

# Ribonucleosid-Gehalte in Schaf- und Ziegenmilch

Von D. Martin<sup>1</sup>, I. Clawin-Rädecker<sup>1</sup>, P. Chr. Lorenzen<sup>1</sup>, M. Ziebart<sup>1</sup> und K. Barth<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL) Standort Kiel, Postfach 6069, 24121 Kiel

<sup>2</sup> Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Trenthorst

## 1. Einleitung

Ribonucleoside sind minore Komponenten und gehören zur Nicht-Protein-Stickstoff-Fraktion (NPN-Fraktion) der Milch. Sie gelangen als Stoffwechselprodukte des zellulären Ribonucleinsäuren- und Ribonucleotidstoffwechsels in die Milch. Das artenspezifische Gehaltsmuster dieser Milchinhaltstoffe weist offenbar auf die art-spezifische physiologisch-chemische Bedeutung dieser minoren Naturstoffe für das jeweilige Neugeborene hin (1, 2).

In früheren Arbeiten wurden Ribonucleosid-Gehalte u. a. in Kuhmilch im Verlauf der Lactation (3, 4) und auch in wärmebehandelten Kuhmilchproben untersucht: Durch Thermisierung und insbesondere durch Dauererhitzung der Milch werden die natürlicherweise in Rohmilch vorliegenden Gehalte an Cytidin, Guanosen und vor allem an Inosin um ein Mehrfaches erhöht, wohingegen die Adenosin- und Uridin-Gehalte abnehmen. Aus milchwirtschaftlicher Sicht bieten sich daher insbesondere die Ribonucleoside Guanosen und/oder Inosin als chemische Parameter sowohl zum Nachweis einer erfolgten Thermisierung als auch einer Dauererhitzung von Kuhmilch an (5). Weiterhin wurde bei der Wärmebehandlung von Kuhmilch die Bildung des modifizierten Ribonucleosids N6-Methyladenosin (m6Ado) reaktionskinetisch ausgewertet; m6Ado ist ein geeigneter Hitzeindikator zur Beschreibung der Milchwärmebehandlung vom oberen Hoherhitzungsbereich bis zum praxisrelevanten Sterilbereich (5-9).

Bei der Hochdruckbehandlung von Kuhmilch wurden die hochdruckabhängigen Gehaltsveränderungen der unmodifizierten Ribonucleoside Adenosin, Cytidin, Guanosen, Inosin und Uridin bestimmt. In hochdruckbehandelten (500 MPa, 50°C) Rohmilchproben wurden im Vergleich zu den bei Normaldruck temperierten Proben Ribonucleosidfreisetzungen beobachtet, wohingegen Inosin-Gehalte durch Hochdruckeinfluß abnahmen. Durch Aufstockungen mit Ribonucleosid-Monophosphaten wurden diese hochdruckbedingten Ribonucleosidgehaltsveränderungen ebenfalls beobachtet, die nach derzeitigem Kenntnisstand weitestgehend durch enzymatische Aktivität erklärbar sind (10).

Außerdem können die Ribonucleoside Adenosin und Uridin, neben den Parametern pH-Wert und Citronensäure-Gehalt, als Co-Parameter bei der Zuordnung von Butterarten angewendet werden (11-14).

In umfangreichen Experimenten wurden die *in vitro* Effekte von zugesetzten Ribonucleosiden auf Zellkulturmodellsysteme, wie periphere Lymphozyten (PBL), promyelozytischen Leukämiezellen (HL-60) sowie Intestinalzellen (Caco-2) untersucht. Einige Ribonucleoside, wie Adenosin, N6-Methyladenosin (m6Ado), N6-Dimethyladenosin

(m6,2Ado), N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin, N2-Dimethylguanosin zeigten bei der Zell-Linie HL-60 eine deutliche Hemmung der Proliferation bzw. Steigerung der Apoptose. Bei den Zell-Linien PBL und Caco-2 hatten die modifizierten Ribonucleoside N6-Dimethyladenosin und N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin proliferationshemmende bzw. apoptosesteigernde Wirkung (15-17).

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse von Ribonucleosid-Gehaltsbestimmungen in Schaf- und Ziegenrohmilch (Sammelmilchproben) vorgestellt und mit Daten aus Kuhrohmilch-Untersuchungen verglichen. Das art-spezifische Gehaltsmuster dieser minoren Milchinhaltstoffe wird auch durch die Berechnung von Ribonucleosid-Konzentrationsverhältnissen beschrieben und diskutiert. Außerdem werden Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen in den unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Dauererhitzung wärmebehandelten Milchproben der drei Tierarten vorgestellt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch**

Die Schaf- und Ziegenrohmilchproben wurden vom Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Trenthorst, erhalten. Bei diesen im Zeitraum Mai – November 2003 untersuchten Milchproben handelt es sich um Sammelmilchproben (Morgen- und Abendgemelk). Insgesamt wurde die Milch von 19 milchgebenden Schafen (Rasse Ostfriesisches Milchschaaf) und 42 laktierenden Ziegen (Rasse Bunte deutsche Edelziege) erfasst. Die Anzahl, die Probennahmedaten sowie die Fett- und Protein-Gehalte sind in Tab. 1 dargestellt. Für die Dauererhitzungsversuche wurde Kuhsammelmilch (Morgen- und Abendgemelk) der Versuchsstation Schaedtbek der BFEL Standort Kiel verwendet.

### **2.2 Herstellung der dauererhitzten Schaf-, Ziegen- und Kuhmilchproben**

Die jeweiligen Milchproben wurden unter Rühren in einem Metallgefäß mit Hilfe eines Wasserbades auf die entsprechende Temperatur (62°C bzw. 65°C) erwärmt. Danach wurde das Metallgefäß zügig in ein thermostatisierbares, umwälzbares Wasserbad (Julabo MP 13, Julabo, Seelbach) gestellt und unter Rühren (Rührstab RE 16, Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen) konstant bei 62°C für 30 min bzw. bei 65°C für 32 min temperiert. Die Temperaturüberprüfung der Milchproben erfolgte durch einen Datenlogger (Almemo 2290-8 V5, Ahlborn, Holzkirchen). Nach der Dauererhitzung wurden die Versuchsmilchproben mittels Eiswasser auf 20°C abgekühlt und die Proben entnommen.

### **2.3 Bestimmung der Ribonucleosid-Gehalte in Schaf- und Ziegensammelmilchproben und dauererhitzten Milchproben**

Die Bestimmung der Ribonucleosid-Gehalte in den untersuchten Milchproben wurde mit Hilfe eines in der Ribonucleosid-Analytik von Milch und Milchprodukten etablierten Zwei-Säulen-HPLC-Analysensystems ausgeführt. Das Prinzip der chemoselektiven Vorsäule und der Zwei-Säulen-Konfiguration wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (4, 18-22). Die Detektion und Charakterisierung von 9 unmodifizierten und modifizierten Ribonucleosiden erfolgte durch einen Diodenarray-Detektor (Modell L7455, Merck-Hitachi, Darmstadt), die Quantifizierung mit Hilfe eines externen Standards, der folgende Ribonucleoside enthält: Cytidin (Cyd); Uridin (Urd); 1-Methyladenosin (m1Ado); Inosin (Ino); Guanosin (Guo); Adenosin (Ado); N6-Methyladenosin (m6Ado); N6-Carbamoyl-L-

threonyl-adenosin (t6Ado); N6-Dimethyladenosin (m6,2Ado). Das modifizierte Ribonucleosid t6Ado wurde im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BFEL Standort Kiel synthetisiert und charakterisiert (23, 24). Die übrigen aufgelisteten Ribonucleoside wurden käuflich erworben (Sigma, Taufkirchen).

**Tab. 1: Untersuchte Schaf- und Ziegenrohmlchproben (Sammelmilchproben) im Zeitraum Mai – November 2003; Angaben der Probenbezeichnung, der Probenahmedaten sowie der Fett- und Protein-Gehalte der untersuchten Milchproben.**

Schafmilch				Ziegenmilch			
Probenbezeichnung	Probenahmedatum	Fett-Gehalt [%]	Protein-Gehalt [%]	Probenbezeichnung	Probenahmedatum	Fett-Gehalt [%]	Protein-Gehalt [%]
S 1	03., 04.06.03	6,83	4,34	Z 1	26.05.03	3,50	3,55
S 2*	01., 02.07.03	3,16	3,18	Z 2	03., 04.06.03	2,91	3,00
S 3	15., 16.07.03	5,39	4,88	Z 3	01., 02.07.03	2,68	2,93
S 4	12., 13.08.03	2,76	4,56	Z 4	15., 16.07.03	2,60	2,34
S 5	26., 27.08.03	5,65	5,02	Z 5	12., 13.08.03	2,88	2,58
S 6	09., 10.09.03	5,63	5,40	Z 6	26., 27.08.03	2,45	2,63
S 7*	23., 24.09.03	3,14	3,27	Z 7	09., 10.09.03	2,53	2,43
S 8	07., 08.10.03	7,14	3,35	Z 8	23., 24.09.03	2,60	2,52
				Z 9	07., 08.10.03	3,01	2,78
				Z10	21., 22.10.03	-**	-**
				Z 11	05., 06.11.03	-	-

\*: Proben wurden im Sammel-tank durch geringe Mengen Restwasser verwässert.

\*\* : Fett- und Protein-Gehalte konnten wegen zu geringer Probenvolumina nicht bestimmt werden.

## 2.4 Bestimmung der Fett- und Protein-Gehalte

Die Fett- und Protein-Gehalte der untersuchten Schaf- und Ziegensammelrohmlchproben wurden nach den im VDLUFA-Methodenbuch beschriebenen Verfahren nach Roese-Gottlieb und nach Kjeldahl (Faktor 6,38) bestimmt.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Ribonucleosid-Gehalte in Schafrohmlch

In den untersuchten Sammel-milchproben fallen die relativ hohen Gehalte der unmodifizierten Ribonucleoside Urd und Ino auf (Tab. 2) und dass Urd in etwa 10-fach höherer Konzentration vorliegt als Cyd. Bei den unmodifizierten Purinnucleosiden Ino, Guo und Ado sind die Konzentrationen ebenfalls sehr unterschiedlich ausgeprägt. Die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado liegen im Vergleich zu den übrigen erfassten Ribonucleosiden in den geringsten Konzentrationen vor. Nur in drei Sammel-milchproben wurde das modifizierte Ribonucleosid m6Ado nachgewiesen, m6,2Ado wurde nicht detektiert.

Zur Darstellung der Streuung der Ribonucleosid-Messwerte in den untersuchten Sammelmilchproben wurden die Variationskoeffizienten berechnet (Tab. 2): Ado mit rd. 57 % und Cyd mit rd. 43 % zeigen die größten Streuungen auf, die geringsten Streuungen wurden für das modifizierte Ribonucleosid t6Ado sowie für Ino und m1Ado berechnet.

Bei der Auftragung der bestimmten Ribonucleosid-Gehalte in Abhängigkeit vom Probennahmedatum (Abb. 1) fällt auf, dass bei den beiden letzten Proben S7 und S8 die höchsten Gehalte an Urd und Ino vorliegen; ob diese Konzentrationszunahmen mit der Beendigung der Lactationsphase zusammenhängt oder aber jahreszeitlich bzw. durch Fütterung beeinflusst wird, kann anhand dieser untersuchten Sammelmilchproben nicht eindeutig beantwortet werden. Ebenso ist der Grund der Abnahme der Ino-Gehalte in den Proben S1 bis S6 nicht eindeutig zu klären (Abb. 2).

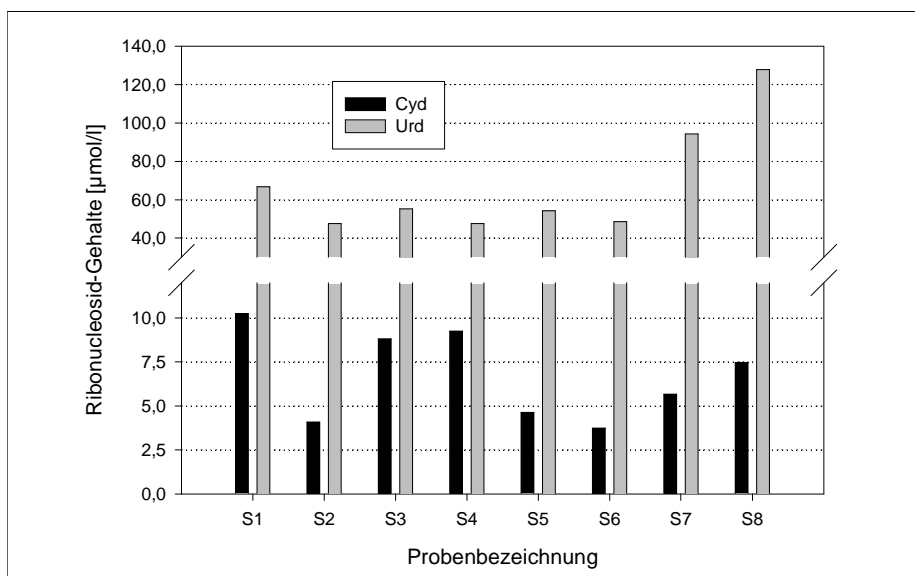
**Tab. 2: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Schafmilchproben (Sammelmilch), Angabe der Mittelwerte, der minimal bzw. maximal bestimmten Werte sowie der Variationskoeffizienten im Zeitraum Juni – Oktober 2003**

Schaf	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
$\mu\text{mol/l}$									
<b>Mittelwert</b>	<b>6,74</b>	<b>67,78</b>	<b>1,37</b>	<b>41,21</b>	<b>2,06</b>	<b>8,77</b>	<b>0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,71</b>	<b>n. n.</b>
min-max (n = 8)	3,73- 10,25	47,58- 127,84	0,76- 1,89	25,19- 58,26	1,00- 3,64	3,54- 18,99	0,00- 0,11	0,41- 1,07	-
VK [%] <sup>b</sup>	37,69	42,59	29,45	28,50	36,30	57,21	- <sup>c</sup>	26,28	-

a: m6Ado wurde nur in 3 Schafmilch-Proben nachgewiesen

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der Streuung der Messwerte.

c: Der aus den 3 Schafmilch-Proben berechnete VK beträgt 190,49 %.



**Abb. 1: Cyd- und Urd-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Schafmilchproben (Sammelmilchproben) im Verlauf des Probennahmezeitraums (s. a. Tab. 1).**

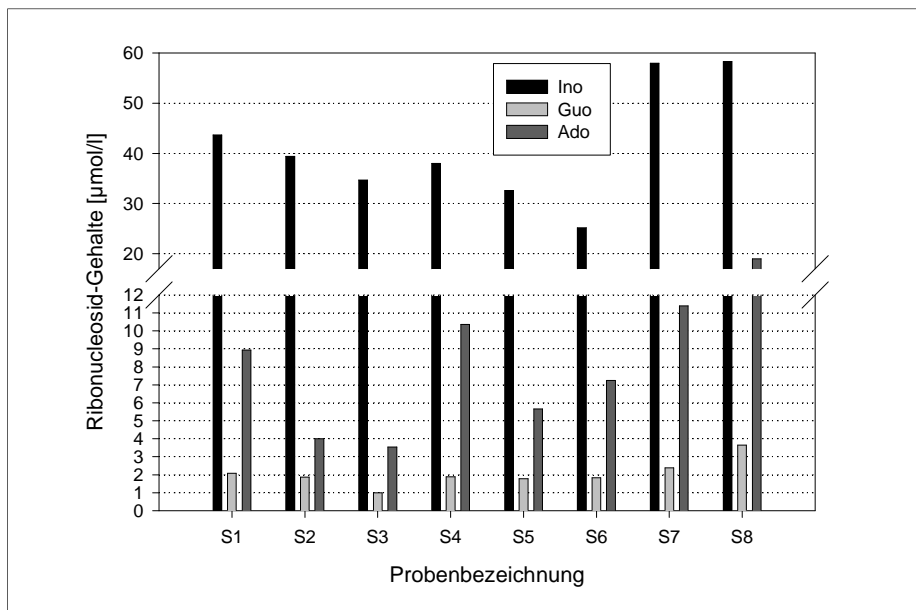


Abb. 2: Ino-, Guo- und Ado-Gehalte [µmol/l] in Schafmilchproben (Sammelmilchproben) im Verlauf des Probenahmezeitraums (s. a. Tab. 1).

### 3.2 Ribonucleosid-Gehalte in Ziegenrohmlch

Auch in den untersuchten Ziegensammelmilchproben fallen, wie in den Schafsammlmilchproben, die relativ hohen Gehalte an den unmodifizierten Ribonucleosiden Cyd und Ino auf (Tab. 3). In Ziegenmilch liegt Urd in einer etwa 9-fach höheren Konzentration vor als Cyd. Bei den unmodifizierten Purinnucleosiden Ino, Guo und Ado sind die Konzentrationen ebenfalls sehr verschieden ausgeprägt, so liegt Ino in einer ca. 20-fach höheren Konzentration vor als Guo bzw. in einer ca. 25-fach größeren Konzentration vor als Ado. Die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado liegen im Vergleich zu den übrigen erfassten Ribonucleosiden in den geringsten Konzentrationen vor. m6Ado und auch m6,2Ado wurden in den Ziegenmilchproben nicht nachgewiesen.

In den untersuchten Sammelmilchproben zeigt Cyd die höchste Streuung der Messwerte auf (rd. 57%). Wie schon in den Schafmilchproben beobachtet, zeigen auch in Ziegenmilchproben die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado relativ geringe Variationskoeffizienten auf. Außerdem wurde auch für Guo eine relativ geringe Messwertestreuung erhalten.

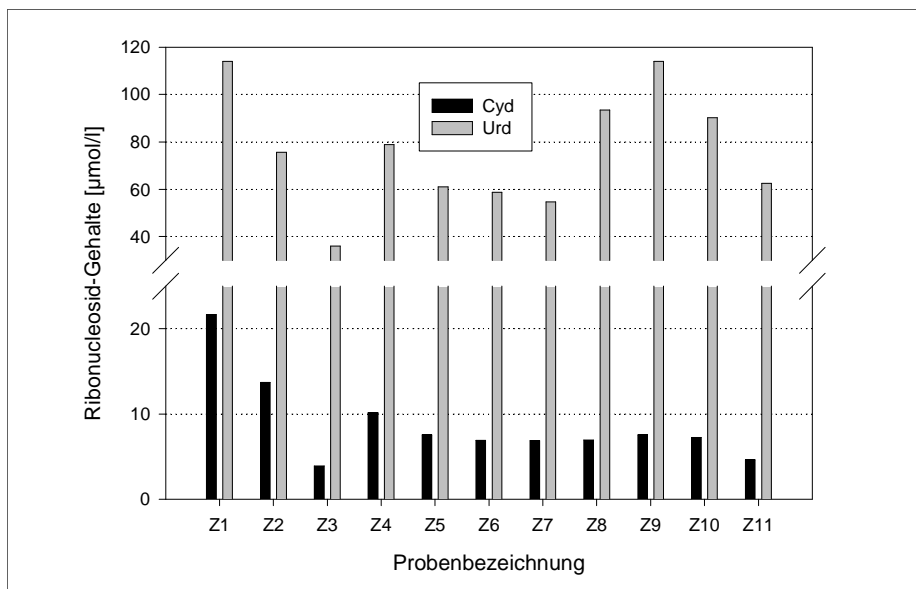
Bei der Auftragung der bestimmten Ribonucleosid-Gehalte in Abhängigkeit vom Probenahmedatum (Abb. 3, 4) ist kein eindeutiger Trend, d. h. eine Konzentrationszunahme bzw. Abnahme im Verlauf der untersuchten Lactationsphase zu beobachten. Bei diesen graphischen Darstellungen fällt bei Ino eine Konzentrationsabnahme in den Proben Z1 bis Z3, hierauf folgend eine Zunahme in Probe Z4, danach wieder abfallend bis Probe Z7, dann wieder eine Zunahme in Probe Z8 und eine Konzentrationsabnahme bis Probe Z11 auf. Ob dieser auffällige Konzentrationsverlauf zufällig ist, bleibt unbeantwortet und sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

**Tab. 3:** Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Ziegenrohmlchproben (Sammelmilch), Angabe der Mittelwerte und der minimal bzw. maximal bestimmten Werte im Zeitraum Mai – November 2003

Ziege	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
$\mu\text{mol/l}$									
<b>Mittelwert</b>	<b>8,83</b>	<b>76,27</b>	<b>0,90</b>	<b>60,64</b>	<b>2,89</b>	<b>2,40</b>	<b>n. n.<sup>a</sup></b>	<b>0,59</b>	<b>n. n.</b>
min-max (n = 11)	3,89- 21,68	35,96- 114,03	0,60- 1,21	35,84- 84,88	1,99- 3,61	1,81- 3,80	-	0,34- 0,75	-
VK [%] <sup>b</sup>	56,60	32,57	17,11	26,30	17,45	23,66	-	18,85	-

a: n. n. : nicht nachweisbar

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der Streuung der Messwerte.



**Abb. 3:** Cyd- und Urd-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Ziegenrohmlchproben (Sammelmilchproben) im Verlauf des Probennahmezeitraums (s. a. Tab. 1)

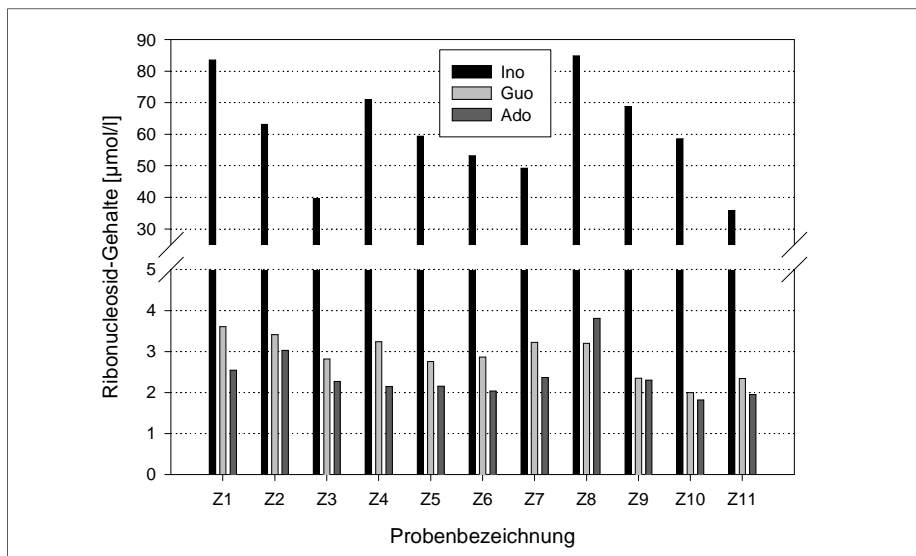


Abb. 4: Ino-, Guo- und Ado-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Ziegenrohmlchproben (Sammelmilchproben) im Verlauf des Probenahmezeitraums (s. a. Tab. 1)

### 3.3 Vergleich der Ribonucleosid-Gehalte in Schaf-, Ziegen- und Kuhrohmlch

In früheren Arbeiten von RAEZKE, OTT und SCHLIMME wurden unter Anwendung des Ribonucleosid-Zwei-Säulen-HPLC-Analysensystems Ribonucleosid-Gehalte in Kuhmilchproben im Verlauf der Lactation bestimmt. In diesen umfangreichen Untersuchungen wurde u. a. gezeigt, dass im Verlauf der Kolostralphase die Ribonucleosid-Gehalte abnehmen. Die Gehalte der nichtmodifizierten Ribonucleoside Ado, Cyd, Guo, Ino und Urd sind etwa 3 Wochen post partum relativ konstant, wohingegen die modifizierten Ribonucleoside m6Ado und t6Ado bereits nach einer Woche post partum in relativ konstanten Konzentrationen vorliegen (3, 4).

In den untersuchten Schaf- und Ziegenrohmlchproben (Tab. 2, 3) sind die jeweiligen Kolostralphasen nicht erfasst; zum Vergleich wurden daher die Ribonucleosid-Gehalte in Kuhrohmlchproben (Sammelmilch,  $n = 8$ ) ausschließlich der ersten 3 Wochen post partum aufgeführt (Tab. 4): Die unmodifizierten Pyrimidin-Ribonucleoside Urd und Cyd liegen mit den größten Konzentrationen vor, gefolgt von den unmodifizierten Purinribonucleosiden Ado, Ino und Guo. Der Hitzeindikator m6Ado sowie das modifizierte Ribonucleosid m6,2Ado konnten bislang in Kuhrohmlch nicht nachgewiesen werden. Bei Ado und Ino liegen die größten Messwertestreuungen vor, bei den modifizierten Ribonucleosiden m1Ado und t6Ado hingegen die geringsten.

Beim Vergleich der in den Tabellen 2-4 enthaltenen Daten fällt auf, dass in den untersuchten Schaf- und Ziegenrohmlchproben im Mittel höhere Gehalte an unmodifizierten Ribonucleosiden bestimmt wurden als in Kuhrohmlch, insbesondere bei Ino, Cyd und Urd. Bei den modifizierten Ribonucleosiden m1Ado und t6Ado sind die Unterschiede, insbesondere bei t6Ado, wesentlich geringer ausgeprägt. Hinsichtlich der Messwertestreuung, dargestellt durch die jeweiligen Variationskoeffizienten, bleibt festzuhalten, dass in den Sammelmilchproben aller drei Tierarten – mit Ausnahme von Ino bei Schaf und Guo bei Ziege – die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado die geringsten Streuungen zeigen.

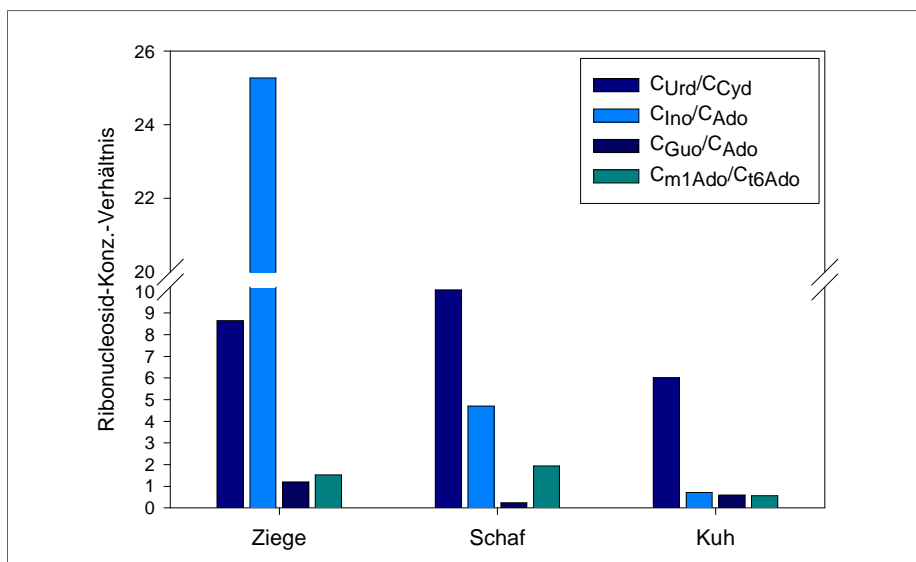
Um die unterschiedlichen Ribonucleosid-Gehaltsmuster der untersuchten Schaf- und Ziegenrohml Milchproben im Vergleich zu den Kuhrohml Milchproben darzustellen, wurden die Konzentrationsverhältnisse der Pyrimidin- und Purinribonucleoside untereinander berechnet (Abb. 5): Bei den aus den Mittelwerten (Tab. 2-4) berechneten Konzentrationsverhältnissen ist zu erkennen, dass das Verhältnis  $C_{Ino}$  zu  $C_{Ado}$  in Ziegenrohml Milch bei ca. 25,3 liegt, in Schafrohml Milch bei ca. 4,7 und in Kuhrohml Milch bei 0,7. Auffällig sind auch die Unterschiede bei  $C_{Guo}$  zu  $C_{Ado}$  in den Rohml Milchproben von Schaf, Ziege und Kuh und die Tatsache, dass in Schaf- und Ziegenml Milch höhere Konzentrationen an m1Ado im Vergleich zu t6Ado vorliegen, in Kuhml Milch hingegen liegt t6Ado in höherer Konzentration vor.

**Tab. 4: Ribonucleosid-Gehalte [ $\mu\text{mol/l}$ ] in Kuhrohml Milchproben (Sammelmilch), Angabe der Mittelwerte und der minimal bzw. maximal bestimmten Werte über eine gesamte Lactationsperiode ausschließlich der ersten 3 Wochen post partum. Daten aus (3)**

Kuh	Cyd	Urd	m1Ado	Ino	Guo	Ado	m6Ado	t6Ado	m6,2Ado
$\mu\text{mol/l}$									
<b>Mittelwert</b>	<b>2,44</b>	<b>14,69</b>	<b>0,40</b>	<b>0,97</b>	<b>0,82</b>	<b>1,36</b>	n. n. <sup>a</sup>	<b>0,71</b>	n. n.
min-max (n = 8)	0,53- 10,76	3,63- 68,22	0,17- 1,58	0,01- 3,25	0,10- 2,22	0,06- 3,93	-	0,40- 3,40	-
VK [%]	31,90	32,22	19,56	43,86	38,71	49,28	-	19,25	-

a: n. n. : nicht nachweisbar

b: Variationskoeffizient zur Beschreibung der Streuung der Messwerte.



**Abb. 5:** Aus Mittelwerten ( $[\mu\text{mol/l}]$ , Daten s. Tab. 2-4) berechnete Ribonucleosid-Konzentrationsverhältnisse in Ziegen-, Schaf- und Kuhrohml Milch.



### 3.4 Prozentuale Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen bei der Dauererhitzung in Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch

Bei der Dauererhitzung von Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch wurden die durch die Milchverordnung (25) vorgegebene Untergrenze (62°C/30 min) und Obergrenze (65°C/32 min) berücksichtigt. Zum Vergleich der drei Säugermilchproben wurden die prozentualen Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen angegeben (Tab. 5): Auffallend sind bei allen Proben die Gehaltsabnahmen bei Ado und in Kuhmilch die sehr starken Gehaltszunahmen bei Ino und Guo, die auch in einer früheren Untersuchung bei diesen beiden Ribonucleosiden bei der Dauererhitzung von Kuhmilch beobachtet wurden (5). Nach derzeitigem Kenntnisstand werden Ribonucleoside erst bei höherer thermischer Belastung chemisch strukturell verändert (6-9, 26), so dass die bei der Dauererhitzung beobachteten Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen wahrscheinlich durch enzym-gesteuerte Umsetzungen verursacht werden.

Bei den Dauererhitzungsexperimenten kamen hinsichtlich der absoluten Gehalte in den jeweiligen Ausgangsmilchproben sehr unterschiedliche Konzentrationen vor (Angaben von gerundeten Mittelwerten; Differenzen zu prozentualen Werten sind durch Rundungen bedingt): So lag Guo in der Kuhmilch mit 0,08 µmol/l (Ino: 0,07 µmol/l), in der Schafmilch mit 5,4 µmol/l (Ino: 164,5 µmol/l) und in Ziegenmilch mit 4,0 µmol/l (Ino: 68,5 µmol/l) vor. In den Kuhmilchproben entsprechen die aufgeführten prozentualen Gehaltsveränderungen absoluten Gehaltsveränderungen von +1,4 µmol/l Guo (+1,6 µmol/l Ino); bei den Schafmilchproben wurden absolute Gehaltsveränderungen von +0,6 µmol/l Guo (+15 µmol/l Ino) bestimmt. Bei den Ziegenmilchproben liegen die Veränderungen bei Guo bei +0,9 µmol/l und bei Ino bei = -0,3 µmol/l. Eventuell haben in den Schaf- und Ziegen-Ausgangsmilchproben bereits vor den Dauererhitzungsversuchen enzymatische Umsetzungen, wie z. B. Dephosphorylierung von Ribonucleosid-Monophosphaten (Ribonucleotiden) zu Ribonucleosiden stattgefunden. Das Milchenzym Adenosindesaminase (ADA, EC 3.5.4.4) setzt in einer oxidativen Desaminierung Ado zu Ino um (5, 27-30). In Schaf- und Ziegenrohmlch wurden höhere ADA-Aktivitäten bestimmt als in Kuhrohmlch (31). Über die ADA-Aktivität können die Ado-Gehaltsabnahmen im Verlauf der Dauererhitzung erklärt werden; warum jedoch dann in Ziegenmilch keine Ino-Gehaltszunahmen bestimmt wurde, ist noch ungeklärt.

**Tab. 5: Prozentuale Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen in dauererhitzten (DE) Ziegenmilch-, Schafmilch- und Kuhmilchproben**

Nucleosid	Ziegenmilch		Schafmilch		Kuhmilch	
	DE 1 <sup>a</sup>	DE 2 <sup>b</sup>	DE 1	DE 2	DE 1	DE 2
<b>Cyd</b>	+107	+53	-4	-1	+171	+176
<b>Urd</b>	+31	+17	+17	+19	+3	+4
<b>m1Ado</b>	-2	+3	+1	+22	-9	-16
<b>Ino</b>	±0	±0	+9	±0	+2538	+2481
<b>Guo</b>	+24	+7	+7	+11	+1802	+1820
<b>Ado</b>	-57	-85	-86	-95	-48	-52
<b>m6Ado</b>	n. n. <sup>c</sup>	n. n.	n. a. <sup>d</sup>	n. a.	n. n.	n. n.
<b>t6Ado</b>	+24	+41	+40	-15	+85	+82
<b>m6,2Ado</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

a: DE 1: Dauererhitzung 62°C/30 min (Untergrenze); b: DE 2: Dauererhitzung 65°C/32 min (Obergrenze); c: n. n.: nicht nachweisbar; d: n. a.: nicht auswertbar, da eindeutige Peakzuordnung nicht möglich

Abschließend bleibt festzustellen, dass insbesondere anhand der unmodifizierten Ribonucleoside die art-spezifischen Gehaltsmuster von Ziegen-, Schaf- und Kuhroh-milch deutlich erkennbar sind. Eine Unterscheidung von Rohmilchproben dieser drei Tierarten ist daher durch Ribonucleosid-Gehaltsbestimmungen möglich. Die bei den Dauererhitzungsexperimenten erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die auffälligen, ther-misch bedingten starken Gehaltszunahmen von Ino und Guo in Kuhmilch ein Indikator für die Anwesenheit von Kuhmilch in Schaf- oder Ziegenmilch sein könnten. Praktische Untersuchungen hierzu sollten diese theoretische Überlegung jedoch noch unterstützen.

#### 4. Literatur

- (1) Schlimme, E., Martin, D., Meisel, H.: Brit. J. Nutr. 84, Suppl. 1, S59-S68 (2000).
- (2) Voet, D., Voet, J. G.: Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1994).
- (3) Raetzke, K.-P., Schlimme, E.: Z. Naturforsch. **45 c**, 655-662 (1990).
- (4) Schlimme, E., Raetzke, K.-P., Ott, F.-G.: Z. Ernährungswiss. **30** 138-152 (1991).
- (5) Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: Nahrung/Food **41** 258-267 (1997).
- (6) Ott, F.-G., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **43** (3) 213-217 (1991).
- (7) Schlimme, E., Ott, F.-G., Kiesner, C.: Int. Dairy Journal **4** 617-627 (1994).
- (8) Schlimme, E., Ott, F.-G., Kiesner, C., Biewendt, H. G.: IDF Special Issue 9303 52-66 (1994).
- (9) Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **47** (1) 75-86 (1995).
- (10) Martin, D., Lorenzen, P. Chr., Schwertfeger, M., Buchheim, W., Schlimme, E.: Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsberichte **53** (4) 283-293 (2001).
- (11) Schlimme, E., Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Thormählen, K.: Milchwissenschaft **51** (3) 139-143 (1996).
- (12) Schlimme, E., Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Meisel, H., Thormählen, K.: Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsberichte **49** (2) 135-146 (1997).
- (13) Meisel, H., Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Schlimme, E.: Nahrung/Food **41** 75-80 (1997).
- (14) DIN 10474 „Bestimmung der Buttersorte durch neuronale Netzanalyse kompositioneller Para-meter – Chemometrisches Verfahren“, Deutsches Institut für Normung, Berlin (2003).
- (15) Meisel, H., Günther, S., Martin, D., Schlimme, E.: FEBS Letters **433** 265-268 (1998).
- (16) Meisel, H., Hartmann, R., Martin, D., Schlimme, E.: Nahrung/Food **43** 213-215 (1999).
- (17) Hartmann, R., Günther, S., Martin, D., Meisel, H., Pentzien, A.-K., Schlimme, E., Scholz, N.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **52** (1) 61-85 (2000).
- (18) Boos, K.-S., Wilmers, B., Sauerbrey, R., Schlimme, E.: Ger. Pat., P 361 7805.5 (1986)
- (19) Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E., Sauerbrey, R.: J. Chromatogr. **456** 93-104 (1988).
- (20) Raetzke, K.-P., Wilmers, B., Boos, K.-S., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungs-berichte **40** (1) 53-62 (1988).
- (21) Raetzke, K.-P., Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E.: Milchwissenschaft **43** 224-229 (1988).
- (22) Schlimme, E., Boos, K.-S.: Journal of Chromatography Library, Vol. **45c** C115-C145 (1990).
- (23) Chheda, G. B., Hong, C. I.: J. Med. Chem. **14** 748-753 (1971).
- (24) Martin, D., Schlimme, E.: Z. Naturforsch. **49c** 834-842 (1994).
- (25) Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchba-sis (Milchverordnung) vom 20.07.2000 in: Loos, H., Nebe, T.: Das Recht der Milchwirtschaft in der Bundesrepublik Deutschland, Band V, S. 27-28. Behr's Verlag, Hamburg (172. Aktualisierungslieferung v. 15.11.2004).
- (26) Martin, D., Schlimme, E.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
- (27) Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P. Chr., Martin, D.: Bulletin of the IDF **No. 332** 25-31 (1998).
- (28) Martin, D., Kiesner, C., Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungs-berichte **50** (3) 225-233 (1998).
- (29) Martin, D., Lorenzen, P. Chr., Kiesner, C., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche For-schungsberichte **51** (4) 343-355 (1999).
- (30) Martin, D., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54** (4) 305-315 (2002).
- (31) Martin, D. et al., Publikation in Vorbereitung.

## 5. Zusammenfassung

Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Lorenzen, P. Chr., Ziebart, M., Barth, K.: **Ribonucleosid-Gehalte in Schaf- und Ziegenmilch**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (1) 21-32 (2005)

### 24 Ribonucleosid-Gehalte (Schafmilch, Ziegenmilch, Wärmebehandlung)

Ribonucleoside gehören als minore Inhaltsstoffe zur NPN-Fraktion der Milch. Ribonucleosid-Muster in Kuhmilch wurden im Verlauf der Lactation in früheren Untersuchungen bestimmt. Außerdem wurden Ribonucleosid-Gehalte und deren Veränderungen bei der Wärmebehandlung von Kuhmilch nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit werden die Gehalte von 9 unmodifizierten und modifizierten Ribonucleosiden in Sammelmilchproben von Schaf- und Ziegenrohmlch über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten vorgestellt. Weiterhin wurden Rohmilchproben von Kuh, Schaf und Ziege unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Dauererhitzung wärmebehandelt und die prozentualen Ribonucleosid-Gehaltsveränderungen berechnet. In den Rohmilchproben von Schaf und Ziege liegen wesentlich höhere Gehalte an unmodifizierten Ribonucleosiden vor als in Kuhrohmlch. Die über Variationskoeffizienten berechnete Messwertestreuung zeigt, dass modifizierte Ribonucleoside mit einer geringeren Streuung vorliegen als die meisten unmodifizierten Ribonucleoside. Auch durch die Berechnung von Ribonucleosid-Konzentrationsverhältnissen werden die tierart-spezifischen Gehaltsmuster deutlich. Bei der Dauererhitzung wurden in den Milchproben der drei Tierarten Gehaltsabnahmen bei Adenosin bestimmt, nur in Kuhmilch wurden sehr starke Gehaltszunahmen bei Inosin und Guanosin gefunden. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse bieten sich die Bestimmungen der Ribonucleosid-Gehalte zur Unterscheidung von Kuh-, Schaf- und Ziegenrohmlch an.

## Summary

Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Lorenzen, P. Chr., Ziebart, M., Barth, K.: **Ribonucleoside contents in sheep and goat milk**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (1) 21-32 (2005).

### 24 Contents of ribonucleosides (sheep milk, goat milk, heat treatment)

Ribonucleosides belong as minor constituents to the non-protein-nitrogen fraction of milk. In former studies ribonucleoside patterns were determined in bovine milk in relation to the lactation time. Furthermore, ribonucleoside contents and the changes occurring during heat treatment of cow milk were recorded. In the present work, the contents of 9 unmodified and modified ribonucleosides in bulk milk samples from sheep and goat raw milk over a period of approx. 6 months are being presented. In addition, raw milk samples from cow, sheep and goat were heat treated under the temperature time conditions of holder pasteurization, and the percentage of the changes in ribonucleoside contents computed. Considerably higher contents of unmodified ribonucleosides were detected in the raw milk samples from sheep and goat than in those from cows. The variability of measured data computed via variation coefficients shows that modified ribonucleosides occurred in a lower variability than most of the unmodified ribonucleosides. The animal species-specific patterns of ribonucleoside contents were also identified by calculation of ribonucleoside concentration ratios. During holder pasteurization, a decrease of the

adenosine content was determined in the milk samples of the three animal species. However, in cow's milk a strong increase of the inosine and guanosine content was found. The obtained results display that the determination of the ribonucleoside contents is suited for differentiation of raw milk from cow, sheep and goat.

### Résumé

Martin, D., Clawin-Rådecker, I., Lorenzen, P. Chr., Ziebart, M., Barth, K.: **Teneurs en ribonucléosides dans du lait ovin et caprin**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (1) 21-32 (2005)

### 24 Teneurs en ribonucléosides (lait de brebis, lait de chèvre, traitement thermique)

En tant que composants mineurs, les ribonucléosides appartiennent à la fraction azote non protéinique du lait. Dans des études antérieures, les schémas ribonucléosides étaient déterminés dans du lait de vache pendant la période de lactation. En plus, les teneurs en ribonucléosides et les changements subis lors du traitement thermique du lait de vache étaient identifiées. L'étude actuelle présente les teneurs de 9 ribonucléosides non-modifiés et modifiés dans des échantillons de lait en vrac prélevés dans du lait cru ovin et caprin pour une période d'environ 6 mois. En plus, les échantillons de lait cru de vache, de brebis et de chèvre ont été soumis à un traitement thermique sous des conditions température-temps de la pasteurisation basse, et les changements en pourcentage de la teneur en ribonucléosides ont été enregistrés. Dans les échantillons de lait cru de brebis et de chèvre, on a identifié des teneurs en ribonucléosides nettement plus élevées que dans du lait cru de vache. La variabilité des données mesurées moyennant des coefficients de variation révèle que la variabilité des ribonucléosides modifiés est inférieure à celle de la plupart des ribonucléosides non-modifiés. De même, le calcul du rapport de concentration en ribonucléosides permet d'identifier le schéma de la teneur en ribonucléosides, spécifique de l'espèce. Pendant la pasteurisation basse, une réduction de la teneur en adénosine a été relevée dans les échantillons de lait des trois espèces d'animaux. Uniquement dans les échantillons de lait de vache, une forte augmentation de la teneur en inosine et guanosine a été constatée. Les résultats obtenus démontrent que la détermination des teneurs en ribonucléosides est bien appropriée pour différencier entre le lait cru de vache, de brebis et de chèvre.