased. Presumably, this state is similar to the state that the BITC- α -LA derivatives "medium" and "high" already have with less thermal energy already at room temperature. The BITC- α -LA derivatives "medium" and "high" folded than the α -LA control and the BITC- α -LA derivative "low".

It can be summarized that with an increasing degree of derivatization, the differences of the molar ellipticities become increasingly smaller as a function of temperature. As already found out in Section 2.2, a change in the secondary structure fractions is evident with increasing BITC modification, although this difference between the samples could be increasingly lost at higher temperatures due to partial denaturation.

3.4. Influence of BITC Conjugation on Surface Hydrophobicity of α -LA

A commonly used extrinsic fluorescent dye is ANS, which is from the sulfonic acid group and is used to study unfolding or folding intermediates, detect protein aggregates, characterize changes in protein conformations, and measure surface hydrophobicity. Interaction of ANS with proteins is possible in two ways. On the one hand, there can be electrostatic interactions between the sulfonate group of ANS with positively charged side chains of the protein, and on the other hand, the interaction of ANS can occur via hydrophobic interactions with the hydrophobic regions on the surface of proteins [1,52–58]. While ANS does not fluoresce in aqueous polar solutions, the dye shows a blue shift of the fluorescence emission maximum and an increase in fluorescence intensity in apolar organic (hydrophobic) solutions or when bound to, for example, proteins [52,56,58,109–112].

The results in Figure 5 showed that unmodified α -LA exhibited low ANS fluorescence emission, suggesting that ANS molecules interacted with hydrophobic regions on the surface of the protein. Globular, water-soluble proteins in the native state, such as α -LA,

are thought to have low affinity or accessibility for ANS molecules due to the orientation of the hydrophobic protein side chains into the interior of the molecule. Although the hydrophobic core of most protein is typically shielded from the organic environment by a rigid tertiary structure, isolated hydrophobic groups may occur on the protein surface or be exposed in crevices so that even native globular proteins may have a few hydrophobic binding sites on the protein surface for ANS molecules and produce low fluorescence intensity [109,110,113]. This assumption is supported by previous results showing that native α -LA can bind up to five molecules of an ANS derivative [35,114]. In work described by Singh et al. (2006), it was added that the binding of ANS to the native state of α -LA was not very strong due to the lack of hydrophobic interactions [114].

Thus, while in the native, untreated state of α -LA, the hydrophobic side chains are mainly concentrated in the protein interior and are of limited availability to the ANS molecules, and an increasing ANS fluorescence intensity was documented with increasing degree of derivatization, suggesting that BITC conjugation exposed increased hydrophobic regions on the surface of α -LA and allowed them to interact with the ANS molecules. The resulting increase in binding affinity to ANS explained the increase in ANS fluorescence as a function of the concentration of BITC used. In summary, BITC conjugation resulted in a change of the hydrophobic character, more specifically, an increase in the surface hydrophobicity of α -LA [9].

Previous research regarding the change in surface hydrophobicity of other proteins showed similar effects after chemical modification. For example, a correlation between the conformational change and the increase in surface hydrophobicity of concanavalin A (ConA) as a result of the conjugation of sodiumdodecylsulfate (SDS) was documented [115]. Additionally, modifications of proteins, such as BSA, casein, and whey protein isolates, with citric acid or acyl groups (acylations) led to an increase in surface hydrophobicity with increasing degree of derivatization, which was attributed to a change in protein conformation and subsequent exposure of hydrophobic groups to the protein surface [116,117]. The relationship between the exposure of hydrophobic groups due to denaturation of proteins and the increase in surface hydrophobic as early as 1980 by Kato et al. [118].

Wilde et al. (2016) studied the interaction of β -LG with allicin and diallyl disulfide using RP-HPLC and far UV-CD spectroscopy to detect changes in surface hydrophobicity and secondary structure. They described the conjugation of the ligands and the resulting change in the secondary structure or loosening of the globular protein structure as the cause of the increased surface hydrophobicity of the protein [99]. In a follow-up study, Keppler et al. (2017) found that under neutral conditions, ANS binding was increased as a result of AITC conjugation to whey protein isolate (WPI). The increase in hydrophobic surface area was probably caused by changes in the conformation of WPI as a result of conjugation of the hydrophobic ligand AITC [9]. In another study, AITC conjugation to the whey protein β -LG was investigated [1]. The results of ANS measurements initially showed an increase in fluorescence intensity under neutral conditions, whereas there was a decrease in fluorescence emission as the degree of derivatization increased. The initial increase in ANS fluorescence was consistent with RP-HPLC results, which also showed an increase in hydrophobicity. The subsequent decrease in ANS fluorescence intensity due to increasing AITC modification was attributed to the change in protein conformation confirmed by CD experiments. The authors concluded that the increased surface hydrophobicity resulted from the AITC-induced conformational changes. Furthermore, improved emulsifying and foaming properties of the protein were obtained as a result of AITC conjugation to β -LG [1]. Similar effects of chemical modification on emulsifying and foaming properties of WPI were reported by Li et al. (2018) [116].

While conjugation with phenols on BSA resulted in a decrease in hydrophobic surface area and improved solubility [91], phenol adducts with myoglobin showed opposite effects. The myoglobin–phenol conjugates showed increased hydrophobicity and thus decreased

solubility [119,120]. Another study confirmed the correlation between increased surface hydrophobicity and decreased solubility by ANS fluorescence measurements [59].

Considering that the electrophilic ITC preferentially react with amino and thiol groups of the protein side chains, it is reasonable to assume that as a consequence of the introduction of the hydrophobic ligand BITC or by blocking the free amino and thiol groups, a decrease in polarity and a loss of charge cause the increase in surface hydrophobicity. In addition, the ITC-induced change in secondary structure favors the exposure of hydrophobic regions on the protein surface [1].

3.5. Influence of BITC Conjugation on the Hydrodynamic Radius of α -LA

Dynamic light scattering (DLS) is an analytical method for determining the size and size distribution and monitoring the aggregation behavior and ligand binding of proteins and other biomolecules, usually in the nanometer to submicrometer range [121–123]. The method measures the Brownian molecular motion of particles or molecules dissolved or dispersed in a liquid and uses the information to calculate the hydrodynamic radius [121–125].

Determination of the mean hydrodynamic radius of the unmodified α -LA control yielded a value of 1.76 \pm 0.24 nm, which is comparable to previously published values [95,126,127]. For example, Delavari et al. (2015) were able to determine a hydrodynamic diameter of 3.6 nm for α -LA [95]. As a result of the conjugation of BITC to α -LA, a significant increase in the hydrodynamic radius to a maximum of 89.37 \pm 14.86 nm was observed regardless of the concentration of BITC used. Furthermore, multiple signals and broader peaks were observed, indicating inhomogeneous and highly polydisperse protein solutions.

Similar effects on the hydrodynamic radius of proteins as a result of interaction with ligands were documented by Delavari et al. (2015) and Abasi et al. (2014) [95,128]. Thus, the interaction of α -LA with vitamin D3 showed an increase in hydrodynamic diameter from 3.6 to 125 nm. Furthermore, they found an altered secondary structure and increased surface hydrophobicity as a result of the interaction [95]. Abasi et al. (2014) reported a nanoparticle consisting of vitamin D3 and homogenized whey protein isolate with similar size [95,128]. Presumably, the increase in particle size is due to the encapsulation of vitamin D3 to the α -LA [128] or hydrophobic intramolecular interactions between the protein molecules [129]. It has been suggested that upon binding of vitamin D3 to α -LA, hydrophobic side chains are exposed, which may allow hydrophobic interactions between protein molecules, leading to larger complexes [129]. A further study showed that when oleic acid was used as a hydrophobic ligand, the α -LA derivatives were larger than those of other proteins [126].

It should be noted that in DLS, an intensity-weighted hydrodynamic radius is determined, and this is strongly dominated by larger particles/molecules at the expense of smaller particles/molecules [1,130]. That is, due to the fact that the intensity of the scattered light increases proportionally to the sixth power of the diameter, the scattered light from a small population of large particles/molecules overlaps the scattered light from smaller particles to such an extent that they can no longer be detected, leading to biased radius distributions [131]. For a complementary quantitative analysis of particle sizes in polydisperse solutions, alternative methods, such as size exclusion chromatography, should be used [130].

3.6. Influence of BITC Conjugation on Tryptic Digestion of α -LA

As trypsin preferentially cleaves after the amino acids lysine and asparagine [132] and ITC has been shown to react with e-amino groups of lysine side chains several times [43,45,67,69], it is reasonable to assume that BITC modification of the amino group of the amino acid lysine could lead to masking of trypsin cleavage sites/steric hindrance of tryptic hydrolysis [7,17,42,132]. This assumption can be confirmed by the present results, which showed that more elongated modified peptide sequences were detected with increasing derivatization. Furthermore, this assumption was supported by the fact that

20 of 30

the tryptic hydrolysis of the BITC-modified α -LA derivatives yielded a higher amount of peptides compared to that of the native α -LA control sample, again emphasizing that as a result of the conjugation of BITC to the amino groups of lysine, the protein is protected from subsequent tryptic hydrolysis [7,65]. The present findings were in agreement with the results of previous studies, which also showed that tryptic hydrolysis was inhibited for ITC-modified β -lactoglobulin [7], egg white proteins, myoglobin, legumin [133], and glycosylated proteins [134,135].

Moreover, the results of mass spectrometry analysis showed that the BITC-modified peptides eluted at later retention times, which was consistent with the experimentally obtained ANS fluorescence results, indicating higher hydrophobicity. Similar results were shown in the work of Wilde et al. (2016), who also linked an increase in retention time to an increase in hydrophobicity as a result of the modification of β -LG by allicin and diallyl disulfide [99].

In agreement with previous results, it was repeatedly shown that a higher degree of derivatization could be achieved with increasing input concentration of BITC, resulting in successive blocking of several tryptic cleavage sites of α -LA and consequently yielding longer peptides [7].

It is conceivable that via the classical CID fragmentation method, a clear localization of the modification is hardly possible due to the complete cleavage of the BITC group. In contrast to CID, newer fragmentation techniques are based on a destabilization of the peptide ions via a reaction with electrons (electron-capture dissociation, ECD) or radical anions (electron-transfer dissociation, ETD) [136]. ECD and ETD are particularly used to characterize labile protein modifications, preferentially generating c- and z-fragment ions. A key advantage of these methods is that modifications that are unstable under collision-induced fragmentation remain intact, allowing unambiguous localization. Thus, labile histidine and lysine modifications/phosphorylations can be identified [137].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

1,4-Dioxane, acetonitrile, ethanol, disodium hydrogen phosphate, hydrochloric acid (32%), isoleucine, sodium dihydrogen phosphate, sodium hydrogen carbonate, and dialysis membranes (regenerated cellulose, molecular weight cutoff < 3.5 kDa) were obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany. Bovine α -lactalbumin (α -LA) as model protein, benzyl isothiocyanate (98%), dithiothreitol (DTT), *n*-acetyl-L-cysteine, o-phthalaldehyde, 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt, and trypsin from porcine pancreas were purchased from Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany. Formic acid and urea were purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany. C₁₈ solid-phase extraction cartridges (1 mL, 100 mg) were purchased from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany. All solvents were of HPLC grade; otherwise, ACS grade was used. Water was double-distilled (ddH₂O).

4.2. Methods

4.2.1. Preparation of ITC-α-LA Conjugates

The preparation of the ITC-protein conjugates was carried out according to the instructions of Spöttel et al. [47]. Briefly, for the synthesis of ITC-protein conjugates, α -LA protein was first dissolved in water (0.714 mM) and then mixed with three to six different concentrations of BITC ranging from 0 to 113 mM (Table 7). For this purpose, the appropriate amount of BITC was dissolved in 1,4-dioxane. After the incubation for 20 h at 37 °C, the reaction solution was dialyzed overnight and subsequently lyophilized for removing as much as residual BITC. To prevent cold denaturation, for lyophilization, the samples were first frozen in liquid nitrogen and then transferred to a laboratory freeze dryer (Christ RVC 2–25 CDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). In order to make a comparison between BITC-treated and untreated α -LA and to be able to exclude any influence of the synthesis and work-up conditions, control samples were prepared and treated in the same way as the modifications except that no BITC was added. The freeze-dried samples were stored at -20 °C until analysis. Depending on the subsequent analysis, the freeze-dried sample was dissolved in a suitable solvent.

Table 7. Summary of synthesis parameters to represent BITC protein conjugates and control sample.

Sample	c(α-LA) (mM)	c(BITC) (mM)	$B_{BITC/\alpha-LA}$
α -LA control	0.07	-	0
BITC-α-LA derivate "minimal"	0.07	0.6	10
BITC-α-LA derivate "minor"	0.07	1.9	25
BITC-α-LA derivate "low"	0.07	3.8	50
BITC-α-LA derivate "medium"	0.07	38	500
BITC-α-LA derivate "high"	0.07	75	1000
BITC-α-LA derivate "very high"	0.07	113	1500

4.2.2. Determination of Free Amino Groups Using O-Phthaldialdehyde

A commonly used reagent for the determination of free α - and ε - amino groups is *ortho*-phthaldialdehyde (OPA), which reacts with primary amino groups in the presence of a thiol compound such as *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) to form a 1-alkylthio-2-alkyl-substituted isoindole. The fluorescent isoindole can absorb light at a wavelength of 340 nm and has been quantified spectrophotometrically [1,138–143].

For the quantitative determination of free α - and ε -amino groups before and after conjugation of BITC, the method using OPA was performed [144]. For this purpose, the protocol provided by the Interchim Deutschland GmbH (Mannheim, Germany) was used as a basis for the measurement of free amino groups in proteins, which was slightly adapted [145]. Major differences were that instead of α -acetyl-lysine, isoleucine was used as a standard, and instead of mercaptoethanol, *N*-acetyl-L-cysteine was used as a thiol component. The isoleucine used contains one amine per molecule, allowing a ratio of labeling to be determined.

Briefly, for the quantitative determination of free amino groups of unmodified and BITC-modified α -LA, six different modifications and a control sample were prepared as described previously (Table 7, Section 4.2.1). The lyophilized samples were dissolved in 2 mL carbonate buffer (50 mM, pH 10) and each diluted 1:5 (71.4 μ M). To prepare the OPA reagent, 5 mg OPA and 11.7 mg N-acetyl-L-cysteine (NAC) were dissolved in $100 \ \mu L$ ethanol followed by 10 mL carbonate buffer (50 mM, pH 10). The OPA reagent was protected from direct light and used within two hours. For the external calibration series, a 10 mM isoleucine standard solution was prepared in carbonate buffer followed by a serial dilution of 10–522 μ M of the standard solution in carbonate buffer. The preparation of the calibration series was performed with seven calibration points. A total of 100 μ L of OPA reagent was added to 100 μ L of each of the calibration solutions and the protein solutions to be examined and incubated for two minutes at 23 °C in a 96-well microtiter plate. Transparent plates were used for the measurement. Subsequently, the absorbance was determined photometrically at a wavelength of 340 nm, using a SynergyTM HT (BioTek Instruments Inc., Vermont, VT, USA). A comparison was made between the calculated free amino groups of the control sample and those of the BITC-modified derivatives. For this purpose, the concentration of free amino groups of the control sample was normalized to 100%. The assay of accessible amino groups was performed in triplicate.

4.2.3. Investigation of Secondary Structure by Far-UV CD Spectroscopy

CD spectroscopy was used to evaluate the influence of BITC conjugation on the secondary structure of α -LA. In order to estimate and compare the composition of the secondary structures of the untreated α -LA control and the BITC- α -LA derivatives "low," "medium," and "high," CD experiments were performed using a Jasco J-815 spectrometer (Jasco Inc., Mary's Court, MD, USA).

After lyophilization, the samples under investigation were dissolved in 1 mL of 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 8) and diluted to a final protein concentration of

approximately 16–18 μ M. When selecting the buffer, it is important to ensure that the buffer used has the lowest possible self-absorption in the short wavelength region to minimize signal interference. In addition, a native protein control was measured to exclude any impact of synthesis and purification on the protein structure. For this purpose, 1 mg of α -LA was weighed, dissolved in the sodium phosphate buffer, and diluted.

The CD experiments were performed under permanent nitrogen flow to protect the optical components of the spectropolarimeter from ozone gas. Ozone gas can be formed from atmospheric oxygen under UV irradiation, which can attack the mirror surfaces and consequently reduce the reflectivity and longevity of the mirrors and reduce the efficiency in focusing the light through the monochromator. In addition, molecular oxygen absorbs below 195 nm, but since this spectral region is particularly important for estimating the secondary structure of proteins, the lower the wavelength during the measurement, the greater the flux rate of nitrogen must be to minimize oxygen absorption.

Measurements were performed in the far-UV range between 185 and 260 nm in a quartz cell of 1 mm slice thickness, a step size of 0.1 nm per data point, and a scanning speed of 100 nm/min. The temperature was set to 20 °C for all measurements using a Peltier element (Jasco Inc., Mary's Court, MD, USA). For each sample, 15 spectra were recorded and averaged. Then, the averaged ellipticity of the buffer solution was subtracted from the CD data of all samples. The measured ellipticities were scaled and expressed as molar ellipticity (MME) in deg cm² dmol⁻¹:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot M}{d \cdot c \cdot 100,000}$$

where θ is the ellipticity in mdeg, *M* is the molecular weight of the protein in g/mol, *d* is the path length of the cuvette in cm, and *c* is the concentration of the protein in g/mL.

The experimentally obtained spectra provided a fingerprint of the secondary structure composition of untreated and BITC-treated α -LA.

Online services can be used to facilitate the analysis of proteins. To evaluate the data, reference spectra of proteins with known 3D structures listed in an available database (the protein circular dichroism data bank, or PCDDB) are used. In addition, the CD spectroscopic data were analyzed using the DichroWeb online server (http://dichroweb.cryst. bbk.ac.uk/html/links.shtml; accessed on 10 October 2021). DichroWeb provides several algorithms to deconvolute CD spectra. These include, for example, the K2d method [146], which has integrated protein reference data [147]. The K2D method of the Dichroweb server was used to deconvolute the CD data and determine the relative secondary structure composition of each sample. Thus, based on a far-UV CD spectrum of a protein, the percentages of the respective secondary structures were calculated [75].

4.2.4. Investigation of Temperature-Induced Conformational Changes Using Far UV CD Spectroscopy

For the analysis of the temperature-induced change in the secondary structures of the untreated α -LA control and the BITC- α -LA derivatives "low," "medium," and "high," the samples were prepared, measured, and analyzed according to Section 4.2.3. Major deviation in the performance was that the CD spectra were recorded using the Peltier element (Jasco, 21601 MD, USA) in a temperature range of 30–80 °C with an increment of 2 °C/min. To investigate the temperature stability of the protein solutions, the temperature was increased by 2 °C per minute to adjust and stabilize the temperature for the next measurement.

4.2.5. Investigation of Surface Hydrophobicity Using ANS Fluorescence

To measure the surface hydrophobicity of untreated and BITC-treated α -LA, 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid was used as hydrophobic fluorescent probe that interacts with hydrophobic/nonpolar regions on the protein surface and generates a fluorescent signal [56,110,118,148]. The measurements were performed following the work of Kato et al. [118] and Lam et al. [149].

BITC-treated and untreated protein samples were prepared as previously described. After lyophilization, the freeze-dried samples were dissolved in 2 mL of phosphate buffer (0.01 M, pH 8) to give a protein concentration of 0.035 mM. To prepare the ANS reagent, 29.0 mg of ANS ammonium salt was dissolved in 10 mL of demineralized water (9.17 mM). After aliquoting the protein solutions into three parts of 0.4 mL each, 77.9 μ L of ANS reagent was added to each part, resulting in a protein/ANS concentration ratio of 1/50. The protein solutions were incubated for five minutes in the absence of light. Subsequently, the measurement was performed using a 384-well black corning flat bottom plate on the SpectraMax[®] M3 fluorescence microplate reader from Moleculare Devices LLC (San Jose, CA, USA). For this purpose, 80 μ L of each sample solution was pipetted three times into the microplate, and then the fluorescence was measured at an excitation wavelength of 390 nm in the wavelength range of 430–600 nm. The surface hydrophobicity was determined in triplicate for each sample.

4.2.6. Determination of the Hydrodynamic Radius Using Dynamic Light Scattering

Dynamic light scattering (DLS) can be used to obtain information on the aggregation behavior, hydrodynamic radius, and monodispersity of BITC-modified and unmodified α -LA (derivatives). DLS measurements were performed using a SpectroSize300 instrument with an implemented 660 nm wavelength diode laser (Xtal-Concepts GmbH, Germany). After synthesis, the unmodified α -LA control sample and the BITC- α -LA derivatives "low," "medium," "high," and "very high" were centrifuged at 16,000× *g* for 10 min and then transferred to a quartz cuvette without air bubbles. The measurement was carried out at a temperature of 20 °C and a scattering angle of 90° (viscosity of the sample: 2.18 cP; refractive index: 1.33). For each sample, 20 DLS measurements for 20 s per measurement were performed. The hydrodynamic radius was calculated as an average value from the 20 scans. The particle size distribution was calculated using the CONTIN algorithm, taking into account the viscosity of the medium. The diffusion coefficient D was determined based on an autocorrelation analysis of the scattered light intensity governed by translational particle diffusion, and the average hydrodynamic radius was then calculated using the Stokes–Einstein equation:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

where R_H is the hydrodynamic radius (m), k is the Boltzmann constant [1.380642 × 10⁻²³ JK⁻¹], T is the absolute temperature (K), η is the viscosity of the solution [kg m⁻¹ s⁻¹], and D is the translational diffusion coefficient [m² s⁻¹] [150].

4.2.7. Tryptic Hydrolysis of Unmodified and BITC-Modified α-LA

Tryptic hydrolysis of the freeze-dried BITC-treated and untreated protein samples was performed according to the instructions described by Spöttel et al. [47]. For this purpose, the freeze-dried samples were resolved in 50 μ L of 6 M aqueous urea followed by addition of 100 mM DTT (in 100 mM sodium hydrogen carbonate) to cleave disulfide bridges. After incubation at 60 °C for 10 min, 425 μ L 100 mM sodium hydrogen carbonate (in water) was added. Tryptic hydrolysis was performed by adding the trypsin solution (1 mg/mL in 0.1 mM HCl) to the protein solution at a ratio of 1:100 for 16 h at 37 °C. Subsequently, the enzymatic hydrolysis was terminated by the addition of 0.2% formic acid. Solid-phase extraction was used to purify the digested samples. Therefore, the chromatography material was first conditioned and equilibrated with 60% ACN (in water) and 0.2% formic acid (in water). Subsequently, the samples were applied, rinsed with 0.2% formic acid (in water), and then eluted with 60% ACN (in water). Finally, the samples were concentrated with gaseous nitrogen and dissolved in 0.2% formic acid (in water) for further analysis.

4.2.8. LC-ESI-MS/MS of Unmodified and BITC-Modified α-LA

Chromatographic separation of tryptic untreated and BITC-modified protein hydrolysates was performed on a reversed-phase HPLC column (Nucleodur, 5 µm C8 100 Å, 150 × 2 mm) from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany) and a Dionex UltiMate[™] 3000 UHPLC system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), each with 0.1% formic acid. Gradient elution was performed in several steps, starting at 97% A for 5 min, decreasing linearly to 80% A in 10 min, and kept constant for 5 min. Subsequently, there was a further reduction in mobile phase A to 70% A in 5 min, followed by a plateau for 5 min and a final decrease to 30% A in 10 min, which was held constant for 6 min. The gradient was returned to 97% A in 4 min, followed by a 15 min re-equilibration.

The injection volume was 10 μ L at a flow rate of 200 μ L/min for all samples. The LC-MS system was controlled by HyStar 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Detection of the previously chromatographically separated tryptic untreated and BITCmodified protein hydrolysates was performed using an ESI-MS ion trap mass analyzer in positive ion mode (amazon speed ETD, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with the following settings analyzed: ion spray voltage: 4.5 kV; ion source heating: 350 °C; source gas: 55 psi. Using the UniProtKB database (http://www.uniprot.org/; accessed on 20 September 2021) and the SIB Bioinformatics Resource Portal ExPASy (https://www. expasy.org/; accessed on 20 September 2021), the experimentally obtained data could be compared with a theoretical digest of α -LA so that the obtained signals could be assigned and the resulting peptides could be identified.

5. Conclusions

In summary, it was shown that with increasing input concentration of BITC, an increasing degree of derivatization could be achieved, which was accompanied by a successive change in the secondary structure of α -LA (loss of α -helix moieties, with a concomitant increase in β -sheet moieties). The restructuring was related to the increased surface hydrophobicity because the change of the secondary structure was assumed to expose more hydrophobic regions on the protein surface. Accordingly, the change in protein structure resulting from BITC conjugation may have exposed hydrophobic regions (increase in surface hydrophobicity). This further enables hydrophobic interactions between multiple protein molecules, leading to larger α -LA complexes/aggregates (increase in hydrodynamic radius) [129,151], which could potentially be promoted via surface-exposed β -sheet structure. This assumption could explain the increase in hydrodynamic radius due to BITC modification. In addition, the mass spectrometric analysis revealed that as a result of BITC modification, the tryptic digestibility of α -LA was decreased, which was attributed to steric blocking of the tryptic cleavage sites and the two modified amino acids that were located at the lysine side chains (K32 and K113) in the amino acid sequence of α -LA.

These studies are of particular importance in order to assess the influence of chemical modifications on the molecular structure of proteins since structural changes can alter the functional and biological properties of proteins [48,49,72,75,76]. Furthermore, the determination of freely available amino groups plays a crucial role with regard to the properties and functionality of proteins [1,152]. Knowledge of the influence of chemical modifications on protein structure and surface hydrophobicity allows conclusions to be drawn about solubility, aggregation, and physical stability [52,153], which are particularly important with regard to food processing and food safety [1,51].

Author Contributions: Conceptualization, J.S., S.F. and S.R.; validation, J.S. and J.B.; formal analysis, J.S., J.B. and S.F.; investigation, J.S., J.B. and S.F.; resources, S.R.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, J.S., S.F. and S.R.; visualization, J.S.; supervision, S.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

- Rade-Kukic, K.; Schmitt, C.; Rawel, H.M. Formation of conjugates between β-lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* 2011, 25, 694–706. [CrossRef]
- Sønderby, I.E.; Geu-Flores, F.; Halkier, B.A. Biosynthesis of glucosinolates—Gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 2010, 15, 283–290. [CrossRef]
- 3. Fernando, R.C.; Weiß-Schmidt, P. Sekundäre Pflanzenstoffe: Bioaktive substanzen aus obst und gemüse in der krebsprävention. EHK 2007, 56, 192–197. [CrossRef]
- 4. Herr, I.; Büchler, M. Glucosinolate der kreuzblütlerfamilie in prävention und therapie maligner tumore. *Dtsch. Z. Onkol.* 2009, 41, 109–114. [CrossRef]
- Haller, D.; Grune, T.; Rimbach, G. Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe; Springer Spektrum: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; ISBN 9783642293733.
- 6. Kühn, C.; von Oesen, T.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of isothiocyanate-protein conjugates in milk and curd after adding garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Food Res. Int.* **2018**, *108*, 621–627. [CrossRef] [PubMed]
- Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Tholey, A.; Schwarz, K. Interaction of -lactoglobulin with small hydrophobic ligands— Influence of covalent AITC modification on -LG tryptic cleavage. *Food Biophys.* 2014, 9, 349–358. [CrossRef]
- 8. Juge, N.; Mithen, R.F.; Traka, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, *64*, 1105–1127. [CrossRef] [PubMed]
- 9. Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Berton-Carabin, C.; Nipoti, E.; Coenye, T.; Schwarz, K. Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 1 physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7. *Food Hydrocoll.* **2017**, *65*, 130–143. [CrossRef]
- Kühn, C.; Von Oesen, T.; Herz, C.; Schreiner, M.; Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Rohn, S. In vitro determination of protein conjugates in human cells by LC-ESI-MS/MS after benzyl isothiocyanate exposure. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 6727–6733. [CrossRef] [PubMed]
- 11. Beevi, S.S.; Mangamoori, L.N.; Dhand, V.; Ramakrishna, D.S. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L. *Foodborne Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 129–136. [CrossRef]
- Lee, Y.M.; Seon, M.R.; Cho, H.J.; Kim, J.S.; Park, J.H.Y. Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. J. Mol. Med. 2009, 87, 1251–1261. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Sofrata, A.; Santangelo, E.M.; Azeem, M.; Borg-Karlson, A.K.; Gustafsson, A.; Pütsep, K. Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of Salvadora persica is highly active against gram-negative bacteria. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23045. [CrossRef] [PubMed]
- Guzmán-Pérez, V.; Bumke-Vogt, C.; Schreiner, M.; Mewis, I.; Borchert, A.; Pfeiffer, A.F.H. Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from Tropaeolum majus reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells. *PLoS ONE* 2016, 11, e162397. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Kreis, W. Sekundäre Pflanzenstoffe und Krebs. Dtsch. Z. Onkol. 2009, 41, 100–108. [CrossRef]
- 16. Zhang, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. Mol. Nutr. Food Res. 2010, 54, 127–135. [CrossRef]
- 17. Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Schreiner, M.; Rohn, S. Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angew. Chemie-Int. Ed.* **2014**, *53*, 11430–11450. [CrossRef]
- 18. Cejpek, K.; Valusek, J.; Velisek, J. Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3560–3565. [CrossRef]
- 19. Hanschen, F.S.; Brüggemann, N.; Brodehl, A.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L.W. Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7735–7745. [CrossRef]
- 20. Zhang, Y.; Talalay, P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* **1994**, 54, 19761981.
- 21. Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Schwarz, K. Differences in binding behavior of (-)-epigallocatechin gallate to βlactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). *J. Mol. Recognit.* **2015**, *28*, 656–666. [CrossRef]
- Keppler, J.K.; Steffen-Heins, A.; Berton-Carabin, C.C.; Ropers, M.H.; Schwarz, K. Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 2: Influence of the protein modification on the surface activity in an O/W system. *Food Hydrocoll.* 2018, *81*, 286–299. [CrossRef]
- 23. Bock, A.; Steinhäuser, U.; Drusch, S. Partitioning behavior and interfacial activity of phenolic acid derivatives and their impact on β-lactoglobulin at the oil-water interface. *Food Biophys.* **2021**, *16*, 191–202. [CrossRef]

- 24. Stanciuc, N.; Râpeanu, G. An overview of bovine a-lactalbumin structure and functionality. *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati-Fascicle VI–Food Technol.* **2010**, *34*, 82–93.
- 25. Smithers, G.W. Whey and whey proteins-From "gutter-to-gold". Int. Dairy J. 2008, 18, 695–704. [CrossRef]
- Smithers, G.W.; Ballard, F.J.; Copeland, A.D.; De Silva, K.J.; Dionysius, D.A.; Francis, G.L.; Goddard, C.; Grieve, P.A.; Mcintosh, G.H.; Mitchell, I.R.; et al. New Opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 1996, 79, 1454–1459. [CrossRef]
- 27. Kinsella, J.E. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1984, 21, 197–262. [CrossRef]
- 28. Lam, R.S.H.; Nickerson, M.T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food Chem.* **2015**, *173*, 163–170. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Farrell, H.M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G.T.; Brown, E.M.; Butler, J.E.; Creamer, L.K.; Hicks, C.L.; Hollar, C.M.; Ng-Kwai-Hang, K.F.; Swaisgood, H.E. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 2004, *87*, 1641–1674. [CrossRef]
- Kamau, S.M.; Cheison, S.C.; Chen, W.; Liu, X.M.; Lu, R.R. Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010, 9, 197–212. [CrossRef]
- Brew, K.; Castellino, F.J.; Vanaman, T.C.; Hill, R.L. The complete amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 4570–4582. [CrossRef]
- 32. Permyakov, E.A.; Berliner, L.J. α-lactalbumin: Structure and function. FEBS Lett. 2000, 473, 269–274. [CrossRef]
- 33. Bramaud, C.; Aimar, P.; Daufin, G. Thermal isoelectric precipitation of α-lactalbumin from a whey protein concentrate: Influence of protein–calcium complexation. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 121–130. [CrossRef]
- 34. Jackson, J.G.; Janszen, D.B.; Lonnerdal, B.; Lien, E.L.; Pramuk, K.P.; Kuhlman, C.F. A multinational study of α-lactalbumin concentrations in human milk. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 517–521. [CrossRef]
- 35. Permyakov, E.A. α-Lactalbumin, amazing calcium-binding protein. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1210. [CrossRef]
- 36. Deeth, H.; Bansal, N. Whey Proteins; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9780128121245.
- Jakopović, K.L.; Barukčić, I.; Božanić, R. Physiological significance, structure and isolation of α-lactalbumin. *Mljekarstvo* 2016, 66, 3–11. [CrossRef]
- 38. Chang, J.Y.; Li, L. Pathway of oxidative folding of α-lactalbumin: A model for illustrating the diversity of disulfide folding pathways. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8405–8413. [CrossRef]
- Rao, K.R.; Brew, K. Calcium regulates folding and disulfide-bond formation in α-lactalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 163, 1390–1396. [CrossRef]
- 40. Pripp, A.H.; Vreeker, R.; Van Duynhoven, J. Binding of olive oil phenolics to food proteins. J. Sci. Food Agric. 2005, 85, 354–362. [CrossRef]
- 41. Katsuragi, Y.; Kashiwayanagi, M.; Kurihara, K. Specific inhibitor for bitter taste: Inhibition of frog taste nerve responses and human taste sensation to bitter stimuli. *Brain Res. Protoc.* **1997**, *1*, 292–298. [CrossRef]
- 42. Rawel, H.M.; Kroll, J.; Schröder, I. Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation. *Nahrung-Food* **1998**, 42, 197–199. [CrossRef]
- 43. Kroll, J.; Noack, J.; Rawel, H.; Kroeck, R.; Proll, J. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with egg-white protein fractions. J. Sci. Food Agric. 1994, 65, 337–345. [CrossRef]
- 44. Keppler, J.K.; Schwarz, K. Increasing the emulsifying capacity of whey proteins at acidic pH values through covalent modification with allyl isothiocyanate. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *522*, 514–524. [CrossRef]
- 45. Kroll, J.; Rawel, H.; Kröck, R.; Proll, J.; Schnaak, W. Interactions of isothiocyanates with egg white proteins. *Food Nahrung* **1994**, *38*, 53–60. [CrossRef]
- 46. Rawel, H.; Kroll, J.; Haebel, S.; Peter, M. Reactions of a glucosinolate breakdown product (benzyl isothiocyanate) with myoglobin. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1305–1311. [CrossRef]
- 47. Spöttel, J.; Brockelt, J.; Badekow, S.; Rohn, S. Immunological analysis of isothiocyanate-modified α-lactalbumin using highperformance thin layer chromatography. *Molecules* **2021**, *26*, 1842. [CrossRef]
- 48. Kelly, S.M.; Price, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1997**, 1338, 161–185. [CrossRef]
- Venyaminov, S.Y.; Yang, J.T. Determination of protein secondary structure. *Circ. Dichroism Conform. Anal. Biomol.* 1996, 69–107. [CrossRef]
- Keppler, J.K.; Schwarz, K.; van der Goot, A.J. Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 101, 38–49. [CrossRef]
- 51. Sun, Q.; Gao, X.; Bi, H.; Xie, Y.; Tang, L. Assessment of binding interaction between bovine lactoferrin and tetracycline hydrochloride: Multi-spectroscopic analyses and molecular modeling. *Molecules* **2018**, *23*, 1900. [CrossRef]
- 52. Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* 2008, 25, 1487–1499. [CrossRef]
- 53. Acharya, P.; Rao, N.M. Stability studies on a lipase from Bacillus subtilis in guanidinium chloride. *J. Protein Chem.* **2003**, *22*, 51–60. [CrossRef] [PubMed]
- 54. Anraku, M.; Yamasaki, K.; Maruyama, T.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm. Res.* 2001, *18*, 632–639. [CrossRef] [PubMed]

- 55. Goto, Y.; Fink, A.L. Conformational states of β-lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* **1989**, *28*, 945–952. [CrossRef] [PubMed]
- 56. Cardamone, M.; Puri, N.K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* **1992**, *282*, 589–593. [CrossRef] [PubMed]
- 57. Qadeer, A.; Rabbani, G.; Zaidi, N.; Ahmad, E.; Khan, J.M.; Khan, R.H. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate (ANS) Is not a desirable probe for determining the molten globule state of chymopapain. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50633. [CrossRef]
- 58. Alizadeh-Pasdar, N.; Li-Chan, E.C.Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* 2000, *48*, 328–334. [CrossRef] [PubMed]
- 59. Hayakawa, S.; Nakai, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 486–491. [CrossRef]
- 60. Gerbanowski, A.; Malabat, C.; Rabiller, C.; Guéguen, J. Grafting of aliphatic and aromatic probes on rapeseed 2S and 12S proteins: Influence on their structural and physicochemical properties. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5218–5226. [CrossRef]
- 61. Lottspeich, F.; Engels, J. *Bioanalytik*; Spektrum Academischer: Heidelberg, Germany, 2012.
- 62. Biemann, K. Mass spectrometry of peptides and proteins. Annu. Rev. Biochem. 1992, 61, 977–1010. [CrossRef]
- 63. Roepstorff, P.; Fohlman, P. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601. [CrossRef]
- Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Stuhldreier, M.C.; Temps, F.; Tholey, A.; Schwarz, K. Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate to β-lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014, *32*, 1103–1117. [CrossRef] [PubMed]
- 65. Keppler, J.K.; Sönnichsen, F.D.; Lorenzen, P.C.; Schwarz, K. Differences in heat stability and ligand binding among β-lactoglobulin genetic variants A, B and C using 1H NMR and fluorescence quenching. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics* **2014**, *1844*, 1083–1093. [CrossRef] [PubMed]
- 66. Kroll, J.; Rawel, H.; Kröck, R.; Schnaak, W. Interaction of benzyl isothiocyanate with egg white proteins. *Food/Nahrung* **1993**, 37, 179–181. [CrossRef]
- 67. Kroll, J.; Rawel, H. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with myoglobin. J. Sci. Food Agric. 1996, 72, 376–384. [CrossRef]
- 68. Kawakishi, S.; Kaneko, T. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. J. Agric. Food Chem. 1987, 35, 85–88. [CrossRef]
- 69. Rawel, H.M.; Kroll, J. Some aspects of reactions of benzyl isothiocyanate with bovine sarcoplasmic proteins. *Food Nahrung* **1995**, 39, 465–474. [CrossRef]
- 70. Rutherfurd, S.M. Food Composition and additives: Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. J. AOAC Int. 2010, 93, 1–8. [CrossRef]
- 71. Kishore Kumar Murthy, N.V.; Narasinga Rao, M.S. Interaction of allyl isothiocyanate with mustard 12S Protein. J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 448–452. [CrossRef]
- 72. Woody, R.W. Circular dichroism. Methods Enzymol. 1995, 246, 34-71. [CrossRef]
- 73. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics* 2005, 1751, 119–139. [CrossRef] [PubMed]
- 74. Drake, A.F. Polarisation modulation—The measurement of linear and circular dichroism. J. Phys. Sci. Instrum. 1986, 19, 170–181. [CrossRef]
- 75. Bulheller, B.M.; Rodger, A.; Hirst, J.D. Circular and linear dichroism of proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 2020–2035. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Whitmore, L.; Wallace, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **2008**, *89*, 392–400. [CrossRef] [PubMed]
- 77. Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: A comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J. Protein Chem.* **1996**, *15*, 265–272. [CrossRef]
- 78. Moriyama, Y.; Takeda, K. Protective effects of small amounts of bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate on the helical structures of human and bovine serum albumins in their thermal denaturations. *Langmuir* **2005**, *21*, 5524–5528. [CrossRef] [PubMed]
- Moriyama, Y.; Takeda, K. Re-formation of the helical structure of human serum albumin by the addition of small amounts of sodium dodecyl sulfate after the disruption of the structure by urea. A comparison with bovine serum albumin. *Langmuir* 1999, 15, 2003–2008. [CrossRef]
- 80. Parker, W.; Song, P.S. Protein structures in SDS micelle-protein complexes. *Biophys. J.* 1992, 61, 1435–1439. [CrossRef]
- 81. Alcala, J.R.; Gratton, E.; Prendergast, F.G. Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions. *Biophys. J.* **1987**, *51*, 925–936. [CrossRef]
- 82. Santra, M.K.; Banerjee, A.; Rahaman, O.; Panda, D. Unfolding pathways of human serum albumin: Evidence for sequential unfolding and folding of its three domains. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *37*, 200–204. [CrossRef]
- 83. Moriyama, Y.; Kawasaka, Y.; Takeda, K. Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 257, 41–46. [CrossRef]
- 84. Sreerama, N.; Venyaminov, S.Y.; Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 243–251. [CrossRef] [PubMed]

- 85. Corrêa, D.; Ramos, C. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem. Res.* **2009**, *3*, 164–173.
- 86. Greenfield, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 2007, 1, 2876–2890. [CrossRef] [PubMed]
- 87. Sreerama, N.; Woody, R.W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* 2004, 383, 318–351. [CrossRef]
- 88. Johnson, W.C. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **1990**, 7, 205–214. [CrossRef]
- Chen, Y.-H.; Yang, J.; Chau, K. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 1974, *13*, 3350–3359. [CrossRef]
- 90. Wei, Y.; Thyparambil, A.A.; Latour, R.A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteom.* **2014**, *1844*, 2331–2337. [CrossRef]
- 91. Rawel, H.M.; Rohn, S.; Kruse, H.P.; Kroll, J. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogeanic acid. *Food Chem.* **2002**, *78*, 443–455. [CrossRef]
- 92. Polverino de Laureto, P.; Frare, E.; Gottardo, R.; van Dael, H.; Fontana, A. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2932–2946. [CrossRef]
- Brew, K. α-Lactalbumin. In Advanced Dairy Chemistry—Proteins; Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2003; pp. 387–419.
- 94. Acharya, K.R.; Stuart, D.I.; Walker, N.P.C.; Lewis, M.; Phillips, D.C. Refined structure of baboon α-lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with C-type lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 99–127. [CrossRef]
- 95. Delavari, B.; Saboury, A.A.; Atri, M.S.; Ghasemi, A.; Bigdeli, B.; Khammari, A.; Maghami, P.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Haertlé, T.; Goliaei, B. Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocoll.* **2015**, *45*, 124–131. [CrossRef]
- 96. Pike, A.C.W.; Brew, K.; Acharya, K.R. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure* **1996**, *4*, 691–703. [CrossRef]
- 97. Chrysina, E.D.; Brew, K.; Acharya, K.R. Crystal structures of Apo- and holo-bovine α-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 37021–37029. [CrossRef]
- 98. Boggione Santos, I.J.; Hernandez Hernandez, H.L.; Cardoso Costa, M.H.; de Queiroz Lafetá, J.A.; dos Reis Coimbra, J.S. Conjugates of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and lysozyme with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 492–498. [CrossRef]
- Wilde, S.C.; Treitz, C.; Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Tholey, A.; Rawel, H.M.; Schwarz, K. β-Lactoglobulin as nanotransporter—Part II: Characterization of the covalent protein modification by allicin and diallyl disulfide. *Food Chem.* 2016, 197, 1022–1029. [CrossRef]
- 100. Wu, X.; Dey, R.; Wu, H.; Liu, Z.; He, Q.; Zeng, X. Studies on the interaction of -epigallocatechin-3-gallate from green tea with bovine β-lactoglobulin by spectroscopic methods and docking. *Int. J. Dairy Technol.* **2013**, *66*, 7–13. [CrossRef]
- Wu, X.; Liu, M.; Xia, L.; Wu, H.; Liu, Z.; Xu, X. Conjugation of functional oligosaccharides reduced in vitro allergenicity of β-lactoglobulin. *Food Agric. Immunol.* 2013, 24, 379–391. [CrossRef]
- 102. Das, A.; Thakur, R.; Dagar, A.; Chakraborty, A. A spectroscopic investigation and molecular docking study on the interaction of hen egg white lysozyme with liposomes of saturated and unsaturated phosphocholines probed by an anticancer drug ellipticine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, *16*, 5368–5381. [CrossRef] [PubMed]
- 103. Schwenke, K.D.; Knopfe, C.; Seifert, A.; Görnitz, E.; Zirwer, D. Acetylation of faba bean legumin: Conformational changes and aggregation. *J. Sci. Food Agric.* 2001, *81*, 126–134. [CrossRef]
- Rawel, H.M.; Rohn, S.; Kroll, J. Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 2003, 32, 109–120. [CrossRef]
- Anand, U.; Jash, C.; Mukherjee, S. Protein unfolding and subsequent refolding: A spectroscopic investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, 20418–20426. [CrossRef]
- 106. Fang, Y.; Dalgleish, D.G. The conformation of α-lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. *Food Hydrocoll.* **1998**, 12, 121–126. [CrossRef]
- Kelly, S.; Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005, 1, 349–384. [CrossRef]
- Walters, J.; Milam, S.L.; Clark, A.C. Chapter 1 Practical Approaches to Protein Folding and Assembly. Spectroscopic Strategies in Thermodynamics and Kinetics; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2009; ISBN 9780123745965.
- 109. Semisotnov, G.V.; Rodionova, N.A.; Razgulyaev, O.I.; Uversky, V.N.; Gripas', A.F.; Gilmanshin, R.I. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **1991**, *31*, 119–128. [CrossRef]
- 110. Stryer, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 482–495. [CrossRef]
- 111. Gasymov, O.K.; Glasgow, B.J. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteom.* 2007, 1774, 403–411. [CrossRef]

- 112. Slavík, J. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *694*, 1–25. [CrossRef]
- 113. Tanford, C. The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and biological membranes. FEBS Lett. 1981, 124, 127. [CrossRef]
- 114. Singh, S.K.; Kishore, N. Elucidating the Binding Thermodynamics of 8-Anilino-1-Naphthalene Sulfonic Acid with the A-State of a-Lactalbumin: An Isothermal Titration Calorimetric Investigation. *Biopolymers* 2006, *83*, 205–212. [CrossRef] [PubMed]
- 115. Asthana, S.; Bhutia, S.K.; Sahoo, H.; Jha, S. Chaotropes trigger conformational rearrangements differently in Concanavalin A. J. *Chem. Sci.* **2017**, 129, 1267–1276. [CrossRef]
- 116. Li, T.; Wang, C.; Li, T.; Ma, L.; Sun, D.; Hou, J.; Jiang, Z. Surface hydrophobicity and functional properties of citric acid cross-linked whey protein isolate: The impact of pH and concentration of citric acid. *Molecules* **2018**, *23*, 2383. [CrossRef] [PubMed]
- 117. Lakkis, J.; Villota, R. Effect of acylation on substructural properties of proteins: A study using fluorescence and circular dichroism. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 553–560. [CrossRef]
- Kato, A.; Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 624, 13–20. [CrossRef]
- 119. Kroll, J.; Rawel, H.M.; Seidelmann, N. Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1580–1587. [CrossRef]
- 120. Rawel, H.M.; Kroll, J.; Hohl, U.C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung-Food* **2001**, *45*, 72–81. [CrossRef]
- 121. Goldburg, W.I. Dynamic light scattering. Am. J. Phys 1999, 67, 1152-1160. [CrossRef]
- 122. Lorber, B.; Fischer, F.; Bailly, M.; Roy, H.; Kern, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2012, 40, 372–382. [CrossRef]
- 123. Sandhu, R.; Singh, N.; Dhankhar, J.; Kama, G.; Sharma, R. Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications. *Nanotechnol. Biochem. Tech. Assess. Qual. Saf. Milk Milk Prod.* 2018, pp. 135–137. Available online: https://www.researchgate.net/publication/331022012 (accessed on 14 October 2021).
- 124. Harding, S.; Jumel, K. Analysis of Proteins. Curr. Protoc. Mol. Biol. 1998, 44, 1–14. [CrossRef]
- 125. Harding, S.E. Protein Hydrodynamics; Allen, G., Ed.; JAI Press Inc.: Greenwich, CT, USA, 1999; ISBN 9781559386722.
- 126. Kehoe, J.J.; Brodkorb, A. Interactions between sodium oleate and α-lactalbumin: The effect of temperature and concentration on complex formation. *Food Hydrocoll.* **2014**, *34*, 217–226. [CrossRef]
- 127. Kataoka, M.; Kuwajima, K.; Tokunaga, F.; Goto, Y. Structural characterization of the molten globule of α-lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 422–430. [CrossRef]
- 128. Abbasi, A.; Emam-Djomeh, Z.; Mousavi, M.A.E.; Davoodi, D. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. *Food Chem.* **2014**, *143*, 379–383. [CrossRef]
- Lin, F.Y.; Chen, W.Y.; Ruaan, R.C.; Huang, H.M. Microcalorimetric studies of interactions between protein and hydrophobic ligands in hydrophobic interaction chromatography: Effects of ligand chain length, density, and the amount of bound protein. *Prog. Biotechnol.* 2000, 16, 59–62. [CrossRef]
- Hoffmann, M.A.M.; Sala, G.; Olieman, C.; De Kruif, K.G. Molecular mass distributions of heat-induced β-lactoglobulin aggregates. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 2949–2957. [CrossRef]
- 131. Barth, H. Modern Methods of Particle Size Analysi; Wiley: New York, NY, USA, 1984.
- 132. Olsen, J.V.; Ong, S.E.; Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, 3, 608–614. [CrossRef]
- 133. Rawel, H.M.; Kroll, J.; Schröder, I. In vitro enzymatic digestion of benzyl- and phenylisothiocyanate-derivatized food proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5103–5109. [CrossRef]
- 134. Chevalier, F.; Chobert, J.; Molle, D.; Haertle, T. Maillard glycation of ß-lactoglobulin with several sugars: Comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait* **2001**, *81*, 651–666. [CrossRef]
- 135. Chevalier, F.; Chobert, J.M.; Dalgalarrondo, M.; Haertlé, T. Characterization of the Maillard reaction products of β-lactoglobulin glucosylated in mild conditions. *J. Food Biochem.* **2001**, *25*, 33–55. [CrossRef]
- Syka, J.E.P.; Coon, J.J.; Schroeder, M.J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 9528–9533. [CrossRef] [PubMed]
- 137. Bertran-Vicente, J.; Schümann, M.; Hackenberger, C.P.R.; Krause, E. Gas-phase rearrangement in lysine phosphorylated peptides during electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6990–6994. [CrossRef]
- 138. Hernández, M.J.M.; Domingo, E.B.; Camañas, R.M.V.; Alvarez-Coque, M.C.G. Evaluation of the proteolysis degree with the o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagent. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **1990**, *338*, 62–65. [CrossRef]
- 139. García Alvarez-Coque, M.C.; Medina Hernández, M.J.; Villanueva Camañas, R.M.; Mongay Fernández, C. Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 1–7. [CrossRef]
- 140. Hernández, M.J.M.; Camañas, R.M.V.; Cuenca, E.M.; Alvarez-Coque, M.C.G. Determination of the protein and free amino acid content in a sample using o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-CYSTEINE. *Analyst* **1990**, *115*, 1125–1128. [CrossRef]
- 141. Spellman, D.; McEvoy, E.; O'Cuinn, G.; FitzGerald, R.J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.* 2003, *13*, 447–453. [CrossRef]
- 142. Hernández, M.J.M.; Domingo, E.B.; Camañas, R.M.V.; Alvarez-Coque, M.C.G. Use of the o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-Cysteine the Evaluation of Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* **1991**, 74, 1779–1785. [CrossRef]

- 143. Goodno, C.C.; Swaisgood, H.E.; Catignani, G.L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* **1981**, *115*, 203–211. [CrossRef]
- 144. Roth, M. Fluorescence Reaction for Amino Acids. Anal. Chem. 1971, 43, 880–882. [CrossRef]
- 145. Interchim. In *OPA, Amine Detection Reagent;* Interchim: Montlucon, France, 2016; pp. 10–12. Available online: https://www.interchim.fr/ft/0/02727A.pdf (accessed on 14 October 2021).
- 146. Andrade, M.A.; Chacón, P.; Merelo, J.J.; Morán, F. Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng. Des. Sel.* **1993**, *6*, 383–390. [CrossRef] [PubMed]
- 147. Whitmore, L.; Wallace, B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 2004, *32*, 668–673. [CrossRef] [PubMed]
- 148. Takehara, K.; Yuki, K.; Shirasawa, M.; Yamasaki, S.; Yamada, S. Binding Properties of Hydrophobic Molecules to Human Serum Albumin Studied by Fluorescence Titration. *Anal. Sci.* 2009, *25*, 115–120. [CrossRef] [PubMed]
- 149. Lam, R.S.H.; Nickerson, M.T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 427–434. [CrossRef]
- Hoffman, R.E.; Shabtai, E.; Rabinovitz, M.; Iyer, S.V.; Müllen, K.; Rai, A.K.; Bayrd, E.; Scott, L.T. Self-diffusion measurements of polycyclic aromatic hydrocarbon alkali metal salts. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1998, 2, 1659–1664. [CrossRef]
- 151. Roberts, C.J. Non-Native Protein Aggregation Kinetics Christopher. Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 927–938. [CrossRef] [PubMed]
- 152. Rutherfurd, S.M.; Moughan, P.J. Digestible reactive lysine in selected milk-based products. J. Dairy Sci. 2005, 88, 40–48. [CrossRef]
- 153. Soto, C.; Sigurdsson, E.M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castaño, E.M.; Frangione, B. Solubility as funtion of proteins structure and solvent components. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822–826. [CrossRef] [PubMed]

7 Zusammenfassende Diskussion

Im nachfolgenden Kapitel werden die in den wissenschaftlichen Publikationen veröffentlichten Ergebnisse in einen Zusammenhang gebracht und abschließend und ergänzend diskutiert.

Allgemein können ungerichtete Reaktionen zwischen verschiedenen Lebensmittelinhaltsstoffen in komplexen Lebensmittelmatrices sowohl die molekulare Struktur als auch die Eigenschaften und Funktionen der Proteine beeinflussen. In Anbetracht dessen ist aus lebensmittelchemischer und -technologischer Sicht eine ausführliche Grundlagenforschung zur Aufklärung der Auswirkungen kovalenter Proteinmodifikationen auf die Proteinstruktur und -eigenschaften von besonderer Wichtigkeit [41,332–334].

Ziel dieser Arbeit war es, Wechselwirkungen, die beispielsweise in Kresse angereichertem Kräuterquark denkbar sind, nachzustellen und analytisch zu charakterisieren. Der Fokus lag auf der Untersuchung der kovalenten Bindung von Benzylisothiocyanat (BITC), einem bioaktiven Metaboliten aus Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.), an das Molkenprotein α -Lactalbumin (α -LA) hinsichtlich der Auswirkungen auf die molekulare Struktur und die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften des Proteins.

Zur besseren Veranschaulichung der nachfolgend diskutierten Ergebnisse ist in der Abbildung 10 die Aminosäuresequenz von bovinem α -LA dargestellt. Die potentiellen Reaktionsstellen im Proteinmolekül für BITC, also die Aminosäuren, die eine nukleophile Thiol- oder Aminogruppe in der Seitenkette enthalten, sind mit einem gelben Stern gekennzeichnet. Anhand der Abbildung 10 wird ersichtlich, dass die Aminosäuresequenz von α -LA insgesamt 21 potentielle Reaktionsstellen für BITC enthält, wovon 8 Thiolgruppen der Cysteinseitenketten (C) sind. Die restlichen 13 potentiellen Reaktionsstellen sind die Aminogruppen der 12 Lysinseitenketten (K) und eine der N-terminalen Glutaminsäure (E).

Da die Modifikationen von Aminogruppen mit BITC irreversible Thioharnstoffderivate liefern und weitgreifende Veränderungen der Proteinfunktionalitäten mit sich bringen können [41,335], kommt der Bestimmung der freien verfügbaren Aminogruppen eine entscheidende Bedeutung zu. Unter Einsatz von o-Phthaldialdehyd (OPA) wurden die frei zugänglichen Aminogruppen in unmodifiziertem und BITCmodifiziertem α -LA spektrophotometrisch quantifiziert und miteinander verglichen. Mit steigender Einsatzkonzentration von BITC konnte eine Abnahme der gemessenen Absorption festgestellt werden, was darauf zurückzuführen ist, dass infolge der sukzessiven BITC-Konjugation immer weniger freie Aminogruppen für die Reaktion mit OPA zur Verfügung stehen. Mit steigender Einsatzkonzentration von BITC zur Herstellung der Proteinderivate konnte ein abnehmender Trend der relativen mittleren Gehalte an freien Aminogruppen von 100 % auf 59 % dokumentiert werden, was auf die Bildung von irreversiblen Thioharnstoffderivaten und
somit auf einen steigenden Grad der BITC-Modifikation von α -LA zurückgeführt werden kann [32,41,109,336–338]. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen früherer Studien überein, die mit zunehmender Menge an gebundenen ITC an verschiedenen Proteinen, darunter Ovomucoid, Conalbumin, Ovalbumin, Myoglobin, Insulin, Rinderseifenalbumin, Lysozym und das Molkenprotein β -LG, eine Abnahme der frei verfügbaren Aminogruppen berichteten, was ebenfalls auf die Bildung von Thioharnstoffderivaten zurückgeführt wurde [21,25–30,41,330].



Abbildung 10. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von bovinem α -LA im Einbuchstabencode (entnommen von der UniProtKB-Datenbank (http://www.uniprot.org/; letzter Zugriff am 21. Oktober 2021); unter dem UniProt-Eintragsnamen LALBA_BOVIN und der Dateinummer P00711). Die vier Disulfidbrücken werden durch schwarz, durchgezogene Linie, die theoretischen Proteolysestellen von Trypsin durch orange, gestrichelte Linien und die potentiellen Bindungsstellen für BITC durch gelbe Sterne dargestellt. Die Aminosäuren, die am Aufbau von β -Faltblatt- bzw. α -Helixstrukturen beteiligt sind, werden als Vier- bzw. als Sechsecke gekennzeichnet. Die abgebildete Faltung des Proteins ist nicht realitätsgetreu. Angepasst in Anlehnung an [4,105,112,122,123,339].

Die Zirkulardichroismus- (CD-)Messungen im fernen UV-Bereich zeigten Veränderungen in der Sekundärstruktur von BITC-modifiziertem α -LA, die auf eine Entfaltung und Destabilisierung des Proteinmoleküls hindeuten. Mit steigendem Grad der BITC-Modifikation konnte in den CD-Spektren ein stetiger Intensitätsverlust sowohl des Maximums bei 190 nm als auch des Doppelminimums bei 208 und 230 nm beobachtet werden, was auf weniger dichte Strukturen hindeutet [340]. Allgemein gilt die Abnahme der Intensität zwischen 208 und 230 nm als ein Indiz für die Reduktion des α -helicalen Anteils in der Sekundärstruktur von Proteinen [341,342]. Vergleichbare destabilisierende Effekte auf die Proteinkonformation infolge von kovalenten Modifikationen wurden bereits in der Literatur beschrieben [334,340,341,343–346]. Die quantitative Bestimmung der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen bestätigte die BITC-induzierte strukturelle Änderung, denn mit zunehmendem Grad der BITC-Modifikation von α-LA konnte eine Abnahme des α -Helixanteils von 29 % auf 17 %, bei gleichzeitiger Zunahme des β -Faltblattanteils von 12 % auf 28 % festgestellt werden. Vergleichsweise wurden die Anteile der Regionen mit geringer struktureller Komplexität nur um kleine Beträge von maximal 3 % reduziert. Auch in den Arbeiten von Keppler et al. (2017) und Rade-Kukic et al. (2011) konnten infolge einer Konjugation von ausgewählten ITC an Molkenproteinisolaten und an β-LG strukturelle Veränderungen der Sekundärstruktur bzw. Auflockerung der Proteinfaltung festgestellt werden [17,41]. Es wurde angenommen, dass die BITC-induzierten Entfaltungs- und Denaturierungsprozesse die Veränderung der Sekundärstruktur von α-LA verursachen, was durch die verminderten elektrostatischen Anziehungen zwischen den entgegengesetzten geladenen Aminosäureketten infolge der BITC-Konjugation an die polaren Aminogruppen der Lysinseitenketten erklärt werden könnte [347].

Darüber hinaus wurde mit Hilfe der Fern-UV-CD-Spektroskopie in einem Temperaturbereich von 20 bis 80 °C die temperaturinduzierte Konformationsänderung von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA untersucht. Das unmodifizierte α-LA zeigte in Abhängigkeit der Temperatur signifikante Änderungen in der Sekundärstruktur, während mit zunehmendem Modifizierungsgrad die Unterschiede der molaren Elliptizitäten bzw. der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen in Abhängigkeit von der Temperatur immer kleiner wurden. Die BITC-Proteinderivate höherer Modifikationsstufen wiesen bereits bei geringen Temperaturen niedrigere Beträge der molaren Elliptizitäten auf, was auf eine geringere Faltungsstabilität zurückzuführen ist. Vergleichbare Beobachtungen konnten bei der α -LA-Kontrolle erst oberhalb einer Temperatur von 60 °C festgestellt werden. Es wurde angenommen, dass der Zustand der α-LA-Kontrolle bei hohen Temperaturen über 50 °C dem Zustand der Proteinderivate höherer Modifikationsstufen mit geringerer thermischer Energie entspricht. Das bedeutet, dass infolge der Temperaturerhöhung die Faltungsstabilität des nativen Proteins sukzessive abnimmt, während bei den Proteinderivaten infolge der BITC-Addition dieser instabile Zustand bereits bei niedrigeren Temperaturen beobachtet werden konnte.

Die Charakterisierung der Oberflächenhydrophobizität sowie die Kontrolle der Proteinkonformation von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α-LA erfolgte mittels Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure- (ANS-)Fluoreszenzspektroskopie [34,343,348]. Die Ergebnisse zeigten mit zunehmendem Modifikationsgrad ein Anstieg der ANS-Fluoreszenz und eine verstärkte Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen (Blauverschiebung) des Fluoreszenzmaximums. Die Zunahme der ANS-Fluoreszenz könnte durch die BITC-induzierte Änderung der Proteinkonformation, die bereits durch die CD-spektroskopischen Messungen bestätigt wurde, erklärt werden. Durch die sukzessive Umstrukturierung wurden vermutlich vermehrt hydrophobe Gruppen an der Proteinoberfläche freigelegt, die folglich verstärkt mit den ANS-Molekülen interagieren konnten und somit eine höhere ANS-Fluoreszenz erzeugten [17]. Aus diesen Erkenntnissen kann geschlussfolgert werden, dass mit zunehmendem Grad der BITC-Modifikation von α -LA eine Zunahme der Oberflächenhydrophobizität resultierte, was mit Ergebnissen früherer Untersuchungen übereinstimmt [17,27,41,349–352]. So wurde beispielsweise berichtet, dass eine Konjugation von Organoschwefelverbindungen wie AITC, Allicin und Diallyldisulfid an Molken- und Pflanzenproteinen eine Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität der Proteine zur Folge hatte. Auch hier wurde die strukturelle Veränderung der Proteinkonformation als Ursache für die Freilegung der hydrophoben Gruppen an die Proteinoberfläche genannt [17,27,41,349–352].

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnten Rückschüsse über den Einfluss der BITC-Modifikation auf die Größe und die Größenverteilung der zu untersuchenden Proteinproben getroffen werden. Das DLS-Histogramm der BITC-Proteinderivate wies im Vergleich zu dem des unmodifizierten α -LA eine höhere Anzahl an Signalen sowie größere Peakbreiten auf, was auf eine hohe Inhomogenität und Polydispersität der BITC-Proteinderivate hindeutet. Die Zunahme des hydrodynamischen Radius von BITC-modifiziertem α -LA von 1.8 nm auf ungefähr 89.4 nm, deutete auf das Vorhandensein großer Aggregate in den Proteinlösungen hin. Die durch die BITC-Konjugation an α-LA induzierte Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität kann zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen mehreren Proteinmolekülen führen und folglich die Zunahme des hydrodynamischen Radius und die Ausbildung großer Proteinaggregate verursachen [353,354]. Delavari et al. (2015) stellten infolge der Interaktion zwischen α -LA und Vitamin D3 eine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins fest, was als Ursache für die Zunahme der Oberflächenhydrophobizität und des hydrodynamischen Durchmessers von 3.6 nm auf 125 nm angenommen wurde [105]. Bei der Bewertung der resultierenden hydrodynamischen Radien ist zu berücksichtigen, dass der ermittelte intensitätsgewichtete hydrodynamsiche Radius stark von den größeren Molekülen im zu untersuchenden System dominiert wird [41,355]. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Intensität des Streulichts proportional zur sechsten Potenz zum Durchmesser verhält, kann das Streulicht einer kleinen Population großer Moleküle das Streulicht kleinerer Moleküle überlagern, was eine verzerrte Radiusverteilung zur Folge haben könnte [356].

Da die Eigenschaften und Funktionen eines Proteins maßgeblich von seiner dreidimensionalen Struktur bestimmt wird, ist es naheliegend, dass die BITC-induzierten strukturellen Veränderungen auch weitgreifende Folgen für dessen Eigenschaften und Funktionalität mit sich bringen könnten [41,69,70,335,357–359]. Um die Folgen kovalenter Proteinmodifikationen auf die dreidimensionale Struktur und der daraus resultierenden Konsequenzen für die Eigenschaften und Funktionalitäten der Proteine besser verstehen zu können, ist die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen der dreidimensionalen Struktur der Proteine und dessen Eigenschaften und Funktionen von besonderer Wichtigkeit.

Eine Reihe an Studien konnten bereits mehrfach zeigen, dass infolge kovalenter Proteinmodifikationen mit ITC die physikochemischen Eigenschaften von verschiedenen Proteinen verändert wurden. So wurde beispielsweise die Abnahme der frei verfügbaren Aminogruppen mit einer Abnahme der Löslichkeit und einer Zunahme der Oberflächenhydrophobizität in Zusammenhang gebracht [25–27,360]. Darüber hinaus konnten Rade-Kukic et al. (2011) feststellen, dass die Konjugation von AITC an β-LG zu einer Veränderungen der molekularen Struktur und zu einer Verbesserung von funktionellen Eigenschaften, wie beispielsweise das Emulgiervermögen und die Schaumbildung, führte [41]. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Proteine, darunter auch α -LA mit verschiedenen Polysacchariden modifiziert und charakterisiert. Die CD-spektroskopische Messungen im fernen UV-Bereich aller Proteinderivate zeigten eine Reduktion des α -helicalen Anteils im Vergleich zum nativen Protein [361]. Weiterhin ergaben die Untersuchungen hinsichtlich der Emulsions- und Schaumbildungsfähigkeit der Proteinderivate, dass die gebildeten Derivate im Vergleich zum reinen Protein eine höhere Schaumstabilität aufwiesen. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie. da die α-LA-Polysaccharid-Konjugate ein großes Potential für den Einsatz als neue Schaumbildner besitzen [361]. Wu et al. (2013) untersuchten den Einfluss der Konjugation von Oligosacchariden an β -LG auf die Immunreaktivität. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass die Reaktivität der Oliogosaccharid-Proteinkonjugate gegenüber den IgG- und IgE-Antikörpern im Vergleich zum nativen Protein reduziert wurde. Da die Proteinkonjugate jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Konformation ausgeübt haben, wurde angenommen, dass infolge der Konjugation die Abschirmung oder Maskierung der Epitope die Ursache für die Verringerung der Bindungsaffinität sei [362].

Obwohl bereits einige Studien über die Auswirkungen kovalenter Proteinmodifikation mit ITC auf die dreidimensionale Struktur der Proteine sowie die daraus resultierenden Folgen auf die Eigenschaften und Funktionalitäten der Proteine berichteten, gibt es bislang kaum Informationen über die Wechselwirkungen von ITC mit dem Molkenprotein α -LA. Vor allem sind die Folgen auf die biologischen Eigenschaften, wie die Verdaubarkeit und Antigenität, noch nicht umfassend geklärt.

Deshalb lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darauf, zu untersuchen, inwieweit die Konjugation von BITC an α -LA die biologischen Eigenschaften des Proteins, wie die Antigenität und die Verdaubarkeit, beeinflusst. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass die BITC-Konjugation an α -LA einen signifikanten Effekt auf die molekulare Struktur des Proteins bewirkte. Da die Sekundärund Tertiärstruktur eines Proteins mit der Konformation der Epitope zusammenhängen, ist es denkbar, dass infolge der BITC-induzierten strukturellen Veränderungen auch die Epitopstrukturen von α -LA und damit die antigenen Eigenschaften beeinflusst wurden [92,363–365]. Um die Antigenität der BITC-modifizierten und unmodifizierten Proteine sowie die Restantigenität der jeweiligen Proteinhydrolysate nach tryptischer Hydrolyse abzuschätzen und zu vergleichen, wurde eine kombinierte Strategie aus der HPTLC und der Immunfärbung (IF) angewandt. Die zu untersuchenden unmodifizierten und BITC-modifizierten α -LA-Derivate wurden chromatographisch getrennt und anschließend mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion direkt auf der Platte nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper dienen als hochspezifische Detektionswerkzeuge, durch die es möglich war, Aussagen über die Antigenität der Proteine bzw. über die Restanitgenität der tryptischen Peptide zu treffen. Bei der immunologischen Detektion führt eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Blaufärbung der Banden. Der primäre Antikörper, der an das Zielprotein gebunden ist, wird durch die Blaufärbung sichtbar gemacht, indem das Enzym (hier Meerrettichperoxidase, HRP), das an den sekundären Antikörper konjugiert ist, die Umwandlung von chromogenen Subtraten katalysiert. Die Anfertigung einer Zwillingsplatte, die nach chromatographischer Trennung mit dem protein-/peptidspezischen Farbstoff Fluorescamin eingefärbt wurde, ermöglichte ein Vergleich von antigenen und nicht-antigenen Proteinen bzw. Peptiden. Nachfolgend wird sich auf die Ergebnisse der immunologischen Färbung bezogen. Während das Bandenmuster der niedrigsten Modifizierungsstufe von α -LA noch eine hohe Ähnlichkeit zu dem der unbehandelten Kontrollprobe zeigte, wurden die Unterschiede im Bandenmuster mit steigender Einsatzkonzentration von BITC größer. Mit zunehmendem Grad der BITC-Modifizierung von α -LA ist eine stetige Reduktion der Blaufärbung der Banden, die dem Kontrollprotein zugeordnet werden können, zu beobachten. In den sehr hohen Modifikationsstufen konnten einzelne Banden nicht mehr nachgewiesen werden. Parallel dazu wurden bei höheren R_{\vdash} Werten neue, zusätzliche Banden mit höherer Intensität detektiert, die zum Teil verbreitert waren und somit zu einer Bandenüberlagerung führten. Weiterhin konnte die Bildung von Schlieren beobachtet werden. Wie bereits in den Ergebnissen zuvor beschrieben wurde, kann angenommen werden, dass unter Verwendung einer geringen BITC-Konzentration primär nur wenige leicht zugängliche Reaktionsstellen an der Oberfläche der nativen Proteinstruktur modifiziert wurden, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Proteinstruktur zu bewirken. Daher kann bei einem geringen Modifizierungsgrad davon ausgegangen werden, dass die Epitope unverändert

blieben, was die hohe Analogie des Bandenmusters im Vergleich zu dem der Kontrollprobe erklären könnte. Entsprechend kann die sukzessive BITC-induzierte Veränderung der Sekundärstruktur zunehmend einen Effekt auf die Epitopstrukturen bewirken, was mit zunehmenden Modifizierungsgrad größere Abweichungen im Bandenmuster erklären könnte.

Nach der enzymatischen Hydrolyse von unbehandeltem α -LA durch Trypsin zeigte der immunologische Nachweis drei blaue Banden, woraus geschlussfolgert werden konnte, dass von den insgesamt 14 theoretisch möglichen tryptischen Peptiden vermutlich nur drei Peptide immunologisch aktiv sind. Beim Vergleich der Bandenmuster der unmodifizierten und der BITC-modifizierten Proteinhydrolysate nach tryptischer Hydrolyse konnte mit zunehmendem Modifizierungsgrad von α -LA mit BITC eine Reduktion der Anzahl und der Intensität der Banden festgestellt werden, was auf eine verminderte Antigen-Antikörper-Reaktion und damit auf ein vermindertes antigenes Potential hindeutet. Es ist bei der angewendeten Methodik zu berücksichtigen, dass unter Umständen die chromatographische Trennung der Peptide nicht vollständig erfolgte und somit möglicherweise mehrere Peptide in einer Banden überlagern können [366].

Die molekulare Grundlage für ein verändertes antigenes Potential liegt in der Änderung von Epitopstrukturen. Beispielsweise kann es zur verbesserten Zugänglichkeit von zuvor verborgenen Epitopen, zur Bildung neuer Epitope oder zur Inaktivierung oder Zerstörung von Epitopen kommen [367–369]. In der Abbildung 11 wird der Einfluss einer Denaturierung infolge einer BITC-Konjugation an das Protein sowie der Einfluss einer enzymatischen Hydrolyse auf Sequenz- (Abbildung 11A), Konformations- (Abbildung 11B) und Neoepitope (Abbildung 11C) graphisch dargestellt.

Im nativen Proteinzustand können die auf der Oberfläche befindlichen Sequenzund Konformationsepitope von Antikörpern erkannt und gebunden werden (Abbildung 11A und B; oben: rote Kreise), während die im Inneren verborgenen Epitope zunächst nicht erkannt werden können (Abbildung 11C, graue Kreise). Da sequenzielle Epitope aus einer kontinuierlichen Aneinanderreihung von Aminosäuren bestehen, die infolge einer Denaturierung oder enzymatischen Hydrolyse nicht zwangsläufig verändert oder zerstört wird, können die linearen Epitope erhalten bleiben und von Antikörpern weiterhin erkannt werden (Abbildung 11A, unten: rote Kreise). Eine Zerstörung oder Inaktivierung von Sequenzepitopen kann beispielsweise durch eine Konjugation von BITC an eine Aminosäure erfolgen, die sich direkt in der Region oder in der Nähe eines Epitops befindet (Abbildung 11A, oben: rote Kreise mit grauem Stern). Durch die BITC-induzierte Maskierung oder Abschirmung des Epitops wird dieses blockiert, inaktiviert oder zerstört, was eine reduzierte Antigenität zur Folge haben kann (Abbildung 11A, unten: graue Kreise mit gelbem Stern). Die antigene Determinante wäre demzufolge nicht mehr für eine Antikörper-Bindung zugänglich [45]. Weiterhin können lineare Epitope durch das

enthalten einer proteolytische Spaltstelle im Epitop (Abbildung 11A, oben: orange gestrichelte Linie zwischen roten Kreisen) zerstört werden (Abbildung 11A, unten: graue Kreise).



Abbildung 11. Schematische Darstellung der Auswirkung einer Denaturierung und einer enzymatischen Hydrolyse auf die antigenen Determinanten von Sequenz- (A), Konformations- und (B) und Neoepitopen (C) [370].

Zusätzlich zur Abschirmung oder Maskierung der Epitope durch die kovalente Bindung von BITC könnte eine irreversible strukturelle Veränderung des Proteinmoleküls eine Antigen-Antikörper-Reaktion verhindern. Konformationsepitope weisen eine Struktur höherer Ordnung auf und sind diskontinuierlich aufgebaut. Das bedeutet, dass die relevanten Aminosäuren verstreut entlang der Primärstruktur der Proteine liegen und erst durch die dreidimensionale Faltung des Proteins konformationelle Epitope aufbauen (Abbildung 11B, oben: rote Kreise). Irreversible strukturelle Veränderungen eines Proteins durch BITC-induzierte Entfaltungs- und Denaturierungsprozesse oder eine enzymatische Hydrolyse können zur Zerstörung oder Inaktivierung von konformationellen (diskontinuierlichen) Epitopen und folglich zu einer reduzierten Antigenität führen (Abbildung 11B, unten: graue Kreise).

Weiterhin können Proteine antigene Determinanten im inneren des Proteins besitzen, die im nativen Zustand für den Antikörper nicht zugänglich sind (Abbildung 11C, oben: graue Kreise). Durch Entfaltungs- oder Denaturierungsprozesse infolge einer BITC-Konjugation oder enzymatischer Hydrolyse der Proteine können die zuvor verborgenen Epitope freigelegt oder neu gebildet werden (Abbildung 11C, unten: rote Kreise), wodurch die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt werden kann.

Zusammengefasst können irreversible Strukturveränderungen durch Entfaltungsund Denaturierungsprozesse von α -LA infolge der kovalenten Bindung von BITC dazu führen, dass Epitope entweder blockiert, zerstört, umgestaltet, besser zugänglich gemacht oder sogar neu gebildet werden, was sich wiederum auf die antigenen Eigenschaften des Proteins auswirken kann. Die Bildung von neugeformten Epitopen oder die verstärkte Freilegung von Epitopen, die ursprünglich im Inneren des Proteins verborgen waren, könnte die Detektion neuer, zusätzlicher blauer Banden erklären und auf eine erhöhte Antigenität des Proteins hindeuten [167]. Dem hingegen lässt sich die Abnahme der Anzahl und der Intensität der Banden dadurch erklären, dass die BITC-Modifikationen Epitope blockieren, inaktivieren oder zerstören, sodass sie nicht mehr von Antikörpern gebunden und erkannt werden können, was folglich zu einer reduzierten antigenen Aktivität der Proteine führt [37,45,89,102,371–377].

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Verdaubarkeit von unmodifiziertem und BITC-modifiziertem α -LA durch Trypsin zu untersuchen und die mit BITC modifizierten Aminosäuren zu identifizieren.

Hierfür wurden zunächst die zu untersuchenden unmodifizierten und BITC-modifizierten tryptischen Proteinhydrolysate mit Hilfe einer eindimensionalen (1D) und zweidimensionalen (2D) HPTLC getrennt und anschließend mit dem protein-/peptidspezifischen Farbstoff Fluorescamin sichtbar gemacht. Zur bildhaften Darstellung wurden in der Abbildung 10 in der Aminosäuresequenz des Proteins α -LA alle 13 theoretischen Schnittstellen des Enzyms Trypsin durch orange gestrichelte Linien hervorgehoben. Ohne Fehlschnittstellen würden bei einer tryptischen Hydrolyse 14 Peptide des Proteins α -LA entstehen.

Zu Beginn werden kurz anhand der erhaltenen Banden- und Spotmuster der Peptidgemische die Leistungen der 1D- und 2D-HPTLC miteinander verglichen. Während bei der 1D-HPTLC-Anlayse des unmodifizierten Proteinhydrolysats lediglich 11 Banden detektiert werden konnten, konnten mit Hilfe des zweidimensionalen HPTLC-Ansatzes 23 Spots identifiziert werden. Die geringere Anzahl an detektierten Banden in der eindimensionalen HPTLC ist vermutlich auf eine nicht vollständige Trennung der Peptide zurückzuführen, sodass eine Überlagerung von Banden angenommen wurde. Vergleichbare Beobachtungen wurden beim Vergleich der 1D- und 2D-HPTLC-Analyse der BITC-modifizierten Proteinhydrolysate gemacht. Es wurde geschlussfolgert, dass bei der 2D-HPTLC-Analyse der unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteinhydrolysate eine bessere Trennung der Peptidgemische und eine verbesserte chromatographische Auflösung erzielt werden konnte. Durch die Entwicklung bzw. Trennung der Peptidgemische in eine zweite Dimension mit zwei verschiedenen Laufmitteln unterschiedlicher pH-Werte könndissoziierten Gruppen der Peptide ten die und damit auch deren Retentionsverhalten verändert worden sein. Die deutlich höhere Zahl an detektierten Spots in der 2D-HPTLC übersteigt jedoch die theoretisch berechnete Anzahl der Peptide, die aus einer tryptischen Hydrolyse von α -LA hervorgehen sollten. Dies könnte zum Einen auf Fehlschnittstellen des Enzyms zurückgeführt werden, wodurch elongierte Peptide gebildet worden sein könnten [378,379]. Zum Anderen könnte die höhere Anzahl an detektierten Spots durch die Selbsthydrolyse von Trypsin verursacht worden sein, wodurch neue, zusätzliche Peptide hervorgehen könnten, die nicht auf die tryptische Hydrolyse von α -LA zurückzuführen sind [380,381]. Eine massenspektrometische Analyse der Peptidspots bzw. -banden direkt von der HPTLC-Platte könnte eindeutige Aussagen über die Identität der Peptide oder über mögliche Veränderungen der Peptide infolge der kovalenten Modifikation ermöglichen.

Grundsätzlich konnte sowohl mit der 1D- als auch mit der 2D-HPTLC-Analyse mit zunehmendem Modifikationsgrad von α-LA mit BITC ein stetig größer werdender Unterschied im Banden- bzw. Spotmuster der Peptidgemische dokumentiert werden. Beide chromatographische Trennmethoden zeigten bei einem niedrigen Modifizierungsgrad noch eine hohe Übereinstimmung der Banden- bzw. Spotmuster im Vergleich zu dem des unbehandelten Proteinhydrolysats. Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei einer geringen Menge an BITC nur wenige Proteinmodifikationen stattgefunden haben, die noch keinen signifikanten Einfluss auf das Protein und damit auf seine tryptische Verdaubarkeit sowie auf das chromatographische Retentionsverhalten haben. Dem hingegen wurden mit steigendem Modifikationsgrad von α-LA stetig größer werdende Unterscheide im Banden- bzw. Spotmuster der Peptidgemische der 1D- und 2D-HPTLC-Analyse beobachtet. Mit zunehmendem Grad der BITC-Modifikation von α-LA konnte eine sukzessive Abnahme der Anzahl und der Intensität der detektierten Banden bzw. Spots festgestellt werden. Der Intensitätsverlust war ab einer gewissen BITC-Konzentration so hoch, dass einige Spots und Banden nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Anhand der Abbildung 10 wird deutlich, dass die potentiellen Reaktionsstellen für BITC an den ε -Aminogruppen der Aminosäure Lysin (Abbildung 10, gelbe Sterne am Buchstanden K) der Trypsin-Spaltstellen (Abbildung 10, orange gestrichelte Linien) entsprechen. Eine BITC-Modifikation an Aminosäureresten in der Nähe von spaltbaren Stellen, könnten aufgrund sterischer und/oder elektrostatischer Hindernisse die proteolystische Spaltung durch Trypsin behindern [379]. Da Trypsin ausschließlich peptidische Bindungen C-terminal nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet [382], ist es naheliegend, dass infolge der steigenden Einsatzkonzentration von BITC die sukzessive Bindung von BITC an die ε -Aminogruppen der Lysinseitenketten von α -LA [25,26,29,30] irreversible Thioharnstoffderivate liefert, wodurch die enzymatische Hydrolyse durch Trypsin reduziert werden könnte [16,23,27,196,382]. Die Reduktion der Anzahl und der Intensität der Banden bzw. der Spots in der 1D- und 2D-HPTLC-Analyse könnte die Folge der sukzessiven Konjugation von BITC an α -LA und der daraus resultierenden Hemmung des proteolytischen Abbaus durch Trypsin sein. Somit könnte die BITC-induzierten Blockierung der tryptischen Hydrolyse die Bildung nativer, unmodifizierter Peptide verhindern, die folglich nicht mehr detektiert werden konnten. Diese Vermutung ist in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, die ebenfalls eine Hemmung der tryptischen Verdaubarkeit infolge der Konjugation von AITC an β -LG feststellten [16].

Neben dem Verschwinden von Spots, die den unmodifizierten, trpytischen Peptiden zugeordnet werden konnten, wurden bei der 2D-HPTLC-Analyse auch neue, zusätzliche Spots detektiert. Grundsätzlich konnten bei der zweidimensionalen Trennung der Peptidgemische mit zunehmendem Modifikationsgrad mehr Peptidspots sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension mit größeren Rr Werten nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass in der verwendeten Methode mit einem Normalphasensystem gearbeitet wurde, in dem unmodifizierte Peptide bzw. dessen polaren Aminosäurereste mit den Silanolresten der stationären Phase wechselwirken und entsprechend zurückgehalten werden [383]. Durch die sukzessive Addition des hydrophoben Liganden BITC an die freien polaren Aminogruppen des α-LA kann eine Änderung der Polarität und der Hydrophobizität der Peptide verursacht worden sein. Demnach lässt sich eine Erhöhung der Hydrophobizität von BITC-modifiziertem α -LA durch den Ladungsverlust aufgrund der Maskierung der freien polaren Aminogruppen und durch die gleichzeitige Einführung des hydrophoben Liganden BITC erklären [41,384]. In Folge dessen könnten die polaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase verhindert worden sein, wodurch ein abweichendes chromatographisches Retentionsverhalten der BITC-modifizierten Peptide im Vergleich zu den unmodifizierten Proteolyseprodukten resultiert [28]. Vergleichbare Erkenntnisse einer Zunahme der Hydrophobie infolge einer ITC-Konjugation an Myoglobin, Legumin, Bromelain, Papain, Eiweißproteine, β-LG und einem Plasmasprotein wurden bereits in der Literatur beschrieben [26–28,384].

Weiterhin könnten die Abweichungen im Peptidmuster mit zunehmendem Grad der BITC-Modifikation von α -LA in der 2D-HPTLC-Analyse auf die Bildung von elongierten BITC-modifizierten Peptiden zurückgeführt werden. Durch die BITCinduzierte Blockierung der Trypsin-Spaltstellen können elongierte Peptide aus der enzymatischen Hydrolyse hervorgehen, die aus einer größeren Anzahl an Aminosäuren bestehen und folglich veränderte physikalisch-chemische Eigenschaften sowie ein verändertes chromatographisches Retentionsverhalten aufweisen können.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der zu den Unterschieden im Spotmuster der Peptide in dem 2D-HPTLC-Ansatz beitragen kann, ist die Tatsache, dass die Reaktion zwischen BITC und dem Molkenprotein α -LA ungerichtet abläuft, sodass nach dem proteolytischen Abbau durch Trypsin komplexe Peptidmischungen resultieren können. Beispielsweise können Peptide entweder unmodifiziert bleiben oder einfach, doppelt, dreifach usw. modifiziert werden. Eine frühere Studie konnte ebenfalls bei der Reaktion zwischen AITC und β -LG eine Mischung von Peptiden beobachten [16].

Mit Hilfe der 2D-HPTLC-Analyse konnten Unterschiede im Spotmuster der unmodifizierten und der BITC-modifizierten Proteolyseprodukte von α -LA festgestellt werden, sodass erste Rückschlüsse auf die Änderungen der proteolytischen Verdaubarkeit durch Trypsin und der physikalisch-chemischen Eigenschaften gezogen werden konnten. Da es sich bei der 2D-HPTLC-Analyse lediglich um eine qualitative Studie zur Differenzierung von unmodifizierten und BITC-modifizierten Peptiden auf der Grundlage des Vergleichs der erhaltenen Chromatogramme handelt, sollte nachfolgend eine Identifizierung der BITC-modifizierten Peptide mit Hilfe der HPLC-ESI-MS/MS erfolgen.

Die massenspektrometrische Untersuchung dient der Identifizierung von komplexen Peptidgemischen anhand ihrer jeweiligen Molekülmassen [385]. Da die Amidbindung in Peptiden besonders labil und anfällig für Fragmentierungen ist, kann das Peptidrückgrat zwischen den verknüpften Aminosäuren gespalten werden. Aus der Fragmentierung der Peptidbindung resultieren N-terminale b-Ionenreihen und C-terminale y-Ionenreihen, die zu einer leiterartigen Darstellung der Primärsequenz im MS/MS-Spektrum führt [386,387]. Die massenspektrometrisch erzeugten Daten wurden anschließend mit theoretisch errechneten Massen der unmodifizierten und BITC-modifizierten Peptiden verglichen. Hierfür wurde mit Hilfe des PeptideMass-Tools auf www.expasy.org (Zugriff am 20. September 2021) die theoretisch erzeugten Peptide von α -LA bei einer Hydrolyse durch Trypsin berechnet sowie Informationen zu den Positionen in der Aminosäuresequenz und den jeweiligen Massen der Peptide erhalten. Durch die erhaltenen Fragmentionen-Spektren konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl unmodifizierte als auch BITC-modifizierte Peptide identifiziert werden.

Von den 14 errechneten tryptischen Peptiden konnten mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Analyse 10 Proteolyseprodukte des tryptischen Abbaus der nativen, unbehandelten α -LA-Kontrolle nachgewiesen werden, während in den BITC-modifizierten Proteinhydrolysaten nur 8 der unmodifizierten, tryptischen Peptide identifiziert werden konnten. Entsprechend der Abnahme der Banden- bzw. Spotintensitäten der 1D- und 2D-HPTLC-Analyse konnten auch bei der LC-ESI-MS/MS-Analyse mit zunehmendem Modifikationsgrad von α -LA eine Abnahme der Signalintensität der unmodifizierten Peptide festgestellt werden. Gleichzeitig wurde mit steigender Einsatzkonzentration von BITC eine stetige Zunahme der Intensitäten neuer Signale dokumentiert, die BITC-modifizierten Peptiden zugeordnet werden konnten. Mit zunehmendem Modifikationsgrad von α -LA konnten bei den vier synthetisierten Proteinderivaten 3, 4, 5 und 7 neue, zusätzliche Peptide, die einfach mit BITC derivatisiert wurden, detektiert werden. Beispielsweise wurden in allen Modifikationsstufen die N- und C-terminalen Sequenzen EQLTK und LDQWLCEK modifiziert und identifiziert, wohingegen die Peptide, in folgender Reihenfolge KILDK < ELKDLKD < ILDK < ELK, ALCSEKLDQWLCEK, erst mit steigenden BITC-Konzentrationen derivatisiert wurden (Tabelle 1). Somit konnte eine konzentrationsabhängige Modifikation von α -LA mit BITC festgestellt werden.

Tabelle 1. Zusammenfassung aller BITC-modifizierten Peptide nach tryptischer Hydrolyse im Vergleich zu den jeweiligen unmodifizierten Sequenzen mitsamt der dazugehören Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z) sowie der entsprechenden Retentionszeiten (RT) in Minuten (min) in Abhängigkeit der Modifikationsstufen: Kontrolle, Gering, Mittel, Hoch und Sehr hoch.

		RT in [min] der Modifikationsstufen:				
Peptidsequenz	m/z	Kon- trolle	Gering	Mittel	Hoch	Sehr hoch
EQLTK	618.35	10.7	10.9	11.2	11	11.2
EQLTK + BITC	767.56	-	29.7	29.8	30.5	30.3
ELK	389.24	4.5	4.5	4.6	4.5	4.6
ELK + BITC	538.45	-	-	-	-	29.3
ELKDLK + BITC	894.17	-	-	27.0	26.9	26.8
К	147.11	-	-	-	-	-
KILDK + BITC	765.61	-	23.4	23.3	23.2	23.3
ILDK	488.31	16.1	16.1	16.1	16.1	16.0
ILDK + BITC	637.52	-	-	-	32.5	32.7
ALCSEK	650.32	16.4	15.9	15.8	15.7	16.2
ALCSEKLDQWLCEK	1015 1					91.0
+ BITC	1815.1	-	-	-	-	31.8
LDQWLCEK	1034.50	20	21.2	23.5	24.5	23.2
LDQWLCEK + BITC	1183.71	-	34.1	33.8	34.4	33.4

Die massenspektrometrische Analyse mit vorangeschalteter chromatographischer Trennung ergab, dass als Folge der BITC-Modifikation die tryptische Verdaubarkeit von α -LA verringert wurde. So konnten mit zunehmendem Derivatisierungsgrad von α -LA nach dem proteolytischen Abbau durch Trypsin mehr verlängerte BITC-modifizierte Peptidsequenzen nachgewiesen werden, beispielsweise ELKDLK, KILDK, ALCSEKLDQWLCEK (Tabelle 1). Die Annahme, dass infolge der BITCinduzierten Hemmung des tryptischen Abbaus elongierte BITC-modifizierte Peptide entstehen und die Unterschiede im Spotmuster der 2D-HPTLC-Analyse dadurch verursacht werden könnten, konnte somit bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen früherer Studien überein, die infolge der ITC-Konjugation ebenfalls eine Hemmung des tryptischen Abbaus von β -LG, Eiweißproteinen, Myoglobin, Legumin und glykosylierten Proteinen feststellten [16,360,388,389].

Darüber hinaus ließen die resultierenden Unterschiede im Spotmuster der 2D-HPTLC-Analyse von unmodifizierten und BITC-modifizierten Proteolyseprodukten bereits Grund zur Annahme, dass infolge der ungerichteten Reaktion zwischen BITC und dem Molkenprotein α -LA komplexe Peptidmischungen resultieren könnten. Auch diese Annahme konnte mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse belegt werden. Der Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass nach der tryptischen Hydrolyse der BITC-modifizierten Proteinderivate sowohl unmodifizierte als auch BITC-modifizierte Peptide entstanden sind.

Weiterhin kann der Tabelle 1 entnommen werden, dass die BITC-modifizierten Peptide im Vergleich zum jeweiligen unmodifizierten Peptid zu späteren Retentionszeiten eluieren. Beispielsweise betrug die Retentionszeit des unmodifizierten Peptids ILDK circa 16 min, während das entsprechende BITC-modifizierte Peptid erst nach 32 min eluierte. Entsprechende Beobachtungen wurden auch bei den anderen Peptiden gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine RP-HPLC durchgeführt, sodass die zu untersuchenden Peptide nach ihrer Polarität bzw. Hydrophobizität getrennt wurden. Bei einer RP-HPLC werden die Kieselgelpartikel mit Alkylketten chemisch modifiziert, wodurch die stationäre Phase einen apolaren bzw. hydrophoben Charakter erhält. Apolare bzw. hydrophobe Analyten wechselwirken stärker mit der stationären Phase und werden somit stärker retardiert, während polare Analyten schneller eluieren. Anhand der Retentionszeiten konnten somit Informationen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der BITC-modifizierten Proteolyseprodukte gewonnen werden. Die höhere Retentionszeit der BITCmodifizierten Peptide deutet auf eine geringere Polarität des Peptids hin, was sich mit den Erkenntnissen der 2D-HPTLC-Analyse deckt. Eine verminderte Polarität infolge der Addition des hydrophoben Liganden BITC an die freien polaren Aminogruppen der Lysinseitenketten kann mit einer Zunahme der Hydrophobizität gleichgesetzt werden, was mit den ANS-Ergebnissen der BITC-Proteinderivate übereinstimmt. Vergleichbare Erkenntnisse wurden in früheren Arbeiten dokumentiert, die ebenfalls die Zunahme der Retentionszeit mit einer Zunahme der Hydrophobizität als Folge der Modifikation von β -LG mit Allicin und Diallyldisulfid in Verbindung gebracht haben [36,352].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte anhand der y- und b-Fragmentionreihen der MS/MS-Spektren bei zwei modifizierten Peptidsequenzen (ELKDLK und KILDK) der genaue Reaktionsort in der Aminosäuresequenz von BITC identifiziert werden. Da die kovalente Bindung von BITC zu einer Massenänderung des Peptids führte, konnte die modifizierte Aminosäure durch entsprechende abweichende Massen der y- und b-Fragmentionen identifiziert werden. Die Massenunterschiede der y- und b-Fragmentionen des modifizierten Peptids ELKDLK zeigten, dass die BITC-Bindung am zentralen Lysin der Peptidsequenz stattfand, während die BITC-Modifikation in der Peptidsequenz KILDK am ersten Lysin erfolgte. Schließlich kann geschlussfolgert werden, dass zwei BITC-Modifikationen an den ε -Aminogruppen der Lysinseitenketten an den Position K32 und K113 in der Aminosäuresequenz von α -LA nachgewiesen werden konnten.

8 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die kovalente Bindung des bioaktiven Metaboliten Benzylisothiocyanat (BITC) an α -Lactalbumin (α -LA) und der Einfluss auf die Proteinstruktur und -eigenschaften untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die kovalente BITC-Bindung an die Aminogruppen des Molkenproteins zur Ausbildung von Thioharnstoffderivaten führte und mit einer Änderung der Proteinstruktur einherging. Infolge der BITC-Konjugation konnte eine Zunahme der Oberflächenhydrophobizität und des hydrodynamischen Radius sowie eine Abnahme der Polarität und der Wasserlöslichkeit festgestellt werden. Weiterhin wurde die Verdaubarkeit durch Trypsin signifikant beeinträchtigt und die antigenen Eigenschaften des Proteins und seiner proteolytischen Peptide verändert.

Vielzählige Studien untersuchten die kovalente ITC-Konjugation an verschiedenen Modellproteinen, die vergleichbare Erkenntnisse lieferten. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Proteinmodifikationen mit ITC Folgen auf die funktionellen Eigenschaften, wie Löslichkeit, Hydrophobizität, Viskosität, Gelierung, Schaumbildung und Emulgiervermögen, sowie auf die tryptische Abbaubarkeit hatten [16,17,25–27,29,41,46,360].

Es ist naheliegend, dass auch die BITC-induzierten Veränderungen der Proteinkonformation sowie der Oberflächenhydrophobizität, der Löslichkeit und der Polarität als Folge der Aminogruppenmodifikation zu weitreichenden Änderungen der Funktionalität des Molkenproteins α -LA führen können. Weiterführende Untersuchungen müssen jedoch erst noch durchgeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen. Vor allem wegen der hohen ernährungsphysiologischen Qualität und außergewöhnlichen funktionellen Eigenschaften von α -LA, die das Molkenprotein zu einer wertvollen Lebensmittelzutat machen [41,47,48,50], ist sicherzustellen, dass eine kovalente Bindung von BITC an das Molkenprotein keine unerwünschten Folgen für die Eigenschaften und Funktionalitäten mit sich bringt.

Allgemein gilt die kovalente Proteinmodifikation als eine vielversprechende Methode, die Proteineigenschaften gezielt zu verbessern oder zu verändern. Auch in Anbetracht dessen, dass das Molkenprotein α -LA zu einem der wichtigsten Hauptallergene in der Kuhmilch gehört, wird der Ansatz durch die kovalente Proteinmodifikation eine Optimierung der Proteineigenschaften zu erzielen, zunehmend relevanter [50,58,154–158]. Durch die gezielte Modifikation von Lebensmittelproteinen könnte die allergene Aktivität der Proteine gesteuert oder reduziert werden, was das Gesundheitsproblem der Lebensmittelallergie lösen könnte.

Um erwünschte und unerwünschte Folgen kovalenter Proteinmodifikationen auf die Proteinstruktur und -eigenschaften besser zu verstehen, ist die Grundlagenforschung an Modellproteinen und -lebensmittel unerlässlich. Ferner ist das wachsende Bewusstsein der Menschen für eine gesunde und ausgewogene Ernährung und das daraus resultierende Interesse an der Kenntnis über die Qualität und Herkunft der Lebensmittelinhaltstoffe Grund für die zunehmende Wichtigkeit der Untersuchung der Reaktivität der Lebensmittelinhaltsstoffe sowie der potentiellen Auswirkungen irreversibler Interaktionen auf die funktionellen, nutritiven und biologischen Eigenschaften der Inhaltsstoffe [390]. Die Kenntnis der Folgen von kovalenten Proteinmodifikationen auf die Proteinfunktionalitäten und -eigenschaften in Lebensmitteln ist aus lebensmittelchemischer und -technologischer Sicht von großer Relevanz [361].

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen der BITC-Bindung auf die molekulare Struktur und die funktionellen, biologischen und nutritiven Eigenschaften des Molkenproteins α-LA leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Konsequenzen kovalenter Proteinmodifikationen. Weitere grundlegende Untersuchungen sind notwendig, um zukünftig die Folgen besser abschätzen, vermeiden oder bestenfalls sogar steuern zu können. Allerdings garantieren die gewonnen Ergebnisse dieser Arbeit anhand der gewählten Modellsubstanzen keine direkte Übertragbarkeit auf reelle Lebensmittel, die be- und verarbeitenden Prozessen unterworfen werden. Sowohl die Adduktbildung als auch die angewendeten analytischen Methoden sind von vorherrschenden Bedingungen, wie dem pH-Wert, der Temperatur und den Matrixeffekten des jeweiligen Nahrungsmittels, abhängig, sodass die Untersuchungen und analytischen Methoden auf reelle Lebensmittel zu übertragen und zu evaluieren sind.

9 Literaturverzeichnis

- 1. Mazhangara, I.R.; Chivandi, E.; Mupangwa, J.F.; Muchenje, V. The potential of goat meat in the red meat industry. *Sustain.* **2019**, *11*, 1–12, doi:10.3390/su11133671.
- Shori, A.B.; Baba, A.S.; Muniandy, P. Potential Health-Promoting Effects of Probiotics in Dairy Beverages; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128166871.
- Siró, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B.; Lugasi, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 2008, 51, 456–467, doi:10.1016/j.appet.2008.05.060.
- Jakopović, K.L.; Barukčić, I.; Božanić, R. Physiological significance, structure and isolation of α-lactalbumin. *Mljekarstvo* 2016, 66, 3–11, doi:10.15567/mljekarstvo.2016.0101.
- Menrad, K., K. Market and marketing of functional food in Europe. J. Food Eng. 2003, 56, 181–188.
- 6. Peters, S. The food matrix: food is more than the sum of its nutrients. *Voeding Mag.* **2017**, *2017*, 1–4.
- IDF; Faktencheck Die Bedeutung der Milch-Matrix zur Bewertung der Qualität und gesundheitlicher Auswirkungen von Milchprodukten als Lebensmittel. 2019, 2–3.
- Thorning, T.K.; Bertram, H.C.; Bonjour, J.P.; De Groot, L.; Dupont, D.; Feeney, E.; Ipsen, R.; Lecerf, J.M.; Mackie, A.; McKinley, M.C.; u. a. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: Current evidence and knowledge gaps. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017, 105, 1033–1045, doi:10.3945/ajcn.116.151548.
- Sønderby, I.E.; Geu-Flores, F.; Halkier, B.A. Biosynthesis of glucosinolates
 gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 2010, 15, 283–290, doi:10.1016/j.tplants.2010.02.005.
- Fernando, R.C.; Weiß-Schmidt, P. Sekundäre Pflanzenstoffe: Bioaktive Substanzen aus Obst und Gemüse in der Krebsprävention. *EHK* 2007, 192– 197.
- Sofrata, A.; Santangelo, E.M.; Azeem, M.; Borg-Karlson, A.K.; Gustafsson, A.; Pütsep, K. Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of Salvadora persica is highly active against gram-negative bacteria. *PLoS One* 2011, 6, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0023045.
- Guzmán-Pérez, V.; Bumke-Vogt, C.; Schreiner, M.; Mewis, I.; Borchert, A.; Pfeiffer, A.F.H. Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from Tropaeolum majus reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells. *PLoS One* 2016, 11, 1–27, doi:10.1371/journal.pone.0162397.
- 13. Herr, I.; Büchler, M. Glucosinolate der kreuzblütlerfamilie in prävention und therapie maligner tumore. *Dtsch. Zeitschrift fur Onkol.* 2009, *41*, 109–114,

doi:10.1055/s-0029-1213578.

- Haller, D.; Grune, T.; Rimbach, G. Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe; Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg, 2013; ISBN 9783642293733.
- Kühn, C.; von Oesen, T.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of isothiocyanate-protein conjugates in milk and curd after adding garden cress (Lepidium sativum L.). *Food Res. Int.* 2018, 108, 621–627, doi:10.1016/j.foodres.2018.04.001.
- Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Tholey, A.; Schwarz, K. Interaction of β-lactoglobulin with small hydrophobic ligands - Influence of covalent AITC modification on β-LG tryptic cleavage. *Food Biophys.* 2014, 9, 349– 358, doi:10.1007/s11483-014-9361-4.
- Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Berton-Carabin, C.; Nipoti, E.; Coenye, T.; Schwarz, K. Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 1 physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7. *Food Hydrocoll.* 2017, 65, 130–143, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.11.016.
- Kühn, C.; Von Oesen, T.; Herz, C.; Schreiner, M.; Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Rohn, S. In Vitro Determination of Protein Conjugates in Human Cells by LC-ESI-MS/MS after Benzyl Isothiocyanate Exposure. *J. Agric. Food Chem.* 2018, *66*, 6727–6733, doi:10.1021/acs.jafc.8b01309.
- Beevi, S.S.; Mangamoori, L.N.; Dhand, V.; Ramakrishna, D.S. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from Raphanus sativus L. *Foodborne Pathog. Dis.* 2009, *6*, 129–136, doi:10.1089/fpd.2008.0166.
- Lee, Y.M.; Seon, M.R.; Cho, H.J.; Kim, J.S.; Park, J.H.Y. Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. J. Mol. Med. 2009, 87, 1251–1261, doi:10.1007/s00109-009-0532-6.
- Kawakishi, S.; Kaneko, T. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate.
 J. Agric. Food Chem. 1987, 35, 85–88, doi:10.1021/jf00073a020.
- Cejpek, K.; Valusek, J.; Velisek, J. Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3560–3565, doi:10.1021/jf991019s.
- Hanschen, F.S.; Brüggemann, N.; Brodehl, A.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L.W. Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 7735–7745, doi:10.1021/jf301718g.
- 24. Krell, M.; Cvancar, L.; Poloczek, M.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of Isothiocyanate-Protein Conjugates in a Vegetable-

Enriched Bread. Foods 2021, 10, 1300, doi:10.3390/foods10061300.

- Kroll, J.; Rawel, H.; Kröck, R.; Proll, J.; Schnaak, W. Interactions of isothiocyanates with egg white proteins. *Food / Nahrung* 1994, 38, 53–60, doi:10.1002/food.19940380110.
- Rawel, H.M.; Kroll, J. Some aspects of reactions of benzyl isothiocyanate with bovine sarcoplasmic proteins. *Food / Nahrung* 1995, *39*, 465–474, doi:10.1002/food.19950390511.
- Rawel, H.M.; Kroll, J.; Schröder, I. Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation. *Nahrung -Food* 1998, 42, 197–199, doi:10.1002/(sici)1521-3803(199808)42:03/04<197::aid-food197>3.0.co;2-b.
- Rawel, H.; Kroll, J.; Haebel, S.; Peter, M. Reactions of a glucosinolate breakdown product (benzyl isothiocyanate) with myoglobin. *Phytochemistry* 1998, 48, 1305–1311.
- Kroll, J.; Noack, J.; Rawel, H.; Kroeck, R.; Proll, J. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with egg-white protein fractions. *J. Sci. Food Agric.* 1994, 65, 337–345, doi:10.1002/jsfa.2740650312.
- Kroll, J.; Rawel, H. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with myoglobin. J. Sci. Food Agric. 1996, 72, 376–384, doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199611)72:3<376::AID-JSFA670>3.0.CO;2-Y.
- Karefyllakis, D.; Salakou, S.; Bitter, J.H.; van der Goot, A.J.; Nikiforidis, C.
 V. Covalent Bonding of Chlorogenic Acid Induces Structural Modifications on Sunflower Proteins. *ChemPhysChem* 2018, 19, 459–468, doi:10.1002/cphc.201701054.
- Keppler, J.K.; Schwarz, K.; van der Goot, A.J. Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 101, 38–49, doi:10.1016/j.tifs.2020.04.023.
- Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* 2013, 51, 954–970, doi:10.1016/j.foodres.2013.02.009.
- KROLL, J.; RAWEL, H.M.; ROHN, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* 2003, *9*, 205–218, doi:10.3136/fstr.9.205.
- Quan, T.H.; Benjakul, S.; Sae-leaw, T.; Balange, A.K.; Maqsood, S. Protein– polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, *91*, 507–517, doi:10.1016/j.tifs.2019.07.049.
- Wilde, S.C.; Keppler, J.K.; Palani, K.; Schwarz, K. β-Lactoglobulin as nanotransporter - Part I: Binding of organosulfur compounds. *Food Chem.* 2016, 197, 1015–1021, doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.010.

- Prigent, S.; Vorage, A.; Visser, A.; van Koningsveld, G.; Gruppen, H. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). J. Sci. Food Agric. 2007, 1243, 1237– 1243, doi:10.1002/jsfa.
- Selinheimo, E.; Lampila, P.; Mattinen, M.L.; Buchert, J. Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3118–3128, doi:10.1021/jf0730791.
- Zhang, Y.; Talalay, P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 1994, 54, 1976–1981.
- Hernández-Triana, M.; Kroll, J.; Proll, J.; Noack, J.; Petzke, K.J. Benzylisothiocyanate (BITC) decreases quality of egg white proteins in rats. J. Nutr. Biochem. 1996, 7, 322–326, doi:10.1016/0955-2863(96)00033-2.
- Rade-Kukic, K.; Schmitt, C.; Rawel, H.M. Formation of conjugates between β-lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* 2011, 25, 694–706, doi:10.1016/j.foodhyd.2010.08.018.
- Keppler, J.K.; Martin, D.; Garamus, V.M.; Schwarz, K. Differences in binding behavior of (-)-epigallocatechin gallate to β-lactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). J. Mol. Recognit. 2015, 28, 656–666, doi:10.1002/jmr.2480.
- 43. Keppler, J.K.; Steffen-Heins, A.; Berton-Carabin, C.C.; Ropers, M.H.; Schwarz, K. Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 2: Influence of the protein modification on the surface activity in an O/W system. *Food Hydrocoll.* 2018, *81*, 286–299, doi:10.1016/j.foodhyd.2018.03.003.
- Keppler, J.K.; Heyse, A.; Scheidler, E.; Uttinger, M.J.; Fitzner, L.; Jandt, U.; Heyn, T.R.; Lautenbach, V.; Loch, J.I.; Lohr, J.; u. a. Towards recombinantly produced milk proteins: Physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein beta-lactoglobulin variants. *Food Hydrocoll.* 2021, 110, doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106132.
- 45. Wu, X.; Lu, Y.; Xu, H.; Lin, D.; He, Z.; Wu, H.; Liu, L.; Wang, Z. Reducing the allergenic capacity of β-lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chem.* **2018**, *256*, 427–434, doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.158.
- Keppler, J.K.; Schwarz, K. Increasing the emulsifying capacity of whey proteins at acidic pH values through covalent modification with allyl isothiocyanate. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2017, 522, 514– 524, doi:10.1016/j.colsurfa.2017.03.033.
- Smithers, G.W.; Ballard, F.J.; Copeland, A.D.; De Silva, K.J.; Dionysius,
 D.A.; Francis, G.L.; Goddard, C.; Grieve, P.A.; Mcintosh, G.H.; Mitchell,
 I.R.; u. a. New Opportunities from the isolation and utilization of whey

proteins. J. Dairy Sci. **1996**, 79, 1454–1459, doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76504-9.

- Kinsella, J.E. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. CR
 C Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1984, 21, 197–262, doi:10.1080/10408398409527401.
- Smithers, G.W. Whey and whey proteins-From "gutter-to-gold". Int. Dairy J. 2008, 18, 695–704, doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.008.
- Stanciuc, N.; Rapeanu, G. An overview of bovine a-lactalbumin structure and functionality. Ann. Univ. Dunarea Jos Galati -Fascicle VI – Food Technol. 2010, 34, 82–93.
- Salehi, F. Quality, physicochemical, and textural properties of dairy products containing fruits and vegetables: A review. *Food Sci. Nutr.* 2021, 9, 4666–4686, doi:10.1002/fsn3.2430.
- Hunt, J.A.; Dalgleish, D.G. Effect of pH on the Stability and Surface Composition of Emulsions Made with Whey Protein Isolate. J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 2131–2135, doi:10.1021/jf00046a011.
- Matsudomi, N.; Oshit, T.; Kobayashi, K.; Kinsella, J. a-Lactalbumin Enhances the Gelation Properties of a Bovine Serum Albumin. J. Agrlc. Food Chem 1993, 41, 1053–1057.
- 54. Zhai, J.; Hoffmann, S. V.; Day, L.; Lee, T.H.; Augustin, M.A.; Aguilar, M.I.; Wooster, T.J. Conformational changes of α-lactalbumin adsorbed at oilwater interfaces: Interplay between protein structure and emulsion stability. *Langmuir* 2012, 28, 2357–2367, doi:10.1021/la203281c.
- Ibanoğlu, E.; Karataş, Ş. High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate. J. Food Eng. 2001, 47, 31–36, doi:10.1016/S0260-8774(00)00096-0.
- 56. Deeth, H.; Bansal, N. *Whey proteins*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9780128121245.
- Smithers, G.W. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. Int. Dairy J. 2008, 18, 695–704, doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.008.
- Villa, C.; Costa, J.; Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I. Bovine milk allergens: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018, 17, 137–164, doi:10.1111/1541-4337.12318.
- Belitz, W; Grosch, W; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. AUflage.; Springer Verlag, 2008; ISBN 9783540732013.
- Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. Lebensmittelanalytik, 2014; Bd. fünfte, vo; ISBN 978-3-642-34828-0.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Stryer Biochemie, 2013; ISBN 9783827429889.
- Baltes, W.; Matissek, R. *Lebensmittelchemie*; Springer-Verlag: Dordrecht London New York, 2011; ISBN 9783642165382.

- Gey, M.. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik; 2. Aufl.; Springer Spektrum, 2008; ISBN 9783540738039.
- Westphal, G.; Gerber, G.; Lipke, B. Proteine nutritive und funktionelle Eigenschaften; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2003; ISBN 9783642624346.
- Li-Chan, E.C.Y.; Lacroix, I.M.E. Properties of proteins in food systems: An introduction; Second Edi.; Elsevier Ltd., 2018; ISBN 9780081007297.
- Weber, P.; Steinhart, H.; Paschke, A. Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 3127–3133, doi:10.1021/jf063436s.
- Tschiersch, C.; Nikfardjam, M.P.; Schmidt, O.; Schwack, W. Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and its influence on polyphenol removal from red wine. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 65–74, doi:10.1007/s00217-010-1253-3.
- Haque, M.A.; Timilsena, Y.P.; Adhikari, B. Food Proteins, Structure, and Function; Elsevier, 2016; ISBN 9780081005965.
- Kelly, S.M.; Price, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997, 1338, 161–185, doi:10.1016/S0167-4838(96)00190-2.
- Venyaminov, S.Y.; Yang, J.T. Determination of Protein Secondary Structure. *Circ. Dichroism Conform. Anal. Biomol.* 1996, 69–107, doi:10.1007/978-1-4757-2508-7_3.
- 71. Moleqular GmbH 4. Verlust der Proteostase | MoleQlar Magazin Verfügbar unter: https://www.moleqlar.de/4-verlust-der-proteostase/ (zugegriffen 1 Juli 2021).
- 72. Høst, A.; Halken, S.; Jacobsen, H.P.; Christensen, A.E.; Herskind, A.M.; Plesner, K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr. Allergy Immunol. Suppl.* 2002, 13, 23– 28, doi:10.1034/j.1399-3038.13.s.15.7.x.
- Ilinskaya, A.N.; Dobrovolskaia, M.A. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016, 299, 70–77, doi:10.1016/j.taap.2016.01.005.
- Crespo, J.F.; Pascual, C.; Burks, A.W.; Helm, R.M.; Esteban, M.M. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1995, 6, 39–43, doi:10.1111/j.1399-3038.1995.tb00256.x.
- 75. Høst, A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy Some clinicala, epidemiological and immunological aspects; 1994; Bd. 5; ISBN 8716151259.
- Monaci, L.; Tregoat, V.; van Hegel, A.J.; Anklam, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur Food Res Technol* 2006, 223, 149–179, doi:10.1007/s00217-005-0178-8.
- 77. Hayakawa, K.; Linko, Y.Y.; Linko, P. Mechanism and control of food allergy.

LWT - Food Sci. Technol. 1999, 32, 1-11, doi:10.1006/fstl.1998.0425.

- Syslová, K.; Rambousek, L.; Bubeníková-Valešová, V.; Šlamberová, R.; Novotný, P.; Kačer, P. Dopamine analysis in neuroscience research. Dopamine Funct. Regul. Heal. Eff. 2012, 81–111.
- Sanchez-Trincado, J.L.; Gomez-Perosanz, M.; Reche, P.A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. J. Immunol. Res. 2017, 2017, doi:10.1155/2017/2680160.
- Ahmed, A.; Saha, B.; Patwardhan, A.; Shivprasad, S.; Nandi, D. The major players in adaptive immunity: 1. Humoral immunity. *Resonance* 2009, 14, 455–471, doi:10.1007/s12045-009-0046-0.
- 81. Jerne, N. Immunological speculations. Annu. Rev. Microbiol. 1960, 341–358.
- Li, X.; Yuan, S.; Huang, M.; Gao, J.; Wu, Z.; Tong, P.; Yang, A.; Chen, H. Identification of IgE and IgG epitopes on native Bos d 4 allergen specific to allergic children. *Food Funct.* 2016, 7, 2996–3005, doi:10.1039/c6fo00416d.
- Gershoni, J.M.; Roitburd-Berman, A.; Siman-Tov, D.D.; Tarnovitski Freund, N.; Weiss, Y. Epitope Mapping. *BioDrugs* 2007, *21*, 145–156, doi:10.2165/00063030-200721030-00002.
- Willison, L.A.N.; Zhang, Q.; Su, M.; Teuber, S.S.; Sathe, S.K.; Roux, K.H. Conformational epitope mapping of Pru du 6, a major allergen from almond nut. *Mol. Immunol.* 2013, 55, 253–263, doi:10.1016/j.molimm.2013.02.004.
- Pomés, A. Relevant B cell epitopes in allergic disease. Int. Arch. Allergy Immunol. 2010, 152, 1–11, doi:10.1159/000260078.
- Sampson, H.A. Update on food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 2004, 113, 805–819, doi:10.1016/j.jaci.2004.03.014.
- Paschke, A. Proteine als Lebensmittelallergene. Nachrichten aus der Chemie 2008, 56, 1005–1009, doi:10.1002/nadc.200857950.
- Steinhart, H.; Paschke, A.; Zunker, K. Lebensmittelallergie eine individuelle Gefahr. *Biol. unserer ZEit* 2001, *31*, 398–407.
- Sathe, S.K.; Sharma, G.M. Effects of food processing on food allergensa. Mol. Nutr. Food Res. 2009, 53, 970–978, doi:10.1002/mnfr.200800194.
- Murch, S.H. Clinical manifestations of food allergy: The old and the new. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 17, 1287–1291, doi:10.1097/00042737-200512000-00004.
- Wal, J.M. Cow's milk allergens. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 1998, 53, 1013–1022, doi:10.1111/j.1398-9995.1998.tb03811.x.
- Maynard, F.; Jost, R.; Wal, J.M. Human IgE Binding capacity of tryptic peptides from bovine a-lactalbumin. Int Arch Allergy Immunol 1997, 113, 478–488.
- Wal, J.M. Bovine milk allergenicity. Ann. Allergy, Asthma Immunol. 2004, 93, 2–11, doi:10.1016/S1081-1206(10)61726-7.
- 94. Wal, J. Immunochemical and molecular characterization of milk allergens.

Allerdy 1998, 53, 114–117, doi:10.1201/9781420058574.ch6.

- Holzhauser, T.; Mergemeier, S.; Kuhn, M. Analytik und bedeutung versteckter allergene in verarbeiteten lebensmitteln. *Aktuel. Ernahrungsmed.* 2003, 28, 93–98, doi:10.1055/s-2003-37990.
- 96. Bischoff, S.; Manns, M. *Darmkrankheiten*; Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 1999;
- 97. Schäfer, T.; Böhler, E.; Ruhdorfer, S.; Weigl, L.; Wessner, D.; Heinrich, J.; Filipiak, B.; Wichmann, H.E.; Ring, J. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: Associations with other manifestations of atopy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 56, 1172–1179, doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00196.x.
- 98. Venter, C.; Pereira, B.; Grundy, J.; Clayton, C.B.; Roberts, G.; Higgins, B.; Dean, T. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. J. Allergy Clin. Immunol. 2006, 117, 1118–1124, doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1352.
- Ring, J.; Brockow, K.; Behrendt, H. Adverse Reactions to Food. J. Chromatogr. B 2001, 756, 3–10, doi:10.1016/B978-0-12-420226-9.00004-8.
- Lehrer, S.B.; Ayuso, R.; Reese, G. Current understanding of food. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002, 964, 69–85.
- Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food aallergy. J. Allergy Clin. Immunol. 2010, 125, S116–S125, doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028.
- 102. Verhoeckx, K.C.M.; Vissers, Y.M.; Baumert, J.L.; Faludi, R.; Feys, M.; Flanagan, S.; Herouet-Guicheney, C.; Holzhauser, T.; Shimojo, R.; van der Bolt, N.; u. a. Food processing and allergenicity. *Food Chem. Toxicol.* 2015, *80*, 223–240, doi:10.1016/j.fct.2015.03.005.
- Añíbarro, B.; Seoane, F.J.; Múgica, M. V. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2007, 17, 168– 172.
- Mulvihill, D.M.; Donovan, M. Whey proteins and their thermal denaturation
 A review. Source Irish J. Food Sci. Technol. 1987, 11, 43–75.
- Delavari, B.; Saboury, A.A.; Atri, M.S.; Ghasemi, A.; Bigdeli, B.; Khammari, A.; Maghami, P.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Haertlé, T.; Goliaei, B. Alphalactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocoll.* 2015, 45, 124–131, doi:10.1016/j.foodhyd.2014.10.017.
- 106. Hoffman, J.R.; Falvo, M.J. Protein Which is best? J. Sport. Sci. Med. 2004, 3, 118–130.
- S.F.; 107. Saint-Sauveur, D.; Gauthier, Boutin, Y.; Montoni, А. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest peptide fractions. Int. Dairy J. 18, 260-270,and 2008. doi:10.1016/j.idairyj.2007.07.008.
- 108. Lam, R.S.H.; Nickerson, M.T. The effect of pH and temperature pre-

treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food Chem.* **2015**, *173*, 163–170, doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.078.

- Farrell, H.M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G.T.; Brown, E.M.; Butler, J.E.; Creamer, L.K.; Hicks, C.L.; Hollar, C.M.; Ng-Kwai-Hang, K.F.; Swaisgood, H.E. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 2004, *87*, 1641–1674, doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6.
- 110. Kamau, S.M.; Cheison, S.C.; Chen, W.; Liu, X.M.; Lu, R.R. Alphalactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 197–212, doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00100.x.
- Brew, K.; Castellino, F.J.; Vanaman, T.C.; Hill, R.L. The complete amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 4570– 4582, doi:10.1016/s0021-9258(19)63827-5.
- Permyakov, E.A.; Berliner, L.J. α-lactalbumin: structure and function. FEBS Lett. 2000, 473, 269–274, doi:10.1016/S0014-5793(00)01546-5.
- 113. Bramaud, C.; Aimar, P.; Daufin, G. Thermal isoelectric precipitation of αlactalbumin from a whey protein concentrate: Influence of protein–calcium complexation. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 47, 121–130, doi:10.1002/bit.260470202.
- 114. Jackson, J.G.; Janszen, D.B.; Lonnerdal, B.; Lien, E.L.; Pramuk, K.P.; Kuhlman, C.F. A multinational study of α-lactalbumin concentrations in human milk. J. Nutr. Biochem. 2004, 15, 517–521, doi:10.1016/j.jnutbio.2003.10.009.
- Permyakov, E.A. α-Lactalbumin, amazing calcium-binding protein. Biomolecules 2020, 10, 1–50, doi:10.3390/biom10091210.
- 116. Bhattacharya, S.D.; Roychoudhury, A.K.; Sinha, N.K..; Sen, A. Inherited αlactalbumin and β-lactoglobulin polymorphism in Indian zebu cattle. Comparison of zebu and buffalo α-lactalbumins. *Nature* **1963**, 197, 797–799.
- 117. Visker, M.H.P.W.; Heck, J.M.L.; van Valenberg, H.J.F.; van Arendonk, J.A.M.; Bovenhuis, H. Short communication: A new bovine milk-protein variant: α-Lactalbumin variant D. J. Dairy Sci. 2012, 95, 2165–2169, doi:10.3168/jds.2011-4794.
- Bell, K.; Hoppe, K.; McKenzie, H. Bovine α-lactalbumin C and αs1-, β- and κ-caseins of Bali (Banteng) cattle. Bos (Bibos) javanicus. Aust. J. Biol. Sci. 1981, 37, 149–159.
- Brew, K. Milk Proteins: α-Lactalbumin. Encycl. Dairy Sci. Second Ed. 2011, 3, 780–786, doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00432-5.
- 120. McKenzie, H.A.; White, F.H. Lysozyme and α-lactalbumin: Structure, function, and interrelationships. Adv. Protein Chem. 1991, 41, 173–315, doi:10.1016/S0065-3233(08)60198-9.
- 121. Wong, D.W.S.; Camirand, W.M.; Pavlath, A.E. Structures and

Functionalities of Milk Proteins; 1996; Bd. 36; ISBN 1040839960952.

- 122. Pike, A.C.W.; Brew, K.; Acharya, K.R. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure* **1996**, 4, 691–703, doi:10.1016/S0969-2126(96)00075-5.
- 123. Chrysina, E.D.; Brew, K.; Acharya, K.R. Crystal structures of Apo- and holo-bovine α-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. J. Biol. Chem. 2000, 275, 37021–37029, doi:10.1074/jbc.M004752200.
- 124. 3D View: 1F6S Verfügbar unter: https://www.rcsb.org/3d-view/1F6S (zugegriffen 1 Juli 2021).
- 125. Chang, J.Y.; Li, L. Pathway of oxidative folding of α-lactalbumin: A model for illustrating the diversity of disulfide folding pathways. *Biochemistry* 2002, 41, 8405–8413, doi:10.1021/bi020169k.
- 126. Rao, K.R.; Brew, K. Calcium regulates folding and disulfide-bond formation in α-lactalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 1390–1396, doi:10.1016/0006-291X(89)91133-9.
- 127. Chatterton, D.E.W.; Smithers, G.; Roupas, P.; Brodkorb, A. Bioactivity of β-lactoglobulin and α-lactalbumin-Technological implications for processing. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1229–1240, doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.001.
- 128. Hiraoka, Y.; Segawa, T.; Kuwajima, K.; Sugai, S.; Murai, N. α-Lactalbumin: A calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 95, 1098– 1104.
- 129. Permyakov, E.A.; Yarmolenko, V. V.; Kalinichenko, L.P.; Morozova, L.A.; Burstein, E.A. Calcium binding to α-lactalbumin: Structural rearrangement and association constant evaluation by means of intrinsic protein fluorescence changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *100*, 191–197, doi:10.1016/S0006-291X(81)80081-2.
- N'Negue, M.A.; Miclo, L.; Girardet, J.M.; Campagna, S.; Mollé, D.; Gaillard, J.L. Proteolysis of bovine α-lactalbumin by thermolysin during thermal denaturation. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 1157–1167, doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.004.
- 131. Rajaraman, K.; Raman, B.; Ramakrishna, T.; Rao, C.M. The chaperone-like α-crystallin forms a complex only with the aggregation-prone molten globule state of α-lactalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 917– 921, doi:10.1006/bbrc.1998.9242.
- 132. Relkin, P.; Launay, B.; Eynard, L. Effect of Sodium and Calcium Addition on Thermal Denaturation of Apo-α-Lactalbumin: a Differential Scanning Calorimetric Study. J. Dairy Sci. 1993, 76, 36–47, doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77321-X.
- 133. Hendrix, T.; Griko, Y. V.; Privalov, P.L. A calorimetric study of the

influence of calcium on the stability of bovine α -lactalbumin. *Biophys. Chem.* **2000**, *84*, 27–34, doi:10.1016/S0301-4622(99)00140-4.

- 134. Veprintsev, D.B.; Permyakov, S.E.; Permyakov, E.A.; Rogov, V. V.; Cawthern, K.M.; Berliner, L.J. Cooperative thermal transitions of bovine and human apo-α-lactalbumins: Evidence for a new intermediate state. *FEBS Lett.* **1997**, 412, 625–628, doi:10.1016/S0014-5793(97)00841-7.
- Griko, Y. V.; Freire, E.; Privalov, P.L. Energetics of the α-Lactalbumin States: A Calorimetric and Statistical Thermodynamic Study. *Biochemistry* 1994, 33, 1889–1899, doi:10.1021/bi00173a036.
- Farkas, V.; Vass, E.; Hanssens, I.; Majer, Z.; Hollósi, M. Cyclic peptide models of the Ca2+-binding loop of α-lactalbumin. *Bioorganic Med. Chem.* 2005, 13, 5310–5320, doi:10.1016/j.bmc.2005.06.040.
- 137. Permyakov, E.A.; Morozova, L.A.; Burstein, E.A. Cation binding effects on the pH, thermal and urea denaturation transitions in α-lactalbumin. *Biophys. Chem.* **1985**, *21*, 21–31, doi:10.1016/0301-4622(85)85003-1.
- 138. Permyakov, E.A.; Kalinichenko, L.P.; Morozova, L.A.; Yarmolenko, V. V.; Burstein, E.A. α-Lactalbumin binds magnesium ions: Study by means of intrinsic fluorescence technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 102, 1–7, doi:10.1016/0006-291X(81)91480-7.
- 139. Berliner, L.J.; Murakami, K.; Ellis, P.D. Manganese(II) Electron Spin Resonance and Cadmium-113 Nuclear Magnetic Resonance Evidence for the Nature of the Calcium Binding Site in α-Lactalbumins. *Biochemistry* 1983, 22, 5061–5063, doi:10.1021/bi00291a002.
- Ptitsyn, O.B. Molten globule and protein folding. Adv. Protein Chem. 1995, 47, 83–229, doi:10.1016/s0065-3233(08)60546-x.
- 141. De Laureto, P.P.; Frare, E.; Battaglia, F.; Mossuto, M.F.; Uversky, V.N.; Fontana, A. Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of αlactalbumin. *FEBS J.* **2005**, *272*, 2176–2188, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04638.x.
- 142. Kharakoz, D.P.; Bychkova, V.E. Molten globule of human α-lactalbumin: Hydration, density, and compressibility of the interior. *Biochemistry* 1997, 36, 1882–1890, doi:10.1021/bi960264r.
- 143. Dolgikh, D.A.; Gilmanshin, R.I.; Brazhnikov, E. V.; Bychkova, V.E.; Semisotnov, G. V.; Venyaminov, S.Y.; Ptitsyn, O.B. A-Lactalbumin: Compact State With Fluctuating Tertiary Structure? *FEBS Lett.* **1981**, *136*, 311–315, doi:10.1016/0014-5793(81)80642-4.
- 144. Hatt, B.W. The molten state of a-lactalbumin. FASEB J 1996, 10, 102–109, doi:10.1016/0160-9327(79)90045-0.
- 145. Heine, W.E.; Klein, P.D.; Reeds, P.J. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. J. Nutr. 1991, 121, 277–283, doi:10.1093/jn/121.3.277.
- 146. Berliner, L.J.; Meinholtz, D.C.; Hirai, Y.; Musci, G.; Thompson, M.P.

Functional Implications Resulting from Disruption of the Calcium-Binding Loop in Bovine α-Lactalbumin. J. Dairy Sci. **1991**, 74, 2394–2402, doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78413-0.

- 147. Bonnaillie, L.M.; Tomasula, P.M. Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide to produce enriched αlactalbumin and βlactoglobulin food ingredients. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 5257–5266, doi:10.1021/jf3011036.
- Korhonen, H.; Pihlanto, A. Technological Options for the Production of Health-Promoting Proteins and Peptides Derived from Milk and Colostrum. *Curr. Pharm. Des.* 2007, 13, 829–843, doi:10.2174/138161207780363112.
- 149. Fast, J.; Mossberg, A.; Svanborg, C.; Linse, S. Stability of HAMLET-A kinetically trapped -lactalbumin oleic acid complex. *Protein Sci.* 2005, 14, 329–340, doi:10.1110/ps.04982905.
- 150. Svensson, M.; Hakansson, A.; Mossberg, A.-K.; Linse, S.; Svanborg, C. Conversion of α-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, *97*, 4221–4226, doi:10.1073/pnas.97.8.4221.
- 151. Brück, W.M.; Kelleher, S.L.; Gibson, G.R.; Nielsen, K.E.; Chatterton, D.E.W.; Lönnerdal, B. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic Escherichia coli. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2003, 37, 273–280, doi:10.1097/00005176-200309000-00014.
- 152. Berkhout, B.; Derksen, G.C.H.; Back, N.K.T.; Klaver, B.; De Kruif, C.G.; Visser, S. Structural and functional analysis of negatively charged milk proteins with anti-HIV activity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1997, 13, 1101–1107, doi:10.1089/aid.1997.13.1101.
- 153. Oevermann, A.; Engels, M.; Thomas, U.; Pellegrini, A. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification. *Antiviral Res.* 2003, 59, 23–33, doi:10.1016/S0166-3542(03)00010-X.
- 154. Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Hunziker, P.; Von Fellenberg, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine αlactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 439–448, doi:10.1016/S0304-4165(98)00165-2.
- 155. Markus, C.R.; Olivier, B.; Panhuysen, G.E.M.; Van Der Gugten, J.; Alles, M.S.; Tuiten, A.; Westenberg, H.G.M.; Fekkes, D.; Koppeschaar, H.F.; De Haan, E.E.H.F. The bovine protein α-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 71, 1536–1544, doi:10.1093/ajcn/71.6.1536.

- 156. Zhang, L.; Li, D.; Xu, R.; Zheng, S.; He, H.; Wan, J.; Feng, Q. Structural and functional analyses of a sterol carrier protein in spodoptera litura. *PLoS One* 2014, 9, doi:10.1371/journal.pone.0081542.
- 157. Lönnerdal, B.; Lien, E. Nutritional and Physiologic Signi cance of Infants -Lactalbumin in. *Nutr. Rev.* 2003, *61*, 295–305, doi:10.131/nr.2003.sept.295.
- 158. Matsumoto, H.; Shimokawa, Y.; Ushida, Y.; Toida, T.; Hayasawa, H. New Biological Function of Bovine α-Lactalbumin: Protective Effect against Ethanol- and Stress-induced aGastric Mucosal Injury in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001, 65, 1104–1111, doi:10.1271/bbb.65.1104.
- Sharma, S.; Kumar, P.; Betzel, C.; Singh, T.P. Structure and function of proteins involved in milk allergies. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2001, 756, 183–187, doi:10.1016/S0378-4347(01)00107-4.
- Skripak, J.M.; Matsui, E.C.; Mudd, K.; Wood, R.A. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 2007, 120, 1172– 1177, doi:10.1016/j.jaci.2007.08.023.
- 161. Exl, B.M.; Fritsché, R. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition* 2001, *17*, 642–651, doi:10.1016/S0899-9007(01)00566-4.
- 162. Lam, H.Y.; Van Hoffen, E.; Michelsen, A.; Guikers, K.; Van Der Tas, C.H.W.; Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M.; Knulst, A.C. Cow's milk allergy in adults is rare but severe: Both casein and whey proteins are involved. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 995–1002, doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02968.x.
- Osterballe, M.; Mortz, C.G.; Hansen, T.K.; Andersen, K.E.; Bindslev-Jensen,
 C. The prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2009, 20, 686–692, doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00842.x.
- Helm, R.; Burks, A. Mechanisms of food allergy. *Curr Opin Immunol* 2000, 6, 647–653, doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.001113.
- Boden, M.; Dadswell, R.; Hattersley, S. Review of statutory and voluntary labelling of food allergens. *Proc. Nutr. Soc.* 2005, 64, 475–480, doi:10.1079/pns2005453.
- 166. Rona, R.J.; Keil, T.; Summers, C.; Gislason, D.; Zuidmeer, L.; Sodergren, E.; Sigurdardottir, S.T.; Lindner, T.; Goldhahn, K.; Dahlstrom, J.; u. a. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, *120*, 638–646, doi:10.1016/j.jaci.2007.05.026.
- 167. Bu, G.; Luo, Y.; Chen, F.; Liu, K.; Zhu, T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review. *Dairy Sci. Technol.* 2013, 93, 211–223, doi:10.1007/s13594-013-0113-x.
- 168. Zhang, M.; Zheng, J.; Ge, K.; Zhang, H.; Fang, B.; Jiang, L.; Guo, H.; Ding, Q.; Ren, F. Glycation of α-lactalbumin with different size saccharides: Effect on protein structure and antigenicity. *Int. Dairy J.* **2014**, *34*, 220–228, doi:10.1016/j.idairyj.2013.09.003.

- 169. Enomoto, H.; Hayashi, Y.; Li, C.P.; Ohki, S.; Ohtomo, H.; Shiokawa, M.; Aoki, T. Glycation and phosphorylation of α-lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions. J. Dairy Sci. 2009, 92, 3057–3068, doi:10.3168/jds.2009-2014.
- 170. El-Ghaish, S.; Ahmadova, A.; Hadji-Sfaxi, I.; El Mecherfi, K.E.; Bazukyan, I.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Sitohy, M.; Popov, Y.G.; Kuliev, A.A.; u. a. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci. Technol.* 2011, 22, 509–516, doi:10.1016/j.tifs.2011.05.003.
- Kreis, W. Sekundäre Pflanzenstoffe und Krebs. Dtsch. Zeitschrift für Onkol. 2009, 41, 100–108.
- Halkier, B.A.; Gershenzon, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu.* Rev. Plant Biol. 2006, 57, 303–333, doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228.
- 173. Ishida, M.; Hara, M.; Fukino, N.; Kakizaki, T.; Morimitsu, Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of brassicaceae vegetables. *Breed. Sci.* 2014, 64, 48–59, doi:10.1270/jsbbs.64.48.
- 174. Lambrix, V.; Reichelt, M.; Mitchell-Olds, T.; Kliebenstein, D.J.; Gershenzon, J. The Arabidopsis Epithiospecifier Protein Promotes the Hydrolysis of Glucosinolates to Nitriles and Influences Trichoplusia ni Herbivory. *Plant Cell* 2001, 13, 2793–2807, doi:10.1105/tpc.106.180660.
- Tsao, R.; Peterson, C.J.; Coats, J.R. Effect on Carbon Dioxide Emission of Insects. *BMC Ecol.* 2002, 7, 3–9.
- 176. Baskar, V.; Gururani, M.A.; Yu, J.W.; Park, S.W. Engineering glucosinolates in plants: Current knowledge and potential uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012, 168, 1694–1717, doi:10.1007/s12010-012-9890-6.
- 177. Cartea, M.E.; Velasco, P. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem. Rev.* 2008, 7, 213–229, doi:10.1007/s11101-007-9072-2.
- 178. Grob, K.; Matile, P.H. Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Sci. Lett.* **1979**, *14*, 327–335, doi:10.1016/S0304-4211(79)90281-5.
- 179. Van Dam, N.M.; Tytgat, T.O.G.; Kirkegaard, J.A. Root and shoot glucosinolates: A comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem. Rev.* 2009, *8*, 171–186, doi:10.1007/s11101-008-9101-9.
- 180. Kliebenstein, D.J.; Kroymann, J.; Brown, P.; Figuth, A.; Pedersen, D.; Gershenzon, J.; Mitchell-Olds, T. Genetic control of natural variation in arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.* 2001, 126, 811–825, doi:10.1104/pp.126.2.811.
- 181. Bennett, R.N.; Mellon, F.A.; Kroon, P.A. Screening Crucifer Seeds as

Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 428–438, doi:10.1021/jf030530p.

- Schreiner, M. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *Eur J Nutr* 2005, 44, 85–94, doi:10.1007/s00394-004-0498-7.
- 183. Verkerk, R.; Schreiner, M.; Krumbein, A.; Ciska, E.; Holst, B.; Rowland, I.; de Schrijver, R.; Hansen, M.; Gerhäuser, C.; Mithen, R.; u. a. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, *53*, 219–265, doi:10.1002/mnfr.200800065.
- 184. Traka, M.; Mithen, R. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem. Rev.* 2009, 8, 269–282, doi:10.1007/s11101-008-9103-7.
- 185. Brown, P.D.; Tokuhisa, J.G.; Reichelt, M.; Gershenzon, J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* 2003, 62, 471–481, doi:10.1016/S0031-9422(02)00549-6.
- Sukhija, P.S.; Loomba, A.; Ahuja, K.L.; Munshi, S.K. Glucosinolates and lipid content in developing and germinating cruciferous seeds. *Plant Sci.* 1985, 40, 1–6, doi:10.1016/0168-9452(85)90155-4.
- 187. Clossais-Besnard, N.; Larher, F. Physiological role of glucosinolates in brassica napus. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. J. Sci. Food Agric. 1991, 56, 25–38, doi:10.1002/jsfa.2740560104.
- Pérez-Balibrea, S.; Moreno, D.; García-Viguera, C. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. J. Sci. ofFood Agric. 2008, 88, 904–910, doi:10.1002/jsfa.
- 189. Rosa, E.A.S. Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. J. Sci. Food Agric. 1997, 73, 364–368, doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199703)73:3<364::AID-JSFA742>3.0.CO;2-O.
- 190. Kushad, M.; Brown, A.; Kurilich, A.; Juvik, J.; Klein, B.; Wallig, M.; Jeffery, E. Variation of Glucosinolates in Vegetable Crops of Brassica oleracea. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 1541–1548, doi:10.1016/j.phytochem.2006.11.017.
- 191. Fenwick, G.R.; Heaney, R.K. Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. *Food Chem.* 1983, 11, 249–271, doi:10.1016/0308-8146(83)90074-2.
- 192. Fahey, J.W.; Zalcmann, A.T.; Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001, 56, 5–51, doi:10.1016/S0031-9422(00)00316-2.

- 193. Wittstock, U.; Halkier, B.A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant Sci.* 2002, 7, 263–270, doi:10.1016/S1360-1385(02)02273-2.
- Kjær, A. Glucosinolates and related compounds. Food Chem. 1981, 6, 223– 234, doi:10.1016/0308-8146(81)90011-X.
- 195. Mikkelsen, M.D.; Petersen, B.L.; Olsen, C.E.; Halkier, B.A. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* 2002, 22, 279–295, doi:10.1007/s007260200014.
- 196. Hanschen, F.S.; Lamy, E.; Schreiner, M.; Rohn, S. Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angew. Chemie -Int. Ed.* 2014, 53, 11430–11450, doi:10.1002/anie.201402639.
- 197. Mithen, R.F.; Dekker, M.; Verkerk, R.; Rabot, S.; Johnson, I.T. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. J. Sci. Food Agric. 2000, 80, 967–984, doi:10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<967::aid-jsfa597>3.3.co;2-m.
- Halkier, B.A.; Du, L. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci.* 1997, 2, 425–431, doi:10.1016/S1360-1385(97)01128-X.
- Grubb, C.D.; Abel, S. Glucosinolate metabolism and its control. Trends Plant Sci. 2006, 11, 89–100, doi:10.1016/j.tplants.2005.12.006.
- 200. Bones, A.M.; Rossiter, J.T. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* **1996**, *97*, 194–208, doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x.
- 201. Kissen, R.; Rossiter, J.T.; Bones, A.M. The "mustard oil bomb": Not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochem. Rev.* 2009, *8*, 69–86, doi:10.1007/s11101-008-9109-1.
- 202. Thangstad, O.P.; Iversen, T.H.; Slupphaug, G.; Bones, A. Immunocytochemical localization of myrosinase in Brassica napus L. *Planta* 1990, 180, 245–248, doi:10.1007/BF00194003.
- 203. Bones, A.M.; Rossiter, J.T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 2006, 67, 1053–1067, doi:10.1016/j.phytochem.2006.02.024.
- 204. Zhang, Z.; Ober, J.A.; Kliebenstein, D.J. The gene controlling the quantitative trait locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006, 18, 1524–1536, doi:10.1105/tpc.105.039602.
- Burow, M.; Wittstock, U. Regulation and function of specifier proteins in plants. *Phytochem. Rev.* 2009, *8*, 87–99, doi:10.1007/s11101-008-9113-5.
- 206. Foo, H.L.; Grönning, L.M.; Goodenough, L.; Bones, A.M.; Y, B.D.; Whiting, D.A.; Y, J.T.R. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from Brassica napus: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. 2000, 468,

243 - 246.

- Victor; G.; Alexander, M. Studies on glucosinolate degradation in lepidiumsativum seed extracts. *Phytochemistry* 1980, 19, 1369–1374.
- 208. Shikita, M.; Fahey, J.W.; Golden, T.R.; Holtzclaw, W.D.; Talalay, P. An unusual case of "uncompetitive activation" by ascorbic acid: Purification and kinetic properties of a myrosinase from Raphanus sativus seedlings. *Biochem. J.* 1999, 341, 725–732, doi:10.1042/0264-6021:3410725.
- 209. Li, X.; Kushad, M.M. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (Armoracia rusticana) roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2005, 43, 503–511, doi:10.1016/j.plaphy.2005.03.015.
- Ohtsuru, M.; Kawatani, H. Studies on the myrosinase from Wasabia japonica: Purification and some properties of wasabi myrosinase. *Agric. Biol. Chem.* 1979, 43, 2249–2255, doi:10.1080/00021369.1979.10863801.
- 211. Van Eylen, D.; Oey, I.; Hendrickx, M.; Van Loey, A. Behavior of mustard seed (Sinapis alba L.) myrosinase during temperature/pressure treatments: A case study on enzyme activity and stability. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, 545–553, doi:10.1007/s00217-007-0569-0.
- 212. Yen, G. -C; Wei, Q. -K Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan. J. Sci. Food Agric. 1993, 61, 471–475, doi:10.1002/jsfa.2740610415.
- Warton, B.; Matthiessen, J.N.; Shackleton, M.A. Glucosinolate content and isothiocyanate evolution - Two measures of the biofumigation potential of plants. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5244–5250, doi:10.1021/jf010545s.
- 214. Ettlinger, M.; Dateo, G.; Harrison, B.; Mabry, T.; Thompson, C. Vitamin C as a Coenzyme: the Hydrolysis of Mustard Oil Glycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1961, 47, 1875–1880.
- 215. Burmeister, W.P.; Cottaz, S.; Rollin, P.; Vasella, A.; Henrissat, B. High resolution x-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. J. Biol. Chem. 2000, 275, 39385–39393, doi:10.1074/jbc.M006796200.
- Schnug, E.; Haneklaus, S.; Borchers, A.; Polle, A. Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in Brassica napus. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd.* 1995, 158, 67–69, doi:10.1002/jpln.19951580113.
- Zhang, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. Mol. Nutr. Food Res 2010, 54, 127–135, doi:10.1002/mnfr.200900323.
- Juge, N.; Mithen, R.F.; Traka, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 1105– 1127, doi:10.1007/s00018-007-6484-5.
- 219. Conaway, C.C.; Getahun, S.M.; Liebes, L.L.; Pusateri, D.J.; Topham, K.W.; Botero-omary, M.; Chung, F.; Conaway, C.C.; Getahun, S.M.; Liebes, L.L.;

u. a. Disposition of Glucosinolates and Sulforaphane in Humans After Ingestion of Steamed and Fresh Broccoli. *Nutr. Cancer* **2000**, *38*, 168–178, doi:10.1207/S15327914NC382.

- 220. Fimognari, C.; Turrini, E.; Ferruzzi, L.; Lenzi, M.; Hrelia, P. Natural isothiocyanates: Genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 2012, 750, 107–131, doi:10.1016/j.mrrev.2011.12.001.
- Chung, F.L.; Conaway, C.C.; Rao, C. V.; Reddy, B.S. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 2000, 21, 2287–2291, doi:10.1093/carcin/21.12.2287.
- 222. Singh, A. V.; Xiao, D.; Lew, K.L.; Dhir, R.; Singh, S. V. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* 2004, 25, 83–90, doi:10.1093/carcin/bgg178.
- 223. Cornblatt, B.S.; Ye, L.; Dinkova-Kostova, A.T.; Erb, M.; Fahey, J.W.; Singh, N.K.; Chen, M.S.A.; Stierer, T.; Garrett-Mayer, E.; Argani, P.; u. a. Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* 2007, 28, 1485–1490, doi:10.1093/carcin/bgm049.
- 224. Zhang, Y.; Kensler, T.W.; Cho, C.G.; Posner, G.H.; Talalay, P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3147– 3150, doi:10.1073/pnas.91.8.3147.
- 225. Conaway, C.C.; Wang, C.X.; Pittman, B.; Yang, Y.M.; Schwartz, J.E.; Tian, D.; McIntee, E.J.; Hecht, S.S.; Chung, F.L. Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice. Cancer Res. 2005, 65, 8548–8557, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0237.
- 226. Kuroiwa, Y.; Nishikawa, A.; Kitamura, Y.; Kanki, K.; Ishii, Y.; Umemura, T.; Hirose, M. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* **2006**, *241*, 275–280, doi:10.1016/j.canlet.2005.10.028.
- 227. Kallifatidis, G.; Rausch, V.; Baumann, B.; Apel, A.; Beckermann, B.M.; Groth, A.; Mattern, J.; Li, Z.; Kolb, A.; Moldenhauer, G.; u. a. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-κB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* 2009, *58*, 949–963, doi:10.1136/gut.2008.149039.
- 228. Pham, N.A.; Jacobberger, J.W.; Schimmer, A.D.; Cao, P.; Gronda, M.; Hedley, D.W. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.* 2004, *3*, 1239–1248.
- 229. Joseph, M.A.; Moysich, K.B.; Freudenheim, J.L.; Shields, P.G.; Bowman,

E.D.; Zhang, Y.; Marshall, J.M.; Ambrosone, C.B. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr. Cancer* **2004**, *50*, 206–213, doi:10.1207/s15327914nc5002_11.

- 230. Cohen, J.H.; Kristal, A.R.; Stanford, J.L. Fruit and Vegetable Intakes and Prostate Cancer Risk _ JNCI_ Journal of the National Cancer Institute _ Oxford Academic. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 2000, 92, 61–68.
- 231. Giovannucci, E.; Rimm, E.B.; Liu, Y.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. A Prospective Study of Cruciferous Vegetables and Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003, 12, 1403–1409.
- 232. Verhoeven, D.T.H.; Goldbohm, R.A.; Van Poppel, G.; Verhagen, H.; Van Den Brandt, P.A. Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 733–748.
- 233. Michaud, D.S.; Spiegelman, D.; Clinton, S.K.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Giovannucci, E.L. Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91, 605–613, doi:10.1093/jnci/91.7.605.
- 234. Voorrips, L.E.; Goldbohm, R.A.; Van Poppel, G.; Sturmans, F.; Hermus, R.J.J.; Van Den Brandt, P.A. Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. Am. J. Epidemiol. 2000, 152, 1081–1092, doi:10.1093/aje/152.11.1081.
- 235. Mi, L.; Wang, X.; Govind, S.; Hood, B.L.; Veenstra, T.D.; Conrads, T.P.; Saha, D.T.; Goldman, R.; Chung, F.L. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67, 6409–6416, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0340.
- 236. Abbaoui, B.; Riedl, K.M.; Ralston, R.A.; Thomas-Ahner, J.M.; Schwartz, S.J.; Clinton, S.K.; Mortazavi, A. Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: Characterization, metabolism, and interconversion. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, 56, 1675–1687, doi:10.1002/mnfr.201200276.
- 237. Dinkova-Kostova, A.T.; Kostov, R. V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol. Med.* 2012, 18, 337–347, doi:10.1016/j.molmed.2012.04.003.
- Beecher, C. Cancer preventive properties of varietie of Brassica oleracea: a review. Am J Clin Nutr 1994, 59, 1166–1170.
- 239. Higdon, J. V.; Delage, B.; Williams, D.E.; Dashwood, R.H. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol. Res.* 2007, 55, 224–236, doi:10.1016/j.phrs.2007.01.009.
- 240. Seow, A.; Yuan, J.; Sun, C.; Berg, D. Van Den; Lee, H.; Yu, M.C. Dietary

isothiocyanates , glutathione S -transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study been inversely related to colorectal cancer risk , and this degradation products such as isothiocyanates (ITCs). These co. **2002**, *23*, 2055–2061.

- 241. Herr, I.; Büchler, M.W. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2010, *36*, 377–383, doi:10.1016/j.ctrv.2010.01.002.
- 242. Kolonel, L.N.; Hankin, J.H.; Whittemore, A.S.; Wu, A.H.; Gallagher, R.P.; Wilkens, L.R.; John, E.M.; Howe, G.R.; Dreon, D.M.; West, D.W.; u. a. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: A multiethnic case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 795–804.
- 243. Jain, M.G.; Hislop, G.T.; Howe, G.R.; Ghadirian, P. Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: Findings from case, control studies in Canada. *Nutr. Cancer* **1999**, *34*, 173–184, doi:10.1207/S15327914NC3402_8.
- 244. Terry, P.; Wolk, A.; Persson, I.; Magnusson, C. Brassica Vegetables and Breast Cancer Risk. J. Am. Med. Assoc. 2001, 285, 2973–2974, doi:10.1001/jama.285.23.2973.
- 245. Zhao, H.; Lin, J.; Grossman, H.B.; Hernandez, L.M.; Dinney, C.P.; Wu, X. Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *Int. J. Cancer* 2007, *120*, 2208–2213, doi:10.1002/ijc.22549.
- 246. Van Poppel, G.; Verhoeven, D.T.H.; Verhagen, H.; Goldbohm, R.A. Brassica vegetables and cancer prevention: Epidemiology and mechanisms. *Adv. Nutr. Cancer* 1999, *2*, 159–168.
- 247. Wang, L.I.; Giovannucci, E.L.; Hunter, D.; Neuberg, D.; Su, L.; Christiani, D.C. Dietary intake of Cruciferous vegetables, Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control* 2004, 15, 977–985, doi:10.1007/s10552-004-1093-1.
- 248. Spitz, M.; Duphorne, C.; Detry, M.; Pillow, P.; Amos, C.; Lei, L.; Andrade, M.; Gu, X.; Hong, W.; Wu, X. Dietary Intake of Isothiocyanates: Evidence of a Joint Effect with Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2001**, *10*, 1105–1106.
- 249. London, S.J.; Yuan, J.M.; Chung, F.L.; Gao, Y.T.; Coetzee, G.A.; Ross, R.K.; Yu, M.C. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: A prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 2000, 356, 724–729, doi:10.1016/S0140-6736(00)02631-3.
- 250. Ambrosone, C.B.; McCann, S.E.; Freudenheim, J.L.; Marshall, J.R.; Zhang, Y.; Shields, P.G. Breast Cancer Risk in Premenopausal Women Is Inversely Associated with Consumption of Broccoli, a Source of Isothiocyanates, but
Is Not Modified by GST Genotype. J. Nutr. **2004**, 134, 1134–1138, doi:10.1093/jn/134.5.1134.

- 251. Fowke, J.H.; Chung, F.L.; Jin, F.; Qi, D.; Cai, Q.; Conaway, C.; Cheng, J.R.; Shu, X.O.; Gao, Y.T.; Zheng, W. Urinary isothiocyanate levels, Brassica, and human breast cancer. *Cancer Res.* 2003, 63, 3980–3986.
- Pawlik, A.; Wiczk, A.; Kaczyńska, A.; Antosiewicz, J.; Herman-Antosiewicz,
 A. Sulforaphane inhibits growth of phenotypically different breast cancer cells. *Eur. J. Nutr.* 2013, *52*, 1949–1958, doi:10.1007/s00394-013-0499-5.
- 253. Lamy, E.; Hertrampf, A.; Herz, C.; Schüler, J.; Erlacher, M.; Bertele, D.; Bakare, A.; Wagner, M.; Weiland, T.; Lauer, U.; u. a. Preclinical Evaluation of 4-Methylthiobutyl Isothiocyanate on Liver Cancer and Cancer Stem Cells with Different p53 Status. *PLoS One* 2013, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0070846.
- 254. Lamy, E.; Oey, D.; Eißmann, F.; Herz, C.; Münstedt, K.; Tinneberg, H.R.; Mersch-Sundermann, V. Erucin and benzyl isothiocyanate suppress growth of late stage primary human ovarian carcinoma cells and telomerase activity in vitro. *Phyther. Res.* 2013, 27, 1036–1041, doi:10.1002/ptr.4798.
- 255. Zhang, Y.; Talalay, P. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes. *Cancer Res.* 1998, 58, 4632–4639.
- Hecht, S.S. Biochemistry and Physiology Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanates, Modifiers of Carcinogen Metabolism. *Symp. Phytochem. J. Nutr. 129* 1999, 768–774.
- 257. WHO Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles. *IARC Handbooks Cancer Prev.* 43–171.
- Hecht, S.S. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab. Rev.* 2000, *32*, 395–411, doi:10.1081/DMR-100102342.
- 259. Stan, S.D.; Kar, S.; Stoner, G.D.; Singh, S. V. Bioactive food components and cancer risk reduction. J. Cell. Biochem. 2008, 104, 339–356, doi:10.1002/jcb.21623.
- Hanausek, M.; Walaszek, Z.; Slaga, T.J. Detoxifying Cancer Causing Agents. Integr Cancer Ther. 2003, 2, 139–144, doi:10.1177/1534735403253305.
- 261. Conaway, C.C.; Jiao, D.; Chung, F.L. Inhibition of rat liver cytochrome P450 isozymes by isothiocyanates and their conjugates: A structure-activity relationship study. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2423–2427, doi:10.1093/carcin/17.11.2423.
- 262. K. Mahéo, F. Morel, S. Langouet, H. Kramer, E. Le Ferrec, B. Ketterer, A.G. Inhibition of Cytochromes P-450 and Induction of Glutathione S-Transferases by Sulforaphane in Primary Human and Rat Hepatocytes'. *Cancer Res* 1997, 57, 3649–3652.
- 263. Goosen, T.C.; Mills, D.E.; Hollenberg, P.F. Effects of benzyl isothiocyanate

on rat and human cytochromes P450: Identification of metabolites formed by P450 2B1. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, 296, 198–206.

- 264. Fahey, J.W.; Haristoy, X.; Dolan, P.M.; Kensler, T.W.; Scholtus, I.; Stephenson, K.K.; Talalay, P.; Lozniewski, A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyrene- induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, *99*, 7610–7615.
- 265. Heaney, R.K.; Fenwick, G.R. Natural toxins and protective factors in brassica species, including rapeseed. *Nat. Toxins* 1995, *3*, 233–237, doi:10.1002/nt.2620030412.
- Kobayashi, M.; Yamamoto, M. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 2005, 7, 385–394.
- Taguchi, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 2011, 16, 123–140, doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
- Kwak, M.; Kensler, T.W. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, 244, 66–76, doi:10.1016/j.taap.2009.08.028.
- 269. Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, Ø.I. An Nrf2 / Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. **1997**, *322*, 313–322.
- 270. Lai, R.; Keck, A.; Wallig, M.A.; West, L.G.; Jeffery, E.H. Evaluation of the safety and bioactivity of purified and semi-purified glucoraphanin. 2008, 46, 195–202, doi:10.1016/j.fct.2007.07.015.
- 271. Munday, R.; Munday, C.M. Induction of Phase II Detoxification Enzymes in Rats by Plant-Derived Isothiocyanates: Comparison of Allyl Isothiocyanate with Sulforaphane and Related Compounds. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 1867–1871, doi:10.1021/jf030549s.
- 272. Riedl, M.A.; Saxon, A.; Diaz-Sanchez, D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin. Immunol.* 2009, 130, 244–251, doi:10.1016/j.clim.2008.10.007.
- 273. Zhang, Y. The molecular basis that unifies the metabolism , cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. 2012, 33, 2–9, doi:10.1093/carcin/bgr255.
- 274. Ernst, I.M.A.; Wagner, A.E.; Schuemann, C.; Storm, N.; Höppner, W.; Döring, F.; Stocker, A.; Rimbach, G. Allyl-, butyl- and phenylethylisothiocyanate activate Nrf2 in cultured fibroblasts. *Pharmacol. Res.* 2011, 63, 233–240, doi:10.1016/j.phrs.2010.11.005.
- 275. Cuddihy, S.L.; Brown, K.K.; Thomson, S.J.; Hampton, M.B. Induction of

apoptosis by phenethyl isothiocyanate in cells overexpressing Bcl-XL. *Cancer Lett.* **2008**, *271*, 215–221, doi:10.1016/j.canlet.2008.06.002.

- 276. Gingras, D.; Gendron, M.; Boivin, D.; Moghrabi, A.; Théorêt, Y.; Béliveau, R. Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett.* 2004, 203, 35–43, doi:10.1016/j.canlet.2003.08.025.
- 277. Fimognari, C.; Nüsse, M.; Berti, F.; Iori, R.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P. Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: Molecular pathway on human transformed and non-transformed cells. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 1133–1138, doi:10.1016/j.bcp.2004.03.044.
- Barillari, J.; Iori, R.; Papi, A.; Orlandi, M.; Bartolini, G.; Gabbanini, S.; Pedulli, G.F.; Valgimigli, L. Kaiware Daikon (Raphanus sativus L.) extract: A naturally multipotent chemopreventive agent. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 7823–7830, doi:10.1021/jf8011213.
- 279. Lynn, A.; Collins, A.; Fuller, Z.; Hillman, K.; Ratcliffe, B. Cruciferous vegetables and colo-rectal cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 2006, 65, 135–144, doi:10.1079/pns2005486.
- 280. Cheung, K.L.; Khor, T.O.; Kong, A.N. Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharm. Res.* 2009, 26, 224–231, doi:10.1007/s11095-008-9734-9.
- 281. Cheung, K.L.; Khor, T.O.; Yu, S.; Kong, A.N.T. PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. AAPS J. 2008, 10, 277–281, doi:10.1208/s12248-008-9032-9.
- 282. Mi, L.; Xiao, Z.; Hood, B.L.; Dakshanamurthy, S.; Wang, X.; Govind, S.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D.; Chung, F.L. Covalent binding to tubulin by isothiocyanates: A mechanism of cell growth arrest and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 22136–22146, doi:10.1074/jbc.M802330200.
- 283. Lamy, E.; Mersch-sundermann, V. MTBITCMediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction in Human HepG2 Cells Despite its Rapid Degradation Kinetics in the In VitroModel. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009, 50, 190–200, doi:10.1002/em.
- 284. Kim, S.H.; Sehrawat, A.; Singh, S. V. Dietary chemopreventative benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Cancer Prev. Res.* 2013, 6, 782–790, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0100.
- 285. Gamet-payrastre, L.; Li, P.; Lumeau, S.; Cassar, G.; Dupont, M.; Chevolleau, S.; Gasc, N.; Tulliez, J.; Tercé, F. Sulforaphane , a Naturally Occurring Isothiocyanate , Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 2000, 60, 1426–1433.
- 286. Dey, M.; Ribnicky, D.; Kurmukov, A.G.; Raskin, I. In vitro and in vivo antiinflammatory activity of a seed preparation containing

phenethylisothiocyanate. J. Pharmacol. Exp. Ther. **2006**, 317, 326–333, doi:10.1124/jpet.105.096511.

- 287. Keum, Y.S.; Jeong, W.S.; Tony Kong, A.N. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2004, 555, 191–202, doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.05.024.
- 288. Conrad, A.; Kolberg, T.; Engels, I.; Frank, U. In-vitro-Untersuchungen zur antibakteriellen Wirksamkeit einer Kombination aus Kapuzinerkressenkraut (Tropaeoli majoris herba) und Meer- rettichwurzel (Armoraciae rusticanae radix). ArzneimForschDrugRes 2006, 56, 842–849.
- 289. Winter, A. Untersuchungen über die Natur der flüchtigen antibiotischen Wirkstoffe aus Tropaeolum Maius. Naturwissenschaften 1954, 41, 337–338.
- 290. Yanaka, A.; Fahey, J.W.; Fukumoto, A.; Nakayama, M.; Inoue, S.; Zhang, S.; Tauchi, M.; Suzuki, H.; Hyodo, I.; Yamamoto, M. Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in Helicobacter pylori – Infected Mice and Humans. *Cancer Prev Res* 2009, 2, 353–361, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0192.
- 291. Papi, A.; Orlandi, M.; Bartolini, G.; Barillari, J.; Iori, R.; Paolini, M.; Ferroni, F.; Fumo, M.G.; Pedulli, G.F.; Valgimigli, L. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from raphanus sativus L. (kaiware daikon) sprouts. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 875– 883, doi:10.1021/jf073123c.
- 292. Kassie, F.; Parzefall, W.; Musk, S.; Johnson, I.; Lamprecht, G.; Sontag, G.; Knasmüller, S. Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.* **1996**, *102*, 1–16, doi:10.1016/0009-2797(96)03728-3.
- Kassie, F.; Pool-Zobel, B.; Parzefall, W.; Knasmüller, S. Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. *Mutagenesis* 1999, 14, 595–603, doi:10.1093/mutage/14.6.595.
- 294. Kassie, F.; Knasmüller, S. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem. Biol. Interact.* 2000, 127, 163–180, doi:10.1016/S0009-2797(00)00178-2.
- 295. Baasanjav-Gerber, C.; Monien, B.H.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Barillari, J.; Iori, R.; Glatt, H. Identification of glucosinolate congeners able to form DNA adducts and to induce mutations upon activation by myrosinase. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 783–792, doi:10.1002/mnfr.201000352.
- 296. Musk, S.R.R.; Johnson, I.T. The clastogenic effects of isothiocyanates. Mutat. Res. Toxicol. 1993, 300, 111–117, doi:10.1016/0165-1218(93)90128-Z.
- 297. Zhang, Y. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic

isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1175–1182, doi:10.1093/carcin/21.6.1175.

- Karlsson, I.; Samuelsson, K.; Ponting, D.J.; Törnqvist, M.; Ilag, L.L.; Nilsson,
 U. Peptide Reactivity of Isothiocyanates Implications for Skin Allergy.
 Nat. Publ. Gr. 2016, 1–12, doi:10.1038/srep21203.
- 299. Holst, B.; Williamson, G.; Holst, B.; Williamson, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **2004**, 425–447.
- 300. Lamy, E.; Scholtes, C.; Herz, C.; Mersch-sundermann, V. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates. 2011, 43, 387–407, doi:10.3109/03602532.2011.569551.
- 301. Kolm, R.H.; Danielson, U.H.; Zhang, Y.; Talalay, P.; Mannervik, B. Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: Structureactivity studies. *Biochem. J.* 1995, 311, 453–459, doi:10.1042/bj3110453.
- 302. Shapiro, T.; Stephenson, K.; Fahey, J.; Wade, K. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998, 7, 1091– 1100.
- 303. Brüsewitz, G.; Cameron, B.; Chasseaud, L.; Görler, K.; Hawkins, D.; Koch, H.; Mennicke, W. The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochem. J.* 1977, 162, 99–107, doi:10.3109/00498258209038932.
- 304. Platz, S.; Kühn, C.; Schiess, S.; Schreiner, M.; Mewis, I.; Kemper, M.; Pfeiffer, A.; Rohn, S. Determination of benzyl isothiocyanate metabolites in human plasma and urine by LC-ESI-MS/MS after ingestion of nasturtium (Tropaeolum majus L.). Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 7427–7436, doi:10.1007/s00216-013-7176-7.
- 305. Capizzi, F.; Roberts, R. Disposition of the hepatotoxin alphanaphthylisothiocyanate (ANIT) in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1970, 17, 262–271.
- 306. Ioannou, Y.M.; Burka, L.T.; Matthews, H.B. Allyl isothiocyanate: Comparative disposition in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984, 75, 173–181, doi:10.1016/0041-008X(84)90199-6.
- 307. Bollard, M.; Stribbling, S.; Mitchell, S.; Caldwell, J. The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 933– 943, doi:10.1016/S0278-6915(97)00103-8.
- 308. Görler, K.; Krumbiegel, G.; Mennicke, W.H.; Siehl, H.U. The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate in Guinea-pigs and rabbits. *Xenobiotica* 1982, 12, 535–542, doi:10.3109/00498258209038932.
- 309. Márton, M.R.; Krumbein, A.; Platz, S.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Rehmers, A.; Lavric, V.; Mersch-Sundermann, V.; Lamy, E. Determination of bioactive, free isothiocyanates from a glucosinolate-containing phytotherapeutic agent: A pilot study with in vitro models and human

intervention. Fitoterapia 2013, 85, 25-34, doi:10.1016/j.fitote.2012.12.016.

- Forbes, R.M.; Erdman, J.W. Bioavailability of trace mineral elements. Ann. Rev. Nutr. 1983, 3, 213–231.
- 311. Boyd, O. Bioavailability of Trace Elements. Nutr. Rev. 1984, 42, 301–308.
- 312. FDA. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm. Cent. Drug Eval. Res. Cent. Vet. Med. 2018, 1–41.
- 313. Hanschen, F.S.; Rohn, S.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Kroh, L.W. Influence of the chemical structure on the thermal degradation of the glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chem.* 2012, 130, 1–8, doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.109.
- 314. Song, L.; Thornalley, P.J. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45, 216–224, doi:10.1016/j.fct.2006.07.021.
- 315. Shapiro, T.A.; Fahey, J.W.; Dinkova-kostova, A.T.; Holtzclaw, W.D.; Stephenson, K.K.; Wade, K.L.; Ye, L.; Talalay, P.; Stephenson, K.; Wade, K.L.; u. a. Safety , Tolerance , and Metabolism of Broccoli Sprout Glucosinolates and Isothiocyanates : A Clinical Phase I Study. *Nutr. Cancer* 2006, 55, 53–62, doi:10.1207/s15327914nc5501.
- 316. Rungapamestry, V.; Duncan, A.; Fuller, Z.; Ratcliffe, B. Changes in Glucosinolate Concentrations, Myrosinase Activity, and Production of Metabolites of Glucosinolates in Cabbage (Brassica oleracea Var. capitata) Cooked for Different Durations VANESSA. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 7628–7634.
- 317. Barba, F.J. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products : impact of Processing. **2016**, *3*, 1–12, doi:10.3389/fnut.2016.00024.
- 318. Vermeulen, M.; Klöpping-Ketelaars, I.; Van den Berg, R.; Vaes, W. Bioavailability and Kinetics of Sulforaphane in Humans after Consumption of Cooked versus Raw Broccoli. J. Agric. Food Chem. 2008, 2008, 56, 10505– 10509.
- 319. Cieślik, E.; Leszczyńska, T.; Filipiak-Florkiewicz, A.; Sikora, E.; Pisulewski, P.M. Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chem.* **2007**, *105*, 976–981, doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.047.
- 320. Fogliano, V.; Pellegrini, N.; Miglio, C.; Chiavaro, E.; Visconti, A. Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 139– 147.
- 321. Vallejo, F.; Tomás-Barberán, F.A.; Garcia-Viguera, C. Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 215, 310–316, doi:10.1007/s00217-002-0560-

8.

- 322. Saha, S.; Hollands, W.; Teucher, B.; Needs, P.W.; Narbad, A.; Ortori, C.A.; Barrett, D.A.; Rossiter, J.T.; Mithen, R.F.; Kroon, P.A. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1906–1916, doi:10.1002/mnfr.201200225.
- 323. Kumar, A.; Sabbioni, G. New biomarkers for monitoring the levels of isothiocyanates in humans. *Chem. Res. Toxicol.* 2010, 23, 756–765, doi:10.1021/tx900393t.
- 324. Hanschen, F.S.; Platz, S.; Mewis, I.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L.W. Thermally induced degradation of sulfur-containing aliphatic glucosinolates in broccoli sprouts (Brassica oleracea var. Italica) and model systems. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 2231–2241, doi:10.1021/jf204830p.
- 325. Drobnica, L.; Augustin, J. Reaction of isothiocyanates with amino acids, peptides and proteins. III. Kinetics and mechanism of the reaction of aromatic isothiocyanates with thioglycolic acid. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 1965, *30*, 1618–1625, doi:10.1135/cccc19651618.
- 326. Brown, K.K.; Hampton, M.B. Biological targets of isothiocyanates. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2011, 1810, 888–894, doi:10.1016/j.bbagen.2011.06.004.
- 327. Drobnica, L.; Kristián, P.; Augustín, J. The chemistry of the-NCS group. In The Chemistry of Cyanates and their Thio Derivatives; Patai, S., Hrsg.; 1977; Bd. 2, S. 1003–1221 ISBN 9780470771532.
- 328. Podhradsk, D.; Drobnica, L.; Kristian, P. Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione, coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* 1979, 35, 154–155.
- Kroll, J.; Jancke, H. Reaktionen von Benzyl-ITC mit Glutathion: NMRspektroskopische Untersuchungen. Nahrung 1994, 38, 96–98.
- 330. Kroll, J.; Rawel, H.; Kröck, R.; Schnaak, W. Interaction of benzyl isothiocyanate with egg white proteins. *Food / Nahrung* 1993, 37, 179–181, doi:10.1002/food.19930370215.
- 331. Bock, A.; Steinhäuser, U.; Drusch, S. Partitioning Behavior and Interfacial Activity of Phenolic Acid Derivatives and their Impact on β-Lactoglobulin at the Oil-Water Interface. *Food Biophys.* 2021, 16, 191–202, doi:10.1007/s11483-020-09663-7.
- 332. Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* 2008, 25, 1487–1499, doi:10.1007/s11095-007-9516-9.
- 333. Soto, C.; Sigurdsson, E.M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castaño, E.M.; Frangione, B. Solubility As Function of Proteins Structure and Solvent

Components. Nat. Med. 1998, 4, 822-826.

- 334. Sun, Q.; Gao, X.; Bi, H.; Xie, Y.; Tang, L. Assessment of Binding Interaction between Bovine Lactoferrin and Tetracycline Hydrochloride: Multi-Spectroscopic Analyses and Molecular Modeling. *Molecules* 2018, 23, doi:10.3390/molecules23081900.
- 335. Rutherfurd, S.M.; Moughan, P.J. Digestible reactive lysine in selected milkbased products. *J. Dairy Sci.* 2005, *88*, 40–48, doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72660-6.
- 336. Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Stuhldreier, M.C.; Temps, F.; Tholey, A.; Schwarz, K. Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate to β-lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry. J. Biomol. Struct. Dyn. 2014, 32, 1103–1117, doi:10.1080/07391102.2013.809605.
- 337. Keppler, J.K.; Sönnichsen, F.D.; Lorenzen, P.C.; Schwarz, K. Differences in heat stability and ligand binding among β-lactoglobulin genetic variants A, B and C using 1H NMR and fluorescence quenching. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 2014, 1844, 1083–1093, doi:10.1016/j.bbapap.2014.02.007.
- 338. Spöttel, J.; Brockelt, J.; Falke, S.; Rohn, S. Characterization of Conjugates between α-Lactalbumin and Benzyl Isothiocyanate — Effects on Molecular Structure and Proteolytic Stability. *Molecules* 2021, 26, 1–31.
- 339. Farrell, H.M.; Qi, P.X.; Brown, E.M.; Cooke, P.H.; Tunick, M.H.; Wickham, E.D.; Unruh, J.J. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships. *J. Dairy Sci.* 2002, *85*, 459–471, doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74096-4.
- 340. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2005, 1751, 119– 139, doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- 341. Das, A.; Thakur, R.; Dagar, A.; Chakraborty, A. A spectroscopic investigation and molecular docking study on the interaction of hen egg white lysozyme with liposomes of saturated and unsaturated phosphocholines probed by an anticancer drug ellipticine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 5368–5381, doi:10.1039/c3cp54247e.
- 342. Banerjee, S.; Dutta Choudhury, S.; Dasgupta, S.; Basu, S. Photoinduced electron transfer between hen egg white lysozyme and anticancer drug menadione. J. Lumin. 2008, 128, 437–444, doi:10.1016/j.jlumin.2007.09.020.
- 343. Gerbanowski, A.; Malabat, C.; Rabiller, C.; Guéguen, J. Grafting of aliphatic and aromatic probes on rapeseed 2S and 12S proteins: Influence on their structural and physicochemical properties. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 5218–5226, doi:10.1021/jf990226p.
- 344. Rawel, H.M.; Rohn, S.; Kruse, H.P.; Kroll, J. Structural changes induced in

bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogeanic acid. *Food Chem.* **2002**, *78*, 443–455, doi:10.1016/S0308-8146(02)00155-3.

- 345. Schwenke, K.D.; Knopfe, C.; Seifert, A.; Görnitz, E.; Zirwer, D. Acetylation of faba bean legumin: Conformational changes and aggregation. J. Sci. Food Agric. 2001, 81, 126–134, doi:10.1002/1097-0010(20010101)81:1<126::AID-JSFA788>3.0.CO;2-Y.
- 346. Rawel, H.M.; Rohn, S.; Kroll, J. Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 2003, 32, 109–120, doi:10.1016/S0141-8130(03)00044-8.
- 347. Kester, J.J.; Richardson, T. Modification of Whey Proteins to Improve Functionality. J. Dairy Sci. 1984, 67, 2757–2774, doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81633-1.
- 348. HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. J. Food Sci. 1985, 50, 486–491, doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13433.x.
- 349. Kato, A.; Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 624, 13–20, doi:10.1016/0005-2795(80)90220-2.
- 350. Li, T.; Wang, C.; Li, T.; Ma, L.; Sun, D.; Hou, J.; Jiang, Z. Surface hydrophobicity and functional properties of citric acid cross-linked whey protein isolate: The impact of pH and concentration of citric acid. *Molecules* 2018, 23, doi:10.3390/molecules23092383.
- Lakkis, J.; Villota, R. Effect of Acylation on Substructural Properties of Proteins: A Study Using Fluorescence and Circular Dichroism. J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 553–560, doi:10.1021/jf00016a005.
- Wilde, S.C.; Treitz, C.; Keppler, J.K.; Koudelka, T.; Palani, K.; Tholey, A.; Rawel, H.M.; Schwarz, K. β-Lactoglobulin as nanotransporter - Part II: Characterization of the covalent protein modification by allicin and diallyl disulfide. *Food Chem.* 2016, 197, 1022–1029, doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.011.
- Roberts, C.J. Non-Native Protein Aggregation Kinetics Christopher. Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 927–938, doi:10.1002/bit.
- 354. Lin, F.Y.; Chen, W.Y.; Ruaan, R.C.; Huang, H.M. Microcalorimetric studies of interactions between protein and hydrophobic ligands in hydrophobic interaction chromatography: effects of ligand chain length, density, and the amount of bound protein. *Prog. Biotechnol.* 2000, 16, 59–62, doi:10.1016/S0921-0423(00)80013-1.
- 355. Hoffmann, M.A.M.; Sala, G.; Olieman, C.; De Kruif, K.G. Molecular Mass Distributions of Heat-Induced β-Lactoglobulin Aggregates. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 2949–2957, doi:10.1021/jf9700788.

- 356. Barth, H. Modern Methods of Particle Size Analysi; Wiley: New York, 1984;
- 357. Woody, R.W. Circular Dichroism. Methods Enzymol. 1995, 246, 34–71, doi:10.1016/0076-6879(95)46006-3.
- 358. Bulheller, B.M.; Rodger, A.; Hirst, J.D. Circular and linear dichroism of proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, *9*, 2020–2035, doi:10.1039/b615870f.
- 359. Whitmore, L.; Wallace, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 2008, 89, 392–400, doi:10.1002/bip.20853.
- Rawel, H.M.; Kroll, J.; Schröder, I. In Vitro Enzymatic Digestion of Benzyland Phenylisothiocyanate-Derivatized Food Proteins. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 5103–5109, doi:10.1021/jf980244r.
- 361. Boggione Santos, I.J.; Hernandez Hernandez, H.L.; Cardoso Costa, M.H.; de Queiroz Lafetá, J.A.; dos Reis Coimbra, J.S. Conjugates of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and lysozyme with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 492–498, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.065.
- 362. Wu, X.; Liu, M.; Xia, L.; Wu, H.; Liu, Z.; Xu, X. Conjugation of functional oligosaccharides reduced in vitro allergenicity of β-lactoglobulin. *Food Agric. Immunol.* 2013, 24, 379–391, doi:10.1080/09540105.2012.686990.
- 363. Järvinen, K.M.; Chatchatee, P.; Bardina, L.; Beyer, K.; Sampson, H.A. IgE and IgG binding epitopes on a-lactalbumin and β-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001, *126*, 111–118, doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01167.x.
- 364. Maynard, F.; Chatel, J.M.; Wal, J.M. Immunological IgE cross-reactions of bovine and human α-lactalbumins in cow's milk allergic patients. *Food Agric. Immunol.* **1999**, *11*, 179–189, doi:10.1080/09540109999852.
- 365. Bu, G.; Luo, Y.; Zheng, Z.; Zheng, H. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α-lactalbumin and β-lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agric. Immunol.* **2009**, *20*, 195–206, doi:10.1080/09540100903026116.
- 366. Morschheuser, L.; Mink, K.; Horst, R.; Kallinich, C.; Rohn, S. Immunological analysis of food proteins using high-performance thin-layer chromatography-immunostaining. J. Chromatogr. A 2017, 1526, 157–166, doi:10.1016/j.chroma.2017.10.046.
- 367. Clare Mills, E.N.; Sancho, A.I.; Rigby, N.M.; Jenkins, J.A.; Mackie, A.R. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 963–969, doi:10.1002/mnfr.200800236.
- Paschke, A.; Besler, M. Stability of bovine allergens during food processing. Ann. Allergy, Asthma Immunol. 2002, 89, 16–20, doi:10.1016/S1081-

1206(10)62117-5.

- Paschke, A. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. Mol. Nutr. Food Res. 2009, 53, 959–962, doi:10.1002/mnfr.200800187.
- 370. Database of Structurally inferred Antigenic Epitopes in Proteins -[Background] Verfügbar unter: https://www.rostlab.org/services/epitome/background.html (zugegriffen 10 Oktober 2021).
- 371. Rohn, S.; Rawel, H.M.; Kroll, J. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 3566–3571, doi:10.1021/jf011714b.
- 372. Besler, M.; Steinhart, H.; Paschke, A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2001, 756, 207–228, doi:10.1016/S0378-4347(01)00110-4.
- 373. Thomas, K.; Herouet-Guicheney, C.; Ladics, G.; Bannon, G.; Cockburn, A.; Crevel, R.; Fitzpatrick, J.; Mills, C.; Privalle, L.; Vieths, S. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45, 1116–1122, doi:10.1016/j.fct.2006.12.016.
- 374. Jiménez-Saiz, R.; Belloque, J.; Molina, E.; López-Fandiño, R. Human immunoglobulin e (IgE) binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid before and after in vitro digestion. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 10044–10051, doi:10.1021/jf2014638.
- 375. Wang, Y.; Wu, W.; Negre, N.N.; White, K.P.; Li, C.; Shah, P.K. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. *BMC Bioinformatics* 2011, *12*, doi:10.1186/1471-2105-12-251.
- 376. Davis, P.J.; Smales, C.M.; James, D.C. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001, 56, 56–60, doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00918.x.
- 377. Kroll, J.; Rawel, H.M.; Seidelmann, N. Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1580–1587, doi:10.1021/jf991172m.
- 378. Siepen, J.A.; Keevil, E.J.; Knight, D.; Hubbard, S.J. Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. J. Proteome Res. 2007, 6, 399–408, doi:10.1021/pr060507u.
- 379. Giansanti, P.; Tsiatsiani, L.; Low, T.Y.; Heck, A.J.R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat. Protoc.* 2016, 11, 993–1006, doi:10.1038/nprot.2016.057.
- 380. Nord, F.F.; Bier, M.; Terminiello, L. On the mechanism of enzyme action. LXI. The self digestion of trypsin, calcium-trypsin and acetyltrypsin. Arch. Biochem. Biophys. 1956, 65, 120–131, doi:10.1016/0003-9861(56)90182-5.
- 381. Fraser, D.; Richard;, P. The kinetics of trypsin digestion. J. Biol. Chem.

1950, *187*, 803–820.

- 382. Olsen, J. V.; Ong, S.E.; Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, *3*, 608–614, doi:10.1074/mcp.T400003-MCP200.
- 383. Biller, J. Die massenspektrometrische Charakterisierung von lebensmittelrelevanten Proteinen und Proteinderivaten mittels HPTLC-MS-Verfahren. 2017.
- 384. Harshadrai, R.; Rohn, S.; Kroll, J. Reactions of selected secondary plant metabolites (glucosinolates and phenols) with food proteins and enzymes -Influence on physico-chemical protein properties, enzyme activity and proteolytic degradation. In *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 4, Hrsg.; 2000; S. 115–142.
- Gross, J. Massenspektrometrie Ein Lehrbuch; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2013; ISBN 9783827429803.
- Biemann, K. Mass spectrometry of peptides and proteins. Annu. Rev. Biochem 1992, 61, 977–1010.
- 387. Roepstorff, P.; Fohlman, P. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 601.
- 388. Chevalier, F.; Chobert, J.; Molle, D.; Haertle, T. Maillard glycation of βlactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait* 2001, *81*, 651–666, doi:10.1002/cber.19580910133.
- 389. Chevalier, F.; Chobert, J.M.; Dalgalarrondo, M.; Haertlé, T. Characterization of the Maillard reaction products of β-lactoglobulin glucosylated in mild conditions. J. Food Biochem. 2001, 25, 33–55, doi:10.1111/j.1745-4514.2001.tb00723.x.
- 390. Petzke, K.J.; Schuppe, S.; Rohn, S.; Rawel, H.M.; Kroll, J. Chlorogenic acid moderately decreases the quality of whey proteins in rats. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3714–3720, doi:10.1021/jf048186z.

10 Anhang

10.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Tabelle 2. Liste der verwendeten Chemikalien mit Einstufung nach VO (EG) 1272/2008.

Substanz	Gefahrensymbole	H-Sätze	P-Sätze	
1,4-Dioxan	02, 08, 07, Gefahr	225, 319, 335,	201, 210,	
		350	305 + 351 + 338,	
			308+313	
2-Butanol	02, 07	226, 319, 335, 336	210,304+340,	
			305 + 351 + 338	
3,3',5,5'-Tetramethyl-	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338	
benzidin				
α -Lactalbumin	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
Aceton	02, 07	225, 319, 336	210, 240,	
			305 + 351 + 338,	
			403 + 233	
Acetonitril	02, 07	225,	$210,\ 280,\ 301{+}312,$	
		302 + 312 + 332,	303 + 361 + 353,	
		319	304 + 340 + 312,	
			305 + 351 + 338	
Ameisensäure	02, 05, 06, Gefahr	226, 302, 314,	210, 280,	
		331	303 + 361 + 353,	
			304 + 340 + 310,	
			305 + 351 + 338	
Ammoniak (25 %)	05, 07, 09	314, 335, 400	261, 271, 273, 280,	
			303 + 361 + 353,	
			305 + 351 + 338	
Ammonium-8-ani-	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
linonaphthalin-1-sul-				
Ionat Bonzylisothiogyanat	07 08 Cofebr	202 215 217	261 264 280	
Denzynsormocyanat	07, 00, Octain	302, 310, 317, 310, 324, 325	201, 204, 200, 301 ± 312	
		513, 554, 555	301 ± 312 , 302 ± 352	
			302 ± 352 , $305 \pm 351 \pm 328$	
Dinatriumhydrogon	Koin Cofebrstoff rom:	SR VO (FC) 1272/20	08	
phosphat	Rem Geramston geman vO (EG) $1272/2008$			
Diospilat	Cofebr	915 919	961 - 201 + 219	
Notriumcolz	Gelalli	515, 516	$201, 301 \pm 312,$ $302 \pm 352, 280$	
Ivatifumsaiz			$302 \pm 352, 200,$ $305 \pm 351 \pm 328$	
Dithiothroitol	07	202 215 210	$300 \pm 301 \pm 351 \pm 320$	
DITUTOTICITOL	UT.	335	$201, 300 \pm 301 \pm 330$	

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze	
Essigsäure	02, 05	226, 314	210, 280,	
-			301 + 330 + 331,	
			303 + 361 + 353,	
			305+351+338	
Ethanol	02, 07	225, 319	210, 240,	
	,	,	305 + 351 + 338,	
			403+233	
Fluorescamin	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
Harnstoff	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
Isoleucin	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
Methanol	02, 06, 08	225.	210, 233, 280,	
	, ,	301 + 311 + 331.	301 + 310.	
		370	303 + 361 + 353.	
			304 + 340 + 311	
N-Acetyl-L-Cystein	Kein Gefahrstoff ger	näß VO (EG) 1272/5	2008	
Natriumchlorid	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008			
Natriumdihydrogen-	Kein Gefahrstoff ger	näß VO (EG) 1272/2	2008	
nhosnhat	Rein Geräniston Sei		2000	
Natriumhydrogencar-	Kein Gefahrstoff ger	näß VO (EG) 1272/'	2008	
bonat	Rein Geräniston ger	100 + 0 + 0 + 12 + 2 + 2	2000	
o-Phthalaldehyd	05 06 09 Cefahr	301 314 317	280	
	00, 00, 0 <i>5</i> , 001am	400	200, $301 \pm 330 \pm 331$	
		400	$301 \pm 350 \pm 351$, $305 \pm 351 \pm 338$	
			$300 \pm 301 \pm 300$, $310 \pm 303 \pm 361 \pm 353$	
Polyovyethylen(20)-	Kein Gefahrstoff ger	näß VO (EC) 1972/'	310, 303⊤301∓333 2008	
sorbitan monolaurat	Rein Gelämston gel	11ab VO (116) 1212/2	2008	
Puridin	02 07	225	210 280 301 ± 312	
Fyridin	02, 01	220, $302 \pm 312 \pm 332$	$210, 200, 501 \pm 512,$ $303 \pm 361 \pm 353$	
		302+312+332, 215 210	$303 \pm 301 \pm 303$, $204 \pm 240 \pm 212$	
		515, 519	304 + 340 + 312, 305 + 351 + 338	
Salzaäuro	05 07	200 214 225	$300 \pm 301 \pm 361 \pm 353$	
Saizsaure	05, 07	290, 514, 555	200, 33+301+333, 205+251+228+210	
T	07	215 210 225	300+301+330+310	
1 ris(nydroxyme-	07	315, 319, 335	201, 300+301+338	
Thyl)aminomethan	07	215 210 225	001 005 - 051 - 000	
Tris-HCI	07	315, 319, 335	261, 305+351+338	
Trypsin	07, 08	315, 319, 334,	261, 280, 284,	
		335	304+340,	
Wasserstoffperoxid		071 000 000	337+313, 342+311	
	03, 05, 07	271, 302+332,	220, 261, 280,	
		314, 335	302+352+310,	
	. –		305+351+338, 312	
Zitronensäure-Mono- hydrat	07	319	280,	
			305 + 351 + 338,	
			337 ± 313	

Eidessstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation "Charakterisierung von Isothiocyanat-modifiziertem α -Lactalbumin - Auswirkungen auf die molekulare Struktur und die biologische Eigenschaften des Proteins" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift