

Kinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung des 1-Methyladenosins in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen des Sterilbereichs

Von D. Martin¹, C. Kiesner² und E. Schlimme¹

Institut für Chemie und Physik¹ und Institut für Verfahrenstechnik² der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

1. Einleitung

Ribonucleoside sind niedermolekulare minore Inhaltsstoffe der Milch (1-6). Sie zeigen ein artentypisches Muster (2-5). Neben Adenosin, Cytidin, Guanosin, Inosin und Uridin (1-5) wurden modifizierte Ribonucleoside wie 1-Methyladenosin und N6-Carbamoyl-L-threonyladenosin sowohl in Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch (3,4) als auch in Humanmilch (2,5,6) nachgewiesen. Aus Longitudinalstudien ist bekannt (3,4), daß - mit Ausnahme der Kolostralphase - in reifer boviner Sammelmilch der Spiegel an 1-Methyladenosin stabil um 0,40 µmol/l liegt. Aus diesem Grunde ist N6-Methyladenosin, das thermische Umlagerungsprodukt von 1-Methyladenosin, das in Rohmilch nicht vorliegt, ein geeigneter chemischer Prozeßparameter zur Untersuchung der Wärmebelastung von Milch (7,8). Nach Berichten über reaktionskinetische Untersuchungen im Bereich der Ultraheißerhitzung (8) wird in der vorliegenden Arbeit über die reaktionskinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin in Milch im Sterilbereich berichtet.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung der Sterilmilchproben

Für die Herstellung der Sterilmilchproben wurde Sammelmilch von verschiedenen Tagen der Versuchsstation Schaedtбек der Bundesanstalt für Milchforschung verwendet. Zur Einstellung des Fettgehaltes wurde Rohmilch auf 40°C erwärmt und mittels einer Tellerzentrifuge (Westfalia-Separator, Oelde) separiert. Anschließend wurde die auf 3,5 % Fettgehalt eingestellte Milch unter molkereiüblichen Bedingungen bei ca. 70°C homogenisiert und danach im Wasserbad auf 20°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde die Versuchsmilch in Glasflaschen abgefüllt, diese sofort mit Kronenkorken verschlossen und im Autoklaven (Stock, Neumünster) verschiedenen definierten Temperatur-Zeit-Bedingungen des Sterilbereichs unterworfen. Die Temperaturmessung zur Bestimmung der Effektivität des Sterilisationsprozesses (Berechnung der F_0 -Werte) erfolgte über zwei Thermoelemente, die in präparierten Probenflaschen verschraubt waren. Nach Beendigung der jeweiligen Autoklavenversuche wurden die erhaltenen Sterilmilchen auf +5°C gekühlt. Zur Probenvorbereitung für die Ribonucleosidanalyse wurden die thermisch behandelten Milchen mit konzentrierter Ameisensäure (Merck, Darmstadt) auf pH 3,5 angesäuert, zentrifugiert und die erhaltenen Seren durch Membranfiltration (0,2 µm; ASMT, Enger) für die liquidchromatographischen Analysen gereinigt. Die erhaltenen Milchseren wurden bis zur Analyse bei -21°C gelagert.

2.2 Nachweis der Ribonucleoside in den Sterilmilchproben

Der qualitative und quantitative Nachweis von Ribonucleosiden erfolgte mittels eines Zweisäulen-HPLC-Analysators (9). Die systeminterne Konfiguration erlaubt die chemo-selektive kovalente Bindung der in 2',3'-Position befindlichen ribosidischen Hydroxy-

gruppen und damit eine direkte Analyse aus unterschiedlichen biologischen Matrices (9-13), so auch aus den in dieser Arbeit untersuchten Sterilmilchseren.

1-Methyladenosin (m1Ado) und N6-Methyladenosin (m6Ado) sowie Cytidin (Cyd), Uridin (Urd), Inosin (Ino), Guanosin (Guo) und Adenosin (Ado) wurden von Sigma Chemie, Deisenhofen, bezogen. Das hypermodifizierte Ribonucleosid N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosin (L-t6Ado) wurde im Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchforschung synthetisiert. Die quantitative Bestimmung der Nucleoside erfolgte mittels der externen Standard-Methode (9). Zur Detektion wurden ein UV-Detektor (UV-Detektor 655A-22, Merck-Hitachi, Darmstadt) und ein Photodiodearray-Detektor (Modell 994, Waters-Millipore, Eschborn) verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von m6Ado (3 pmol/Analyse bzw. 6 pmol/Analyse, bei einem Aufgabevolumen von 100 µl Serum) wurde bereits in einer vorhergehenden Arbeit beschrieben (7).

2.3 Berechnung reaktionskinetischer und prozeßtechnischer Parameter

Die Bestimmung der Reaktionsordnung der Dimroth-Umlagerung von m1Ado zu m6Ado erfolgte durch Auftragen von $\log(c_{A0} - c_{Bt})$ (c_{A0} = Ausgangskonzentration an m1Ado, Heißhaltezeit $t = 0$ s; c_{Bt} = Konzentration an m6Ado nach einer bestimmten Heißhaltezeit t), d.h. des nicht umgelagerten m1Ado, über die entsprechende äquivalente Heißhaltezeit t (s) bei konstanter Erhitzungstemperatur (Prozeßtemperatur). Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurden gemäß (14) die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k und die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ berechnet. Die Berechnung der Dezimalreduktionswerte (D-Werte) erfolgte gemäß der Gleichung $D = 2,303/k$; die Bestimmung des z-Wertes ($^{\circ}\text{C}$) wurde gemäß (15) durch Auftragen von $\log D$ über die entsprechende Prozeßtemperatur ($^{\circ}\text{C}$) vorgenommen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Hitzeinduzierte Umlagerung des Milchnucleosids m1Ado zu m6Ado

Die Dimroth-Umlagerung des originären Nucleosids m1Ado unter alkalischen Bedingungen wurde von Brookes und Lawley beschrieben (16). Macon und Wolfenden beobachteten, daß die Umlagerung auch im neutralen Milieu abläuft (Abb. 1), wobei bis zu einem pH-Wert von 8 die Umlagerung am protonierten m1Ado stattfindet (17). Die Bildung von m6Ado in thermisch behandelten Milchen wurde erstmals von Ott und Schlimme nachgewiesen (7). Die liquidchromatographische Analyse der Ribonucleoside m1Ado und m6Ado von Milchen aus dem Ultrahoherhitzungsbereich und die daraus berechneten reaktionskinetischen Parameter bewiesen, daß die Dimroth-Umlagerung unter UHT-Erhitzungsbedingungen nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft, und m6Ado als Hitzeindikator zur Charakterisierung der oberen Grenze des UHT-Erhitzungsbereichs geeignet ist (8).

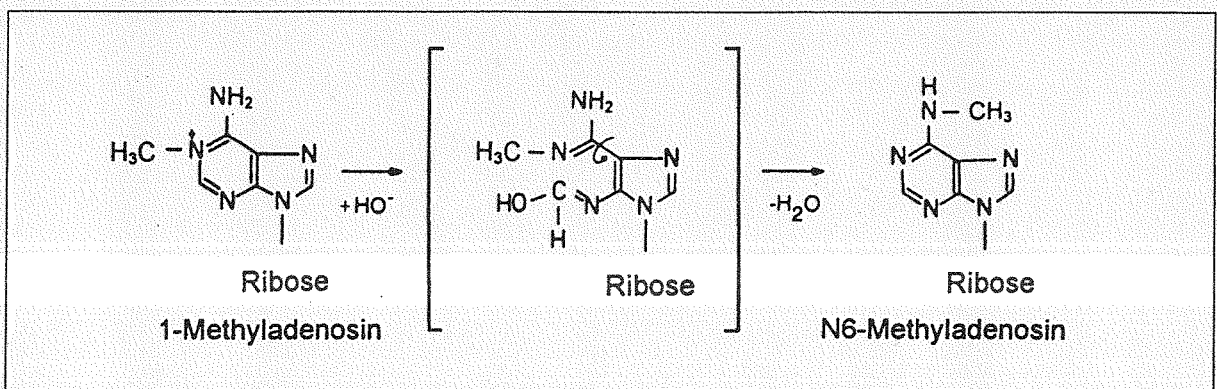


Abb. 1: Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin

3.2 Bildung von N6-Methyladenosin in Sterilmilchen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nucleoside m1Ado und m6Ado in zahlreichen Milchproben, die verschiedenen Temperatur-Zeit-Bedingungen des Sterilbereichs unterworfen wurden, liquidchromatographisch bestimmt (Abb. 2). Dabei konnten bereits in der gemäß Abschnitt 2.1 vorbereiteten Versuchsmilch geringe Mengen des Umlagerungsproduktes m6Ado (0,02-0,05 $\mu\text{mol/l}$) nachgewiesen werden. Die nach den verschiedenen Temperatur-Zeit-Bedingungen erhaltenen Gehalte an m6Ado wurden deshalb um den entsprechenden m6Ado-Ausgangswert der Versuchsmilch korrigiert. Aus den Erhitzungsversuchen mit Prozeßtemperaturen zwischen 110 -134°C bei Heißhaltezeiten bis zu 50 min geht hervor, daß das Ausmaß der Dimroth-Umlagerung mit steigender Temperatur und der Länge der Heißhaltezeit zunimmt. Die reaktionskinetische Auswertung zur Bestimmung der Reaktionsordnung und von prozeßtechnischen Parametern erfolgte gemäß Abschnitt 2.3 (Tab. 1, Abb. 3).

Es wurde allerdings beobachtet, daß bei Prozeßtemperaturen $\geq 129^\circ\text{C}$ und Heißhaltezeiten von mehr als 3,6 min (entsprechend F_0 -Werten >22 min, die außerhalb des für die Sterilisierung von Milch üblichen Bereiches liegen) neben der Dimroth-Umlagerung von m1Ado in m6Ado Abbaureaktionen zu bisher nicht charakterisierten Produkten auftreten, die eine reaktionskinetische Auswertung unter Verwendung der gemessenen m6Ado-Gehalte in den erhitzten Versuchsmilchen nicht mehr zulassen (Tab. 1, Abb. 3). Im Temperaturbereich zwischen 110-119°C bei Heißhaltezeiten bis 40,5 min konnte, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, durch graphische Auswertung gezeigt werden, daß die Umlagerung von m1Ado in m6Ado nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft. Die für diesen Bereich berechneten Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und die Halbwertszeiten sind in Tabelle 1 angegeben. Darüber hinaus wurden in Tabelle 1 für den Temperaturbereich 125-134°C und Heißhaltezeiten, die nicht zur Überschreitung eines F_0 -Wertes von 22 min führten, abgeschätzte Werte für Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten aufgeführt, da unter diesen Temperatur-Zeit-Bedingungen die Dimroth-Umlagerung von m1Ado in m6Ado durch andere Abbaureaktion noch nicht überlagert ist. Aus der graphischen Darstellung (Abb. 3) ist diese Beobachtung ablesbar. Bei einer Prozeßtemperatur von 129°C wird bis zu einer Heißhaltezeit von 2,3 min die Dimroth-Umlagerung zu m1Ado noch nicht von Destruktionsreaktionen überlagert, die bei längeren Heißhaltezeiten auftreten und zu einer "scheinbaren Verlangsamung" der Umlagerungsreaktion führen. Aus der graphischen Auftragung (Abb. 3D) ist erkennbar, daß bei einer Temperatur von 129°C die Abbaureaktion ab einer Heißhaltezeit von 3,6 min die Umlagerung beeinflusst.

In Abhängigkeit von der Höhe der Prozeßtemperatur und der Länge der Heißhaltezeit wurden außer der Dimroth-Umlagerung weitere Veränderungen des für Rohmilch typischen Musters der Milchnucleoside beobachtet. So entsteht in Abhängigkeit von der Wärmebelastung ein zusätzliches Nucleosid, das unter den in dieser Arbeit gewählten Chromatographiebedingungen mit einer geringfügig längeren Retentionszeit als m1Ado im Chromatogramm auftritt. Außerdem wird neben einem Anstieg der Gehalte an Cytidin, Inosin und Uridin um etwa ein Drittel vor allem eine Peakzunahme des Adenosin-Peaks bis zu 160 % (im Mittel von 0,7 auf 1,1 $\mu\text{mol/l}$ Ado) beobachtet, die mit einer Peakabnahme des N6-Carbamoyl-L-threonyladenosin-Peaks korrespondiert, da es unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen im Sterilbereich zu einer hydrolytischen Spaltung dieses hypermodifizierten Nucleosids unter Bildung von Adenosin kommt. Als weitere Nucleosidquelle kommt eine Esterhydrolyse von Nucleosid-5'-monophosphaten in Frage, da aus Arbeiten von Gil und Sanchez-Medina (18) bekannt ist, daß unter Sterilisierungsbedingungen in geschlossenen Glasflaschen bei einer Prozeßtemperatur von 120 °C und

einer Heißhaltezeit von 12 min die Milchgehalte an Adenosin- und Cytidin-5'-monophosphat (5'AMP, 5'CMP) von 19,5 auf 11,8 $\mu\text{mol/l}$ 5'AMP bzw. von 20,6 auf 10,9 $\mu\text{mol/l}$ 5'CMP vermindert werden (18).

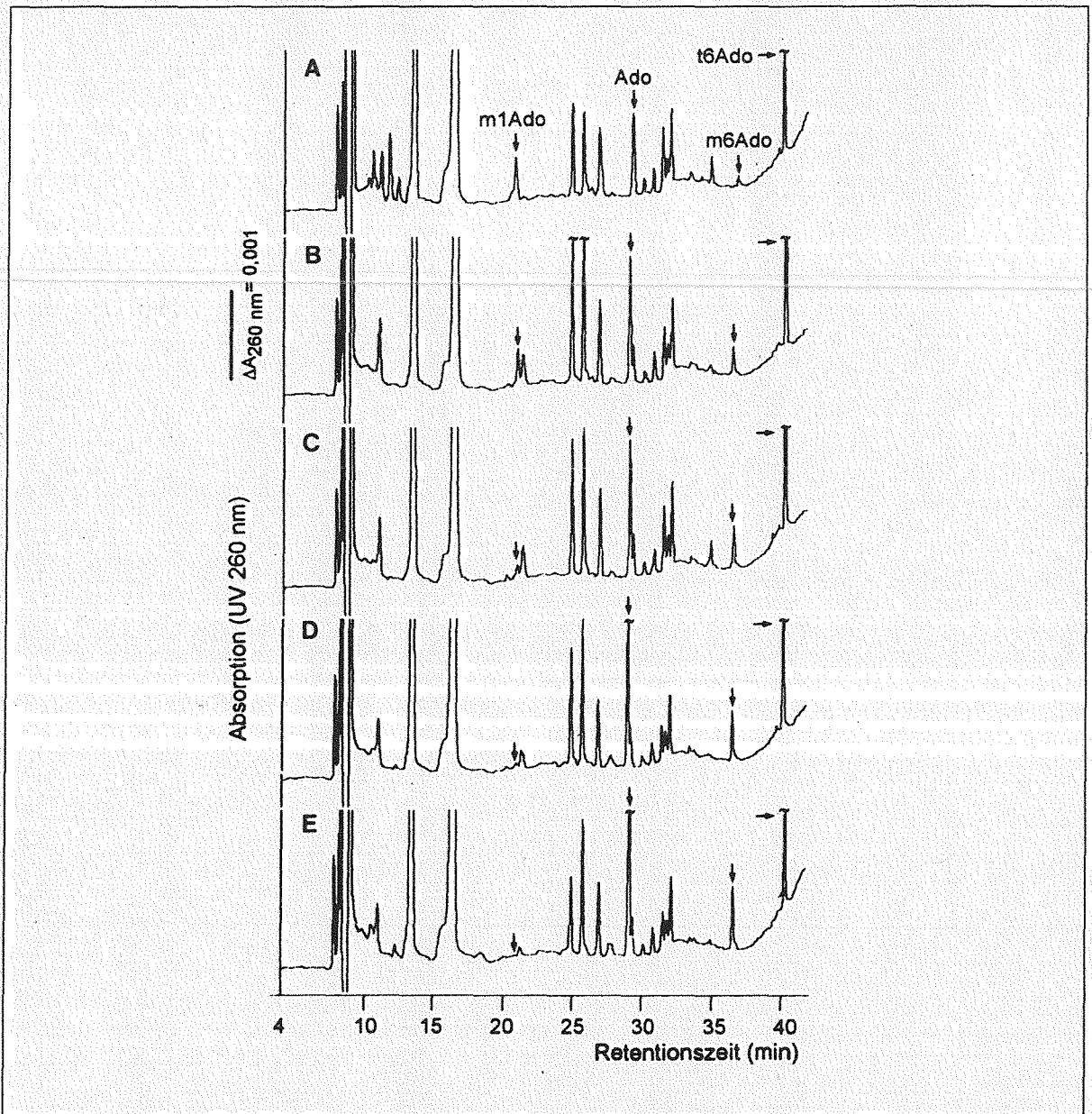


Abb. 2: Diagramme der liquidchromatographischen Trennung von Ribonucleosiden aus je 100 μl sauer konservierter Milch. Milchproben der fetteingestellten (3,5%), thermisierten und homogenisierten Versuchsmilch nach folgenden Heißhaltezeiten: 0 s (A), 199,8 s (B), 594 s (C), 1209 s (D) und 2520 s (E) bei einer Prozeßtemperatur von 114°C.

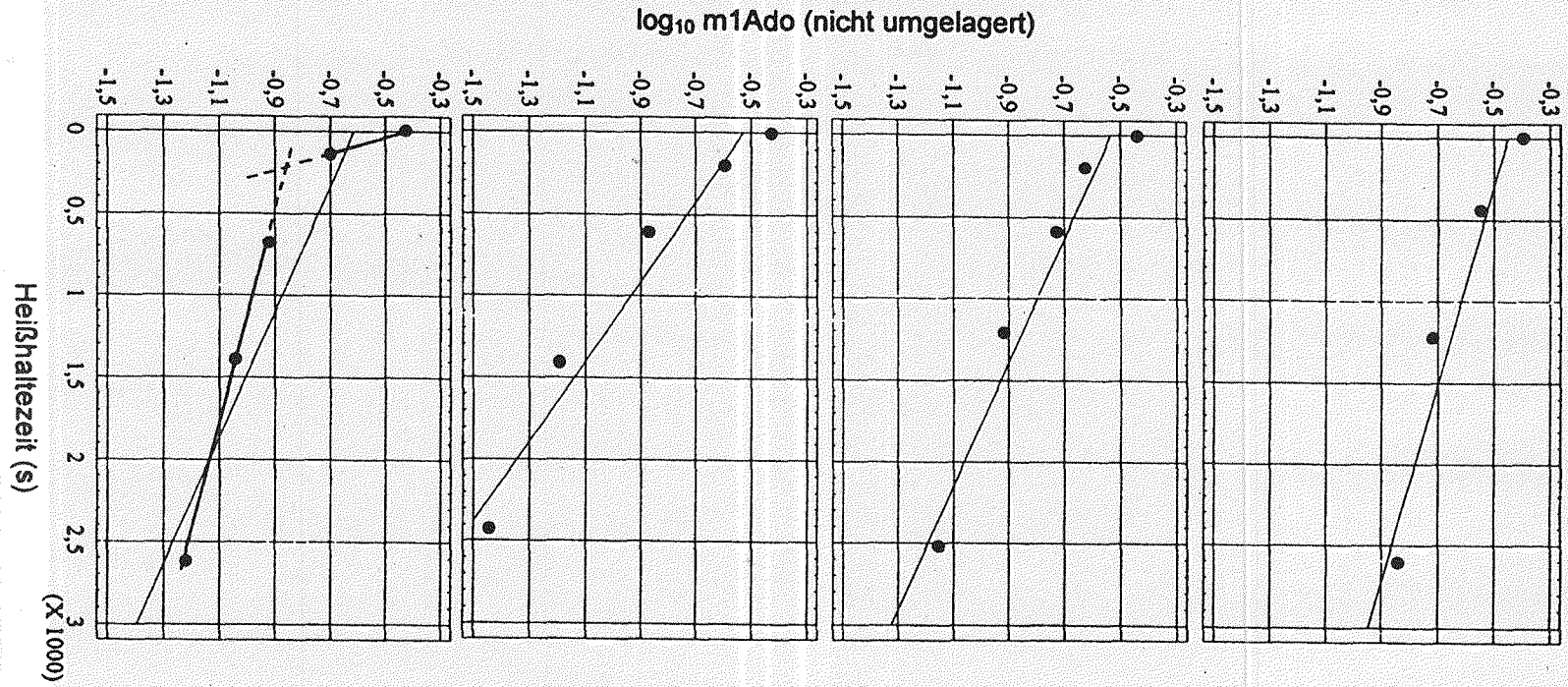


Abb. 3: Semilogarithmische Auftragung der Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) an nicht umgelagertem 1-Methyladenosin ($m1Ado$) gegen die Heißhaltezeit (s), dargestellt für Prozeßtemperaturen von 110°C (A), 114°C (B), 119°C (C) und 129°C (D). Die graphische Darstellung in D zeigt, daß bei Heißhaltezeiten ab 678 s eine scheinbare Verlangsamung der $m6Ado$ -Bildung eintritt, da die Dimroth-Umlagerung durch Destruktionsreaktionen überlagert wird. Die Geraden für die Dimroth-Umlagerung und für die überlagerte Reaktion schneiden sich bei einer Heißhaltezeit von 216 s. Die in den Versuchen eingesetzte Sammelmilch stammte von verschiedenen Tagen.

Tab. 1: Gehalte an 1-Methyladenosin und N6-Methyladenosin in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Sterilisierung und Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und der Halbwertszeit für diese Umlagerung

Proben	Prozeß- temperatur (°C)	Heißhalte- zeit (äquival.) t (s)	m1Ado c_{A0} (µmol/l) ^b	m6Ado c_{Bt} (µmol/l) ^c	Geschwindig- keitskonstante ^d k (s ⁻¹) ^d	Halbwertszeit ^f	
						r^e	$\tau_{1/2}$ (s)
ST 1.2 ^a - 1.4	110	440,4; 1224; 2610	0,41; 0,41; 0,41	0,12; 0,22; 0,26	$3,795 \times 10^{-4}$	-0,9582	1826,5
ST 2.1 - 2.4	114	199,8; 594,0; 1209; 2520	0,36; 0,36; 0,36; 0,36	0,13; 0,18; 0,24; 0,29	$6,049 \times 10^{-4}$	-0,9704	1145,8
ST 3.1 - 3.4	119	194,4; 609,6; 1416; 2430	0,39; 0,36; 0,36; 0,36	0,14; 0,23; 0,30; 0,33	$9,397 \times 10^{-4}$	-0,9758	737,6
ST 4.1 - 4.4	125	150,0; 571,8; 1314; 2040	0,39; 0,39; 0,39; 0,39	0,21; 0,27; 0,29; 0,32	$5,045 \times 10^{-3 g}$	-1	140 ^g
ST 5.1 - 5.4	129	138,0; 678,0; 1392; 2622	0,37; 0,37; 0,37; 0,37	0,18; 0,26; 0,28; 0,31	$4,626 \times 10^{-3 g}$	-1	150 ^g
ST 6.1 - 6.4	134	156,0; 780,0; 1122; 2970	0,40; 0,40; 0,40; 0,40	0,25; 0,28; 0,27; 0,22	$6,171 \times 10^{-3 g}$	-1	110 ^g

- (a) Die Temperatur-Zeit-Kombination ST 1.1 wurde in die Auswertung nicht einbezogen, da diese weit unterhalb des üblichen Sterilbereiches liegt (s. Abb. 4).
- (b) Konzentration von m1Ado (µmol/l) in der Fett-eingestellten, thermisierten und homogenisierten Versuchsmilch vor der Erhitzung; gerundete Werte.
- (c) Konzentration von m6Ado (µmol/l) in der Versuchsmilch nach der jeweiligen Heißhaltezeit t(s); gerundete Werte.
- (d) Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k erfolgte wie in Abschnitt 2 beschrieben.
- (e) Korrelationskoeffizient r der linearen Regression.
- (f) Halbwertszeit, die bei einer vorgegebenen Prozeßtemperatur benötigt wird, um 50 % des vor der Erhitzung vorhandenen m1Ado in m6Ado umzulagern.
- (g) Abgeschätzte Werte; nur die Abnahmegeschwindigkeit von m1Ado zwischen dem Zeitpunkt t=0s und der kürzesten Heißhaltezeit (ST 4.1; ST 5.1) konnte ausgewertet werden, da bei längeren Heißhaltezeiten und Temperaturen $\geq 129^\circ\text{C}$ (entsprechend F_0 -Werten >22 min) neben der Dimroth-Umlagerung von m1Ado in m6Ado auch Abbaureaktionen auftreten, die eine Auswertung über die m6Ado-Gehalte in den erhitzten Versuchsmilchen nicht mehr zulassen.

Aus der linearen Beziehung zwischen $\log_{10} D$ und der Prozeßtemperatur ergibt sich ein z-Wert von 22,9°C für den Temperaturbereich von 110-119°C (Abb. 5). Werden neben den D-Werten für den Temperaturbereich 110-119°C auch die D-Werte aus reaktionskinetischen Untersuchungen im Bereich der Ultrahoherhitzung (8) in die kinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung einbezogen (Tab. 2), dann ergibt die Auswertung für den gesamten Temperaturbereich zwischen 110-150°C einen z-Wert von 28,3°C (Tab. 2, Abb. 5). Der z-Wert gibt die Temperaturänderung an, die notwendig ist, um den D-Wert um den Faktor 10 zu ändern. Der z-Wert definiert ursprünglich die Hitzewiderstandsfähigkeit verschiedener Keimarten und beschreibt in der vorliegenden Arbeit die thermische Stabilität des 1-Methyladenosins. Die aus den z-Werten berechneten Q_{10} -Werte sind ebenfalls in Tabelle 2 aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen reaktionskinetischen und prozeßtechnischen Parameter stützen entsprechende Befunde über die Dimroth-Umlagerung bei der Ultrahoherhitzung von Milch (8) und stimmen mit anderen in der Literatur berichteten z- und Q_{10} -Werten thermisch-induzierter chemischer Reaktionen in Milch (Tab. 3) sehr gut überein. Für Temperatur-Zeit-Kombinationen zwischen 110 und 134°C und Heißhaltezeiten, die einen F_0 -Wert von 22 min nicht überschreiten (Abb. 4), ist das aus 1-Methyladenosin durch Dimroth-Umlagerung thermisch generierte N6-Methyladenosin ein geeigneter chemischer Prozeßparameter zur Beschreibung der im praxisrelevanten Bereich üblichen Wärmebelastung bei der Herstellung von Sterilmilch.

Tab. 2: Prozeßtechnische Parameter (D-Wert, z-Wert, Q_{10} -Wert) für die Dimroth-Umlagerung in Milch

Proben	Prozeßtemperatur (°C)	D-Wert (s) ^a	$\log_{10} D$	z-Wert (°C)	Q_{10} -Wert
ST 1.2 ^a - 1.4	110	6069	3,783	22,9	2,73
ST 2.1 - 2.4	114	3807	3,581		
	115 (aus (8))	3170 (aus (8))	3,501		
ST 3.1 - 3.4	119	2451	3,389	28,3 ^d	2,26 ^d
ST 4.1	125	(460) ^c			
ST 5.1	129	(500)			
ST 6.1	134	-			
	135 (aus (8))	608 (aus (8))	2,784		
	142 (aus (8))	341 (aus (8))	2,533		
	150 (aus (8))	247 (aus (8))	2,393		

(a) Die Temperatur-Zeit-Kombination ST 1.1 wurde in die Auswertung nicht einbezogen, da diese nicht im Sterilbereich liegt.

(b) Dezimalreduktionswert (D-Wert) berechnet gemäß $D = 2,303 / k$ (s).

(c) Abgeschätzte Werte (vgl. Anmerkung g in Legende von Tabelle 1).

(d) z- und Q_{10} -Werte unter Einbeziehung der Meßwerte aus UHT-Erheizungsuntersuchungen für den Temperaturbereich 135-150°C (8); die angegebenen verfahrenstechnischen Parameter gelten somit für den gesamten Temperaturbereich von 110-150°C.

Tab. 3: Prozeßtechnische Parameter von thermisch induzierten chemischen Reaktionen in Milch

Reaktionsprodukt	Prozeßtemperatur (°C)	z-Wert (°C)	Q ₁₀ -Wert	Quellen
5-Hydroxymethylfurfural (total)	50-160	23,5	2,67	Fink, Kessler, (19)
	75-130	27,8-23,7	2,29-2,64	Peri, Pagliarini, Pierucci, (20)
	100-147	23,7	2,64	Konietzko, Reuter, (21)
	130-150	27,8	2,29	Mottar, (22)
Lactulose	60-145	27,7-21,0	2,30-3,00	Geier, Klostermeyer, (23)
	120-150	28,6-25,3	2,20-2,50	Nangpal, Reuter, (24)
	120-150	21,0	3,0	Andrews, (25)
Thiamin (Verlust)	120-150	31,5	2,08	Horak, Kessler, (22)
		29,4	2,19	Kessler, Fink, (27)
N6-Methyladenosin	115-150	29,4	2,19	Bayoumi, Reuter, (28)
		30,5	2,13	Schlimme, Ott, Kiesner, (8)

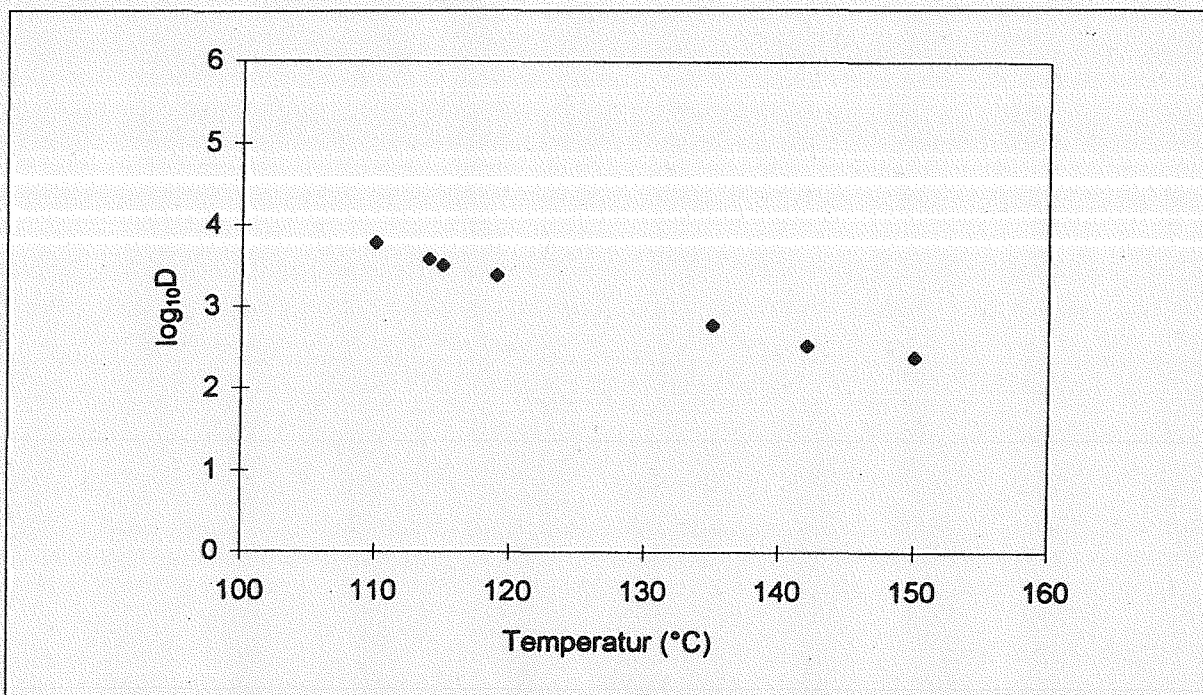


Abb. 5: Bestimmung des z-Wertes der Dimroth-Umlagerung im Temperaturbereich von 110-150°C. Die Auftragung von logD über den Temperaturbereich von 110-119°C ergibt die Geradengleichung $y = -0,0436 x + 8,5644$, der z-Wert errechnet sich zu 22,9°C. Eine entsprechende Auftragung von logD über den gesamten Temperaturbereich von 110-150°C, d.h. unter Einbeziehung der Ergebnisse aus (8), ergibt die Geradengleichung $y = -0,0353 x + 7,5962$, der z-Wert errechnet sich dann zu 28,3°C.

Danksagung

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Europäischen Kommission VO(EWG) Nr. 1116/92 dankenswerter Weise gefördert.

4. Literatur

- (1) Tiemeyer, W., Stohrer, M., Giesecke, D.: J. Dairy Sci. **67** 723-728 (1984)
- (2) Schlimme, E., Boos, K.-S., Frister, H., Pabst, K., Raezke, K.-P., Wilmers, B.: Milchwissenschaft **41** 757-762 (1986)
- (3) Raezke, K.-P., Schlimme, E.: Z. Naturforsch. **45c** 655-662 (1990)
- (4) Schlimme, E., Raezke, K.-P., Ott, F.-G.: Z. Ernährungswiss. **30** 138-152 (1991)
- (5) Schneehagen, K., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **44** 67-74 (1992)
- (6) Topp, H., Groß, H., Heller-Schöch, G., Schöch, G.: Nucleosides & Nucleotides **12** 585-596 (1993)
- (7) Ott, F.-G., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **43** 213-217 (1991)
- (8) Schlimme, E., Ott, F.-G., Kiesner, C.: Int. Dairy Journal **4** 617-627 (1994)
- (9) Schlimme, E., Boos, K.-S.: Journal of Chromatography Library, Vol. **45c** C115-C145 (1990)
- (10) Boos, K.-S., Wilmers, B., Sauerbrey, R., Schlimme, E.: Ger. Pat., P 361 7805.5 (1986)
- (11) Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E., Sauerbrey, R.: J. Chromatogr. **456** 93-104 (1988)
- (12) Raezke, K.-P., Wilmers, B., Boos, K.-S., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **40** 53-62 (1988)
- (13) Raezke, K.-P., Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E.: Milchwissenschaft **43** 224-229 (1988)
- (14) Fromherz, H.: Physikalisch-chemisches Rechnen in Wissenschaft und Technik. Verlag Chemie, Weinheim (1966)
- (15) Wallhäußer, K.H.: Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)
- (16) Brookes, P., Lawley, P.D.: J. Chem. Soc. **1960** 539-545
- (17) Macon, J.B., Wolfenden, R.: Biochemistry **7** (10) 3453-3458 (1968)
- (18) Gil, A., Sanchez-Medina, F.: J. Dairy Res. **49** 295-300 (1982)
- (19) Fink, R., Kessler, H.G. Milchwissenschaft **41** 638-641 (1986)
- (20) Peri, C., Pagliarini, E., Pierucci, S.: Milchwissenschaft **43** 636-639 (1988)
- (21) Konietzko, M., Reuter, H.: Milchwissenschaft **35** 276-277 (1980)
- (22) Mottar, I.: Le Lait **61** 503-516 (1981)
- (23) Geier, H., Klostermeyer, H.: Milchwissenschaft **38** 475-477 (1983)
- (24) Nangpal, A., Reuter, H.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **42** 31-41 (1990)
- (25) Andrews, G.R.: J. Dairy Res. **52** 275-280 (1985)
- (26) Horak, F.P., Kessler, H.G.: Z. Lebensm.-Technol.-Verfahrenstechn. **32** 180-184 (1981)
- (27) Kessler, H.G., Fink, R.: J. Food Sci. **51** 1105-1111 (1986)
- (28) Bayoumi, E.S., Reuter, H.: Milchwissenschaft **35** 278-279 (1980)

5. Zusammenfassung

Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: **Kinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung des 1-Methyladenosins in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen des Sterilbereichs.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **47** (1) 75 -86 (1995)

24 Sterilmilch (Wärmebehandlung, Dimroth-Umlagerung, Prozeßparameter)

Bei der Wärmebehandlung von Milch wird in einer Dimroth-Umlagerung das originäre Milchrbonucleosid 1-Methyladenosin zum N6-Methyladenosin umgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde auf 3,5% Fettgehalt eingestellte und homogenisierte Milch unter definierten Temperatur-Zeit-Bedingungen im ausgedehnten Sterilbereich erhitzt. Die liquidchromatographischen Analysen der Milchproben ergaben, daß die Dimroth-Umlagerung zum N6-Methyladenosin im untersuchten Sterilbereich einer Reaktionskinetik 1.Ordnung unterliegt. Die aus den jeweiligen temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten berechneten Dezimalreduktionswerte (D-Werte) zeigen, daß die Umlagerungsreaktion bis zu einer Temperatur von 119°C und einer äquivalenten Heißhaltezeit von 40,5 min bzw. Temperatur-Zeit-Kombinationen, die einen F_0 -Wert von 22 min nicht überschreiten, für kinetische Analysen geeignet ist. Bei höheren Tem-

peraturen bzw. höheren äquivalenten Heißhaltezeiten wird die Dimroth-Umlagerung jedoch von Destruktionsreaktionen begleitet, was sich in einer scheinbaren Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit niederschlägt. Die im Sterilbereich bestimmten verfahrenstechnischen Parameter (z -Wert = 22,9 °C; Q_{10} -Wert = 2,73) sind mit den aus UHT-Untersuchungen ermittelten Werten (z -Wert = 30,5 °C; Q_{10} -Wert = 2,13) vergleichbar. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen somit die Eignung der an der Umlagerung beteiligten methylierten Nucleoside als chemische Prozeßparameter für die Wärmebehandlung von Milch.

Summary

Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: **Kinetic analysis of Dimroth-rearrangement of 1-methyladenosine in milk under temperature-time conditions of sterilization.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47 (1) 75 -86 (1995)

24 Sterilmilk (heat treatment, Dimroth-rearrangement, process parameters)

During heat treatment of milk the original milk ribonucleoside 1-methyladenosine is converted to N6-methyladenosine by Dimroth-rearrangement. In the present study milk, standardized to a fat content of 3.5 % and homogenized, was heated in the sterilization section under defined temperature-time conditions. Liquid chromatographic analyses of the milk samples have shown that Dimroth-rearrangement to N6-methyladenosine in the sterilization section studied is subjected to a first-order reaction. The decimal reduction times (D -values) derived from the respective temperature-dependent velocity constants show that Dimroth-rearrangement is, up to a temperature of 119°C and an equivalent holding time of 40.5 min, respectively temperature-time combinations not exceeding an F_0 -value of 22 min, suited to be used for kinetic analyses. At higher temperatures and higher equivalent holding times, however, Dimroth-rearrangement is accompanied with destruction reactions, which is reflected in an apparently delayed reaction velocity. The process parameters determined in the sterilization section (z -value = 22.9°C; Q_{10} -value = 2.73) can be compared with the values obtained in UHT-experiments (z -value = 30.5°C; Q_{10} -value = 2.13). The results obtained confirm, thus, the suitability of the methylated nucleosides participating in Dimroth-rearrangement to be used as chemical process parameters for heat treatment of milk.

Résumé

Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: **Analyse cinétique du réarrangement de Dimroth de 1-méthyladénosine dans le lait dans des conditions temps-température dans la section de stérilisation.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47 (1) 75-86 (1995)

24 Stèrillait (traitement thermique, réarrangement de Dimroth, paramètres du procédé)

Au cours du traitement thermique du lait le ribonucléoside originaire du lait 1-méthyladénosine est transformée en N6-méthyladénosine par un réarrangement de Dimroth. Dans le présent travail du lait normalisé à une teneur en matière grasse de 3.5 % et homogénéisé a été chauffé dans des conditions temps-température définies dans la section de stérilisation.

La chromatographie liquide des échantillons du lait a révélé que le réarrangement de Dimroth en N6-méthyladénosine dans la section de stérilisation étudiée est soumis à une

réaction de premier ordre. Les valeurs D calculées à partir des constantes de vitesse respectives qui dépendent de la température montrent que la réaction du réarrangement jusqu'à une température de 119°C et une durée de chambrage équivalente de 40.5 min respectivement des combinaisons temps-température, qui ne dépassent pas une valeur F_0 de 22 min, est appropriée à être utilisée pour des analyses cinétiques. Si l'on applique des températures plus élevées respectivement des durées de chambrage équivalentes plus élevées le réarrangement de Dimroth est accompagné de réactions de destruction, ce qui se traduit par un ralentissement apparent de la vitesse de la réaction. Les paramètres technologiques déterminés dans la section de stérilisation ($z = 22.9^\circ\text{C}$; $Q_{10} = 2.73$) sont comparables aux valeurs obtenues dans des expériences UHT ($z = 30.5^\circ\text{C}$; $Q_{10} = 2.13$). Les résultats obtenus confirment, donc, l'aptitude des nucléosides méthylés qui participent au réarrangement à être utilisés comme des paramètres chimiques pour le traitement thermique du lait.