

## 7. Kapitel

### Bestimmung von Lactulose in wärmebehandelten Milchen

I. Clawin-Rädecker und E. Schlimme

#### 1. Einleitung

Während der Wärmebehandlung von Milch und Milchprodukten ist Lactose neben der Maillard-Reaktion in einer Reihe weiterer Isomerisierungs- und Abbaureaktionen beteiligt (1). Die durch Epimerisierung aus Lactose entstehende Lactulose (4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose) (Abb. 1) wurde erstmals von Adachi (2) in Kondensmilch nachgewiesen. Der Gehalt an Lactulose in erhitzter Milch kann als ein Maß der Wärmebelastung angesehen werden. Die Bestimmung von Lactulose in Milch kann sowohl gaschromatographisch (3), enzymatisch (4,5) als auch mittels HPLC-Methoden (6) erfolgen.

In umfangreichen Untersuchungen (7 - 14) wurde der Lactulosegehalt in Konsummilchen des Handels bestimmt (Tab. 1). Die große Variationsbreite des Lactulosegehaltes innerhalb der einzelnen Produktklassen verdeutlicht die unterschiedlichen Hitzebelastungen in den Konsummilchproben und erschwert eine eindeutige Charakterisierung der Milch nur aufgrund des Hitzeindikators Lactulose. In Kombination mit dem säurelöslichen Gehalt an  $\beta$ -Lactoglobulin wird Lactulose als geeigneter Hitzeindikator zur Charakterisierung der Wärmebehandlung im UHT- und Sterilbereich angesehen. Die große Variationsbreite des Lactulosegehaltes innerhalb der einzelnen Produktklassen verdeutlicht jedoch auch die Notwendigkeit, die Hitzebelastung der Milch auf ein produktionstechnisches Mindestmaß zu reduzieren. Eine Festlegung von Grenzwerten für die einzelnen Hitzeindikatoren, wie z.B. Lactulose, kann nur auf der Grundlage von unter definierten Erhitzungsbedingungen hergestellten Milchen erfolgen.

Lactulose weist als Hitzeindikator eine Reihe von Vorteilen auf. So ist Lactulose in unbehandelte Rohmilch nicht nachweisbar. Die Bildung von Lactulose verläuft über einen weiten Temperatur-Zeit-Bereich nach einer einheitlichen Reaktionskinetik. Die Ausgangssubstanz Lactose liegt in hohen Konzentrationen vor und unterliegt nur geringen biologischen Schwankungen. Im Gegensatz zu den frühen Maillard-Produkten stellt Lactulose ein stabiles Endprodukt dar, das sich im Verlauf der Lagerung nur geringfügig ändert. Bei Lagerung wird in UHT-Milch bei Raumtemperatur lediglich eine Zunahme von 0,2 mg/100 g beobachtet (11). Erst bei Lagerung deutlich über der Raumtemperatur werden nennenswerte Zuwächse an Lactulose beobachtet.

Lactulose kann in UHT- und Sterilmilchen mit den oben genannten Analysemethoden nachgewiesen werden. In einigen Veröffentlichungen (3,8) wird auch von geringen Mengen Lactulose in pasteurisierten und hochehitzten Milchen berichtet, die jedoch im Bereich der Nachweisgrenze der Analysemethoden liegen. Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde der Lactulosegehalt in Milchen unter-

sucht, die unter definierten Prozeßbedingungen hergestellt wurden. Es wurde der gesamte Temperatur-Zeit-Bereich der Thermisierung, Pasteurisierung, Hoherhitzung, UltraHoherhitzung und Sterilisierung erfaßt, um eine Eingrenzung des Erhitzungsbereiches zu ermöglichen, für den Lactulose als Hitzeindikator geeignet ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Herstellung der PT-Milchproben**

Die Milchproben des Pasteurierungs- und Thermisierungsbereiches (PT) wurden aus unbehandelter Rohmilch (Sammelmilch von ca. 30 Kühen, Morgengemelk, Fettgehalt 3,3 %) der Versuchsstation Schaedbek der Bundesanstalt für Milchforschung hergestellt. Auf eine Separierung, Einstellung des Fettgehaltes auf 3,5 % mit anschließender Homogenisierung wurde verzichtet. Zur Wärmebehandlung wurde eine Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch eingesetzt. Die Erwärmung der Milch erfolgte über einen Spiralrohrerwärmer. Durch Einbau unterschiedlicher Heißhaltemodule wurden Heißhaltezeiten zwischen 15 sec und 80 sec bei Temperaturen von 62 °C bis 75 °C eingehalten. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die Milchprobe PT 1.4 wurde nicht in der Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch, sondern in einer 5l-Aluminium-Milchkanne durch Erwärmen im Wasserbad hergestellt. Die Milchproben wurden bis zur Analyse des Lactulosegehaltes bei -18 °C gelagert.

### **2.2 Herstellung der HE-Milchproben**

Die Herstellung der einzelnen HE-Milchproben erfolgte an 5 verschiedenen Versuchstagen. Die eingesetzte Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch (ca. 30 Kühe, Morgengemelk) der Versuchsstation Schaedtbek der Bundesanstalt für Milchforschung. Die Rohmilch wurde im Fettgehalt auf 3,5 % eingestellt und homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt. Zur Erhitzung der Milchproben wurde die unter 2.1.1 beschriebene Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Wärmebehandlung von Milch genutzt. Die für den Hoherhitzungsbereich eingehaltenen Temperatur-Zeit-Kombinationen lagen zwischen 86 °C - 125 °C und äquivalenten Heißhaltezeiten von 5,3 sec bis 62,4 sec. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die separierte und homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen HE-Milchproben wurden bis zur Bestimmung des Lactulosegehaltes bei -18 °C gelagert.

### **2.3 Herstellung der UT-Milchproben**

Um einen möglichen Einfluß der Vorbehandlung der Milch zu erfassen, wurden im UltraHoherhitzungsbereich Milchproben sowohl aus unbehandelter Rohmilch wie aus separierter und homogenisierter Ausgangsmilch hergestellt. Die eingesetzte

Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch (ca. 30 Kühe, Morgengemelk, Fettgehalt: 3,73 %) der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung. Ein Teil der Rohmilch wurde homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt und anschließend wärmebehandelt (UT-Proben). Der andere Teil der Rohmilch wurde direkt ohne weitere Vorbehandlung erhitzt (RUT-Proben). Zur Wärmebehandlung der Milchproben wurde die unter 2.1.1 beschriebene Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch genutzt. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen HE-Milchproben wurden bis zur Bestimmung des Lactulosegehaltes bei -18 °C gelagert.

## 2.4 Herstellung der Sterilmilchen

Bei der Herstellung der Sterilmilchen wurde ein Temperaturbereich von 110 °C bis 135 °C erfaßt. Es wurden Heißhaltezeiten von 100 sec bis 3000 sec eingehalten, die weit über die molkereiüblichen Sterilisierungsbedingungen hinausgehen. Die Herstellung der einzelnen Sterilmilchproben erfolgte an 5 verschiedenen Versuchstagen. Die eingesetzte Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch (ca. 30 Kühe) der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung. Die Rohmilch wurde im Fettgehalt auf 3,5 % eingestellt und homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt, in Glasflaschen abgefüllt und im Autoklaven (Stock, Neumünster) bei den angegebenen Temperatur/Zeit-Kombinationen sterilisiert. Die separierte und homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen Sterilmilchproben wurden bis zur Bestimmung des Lactulosegehaltes bei -18 °C gelagert.

## 2.5 Enzymatische Lactulosebestimmung

Die Bestimmung der Lactulose wurde nach der Amtlichen Methode entsprechend L-01.00 31 nach §35 LMBG durchgeführt. Das Prinzip der enzymatischen Bestimmung beruht auf dem Nachweis mittels  $\beta$ -Galactosidase aus Lactulose freigesetzter Fructose. Die durch Hydrolyse im Überschuß aus Lactose freigesetzte Glucose wird oxidativ durch Glucoseoxidase entfernt, wobei das entstehende Wasserstoffperoxid mittels Katalase zerstört und der für die Oxidation der Glucose benötigte Sauerstoff nachgebildet wird. Anschließend kann die Fructose nach Phosphorylierung zu Fructose-6-phosphat in Glucose-6-phosphat isomerisiert und über die Oxidation zu 6-Phosphogluconat nachgewiesen werden. Die Menge des im letzten Schritt gebildeten  $\text{NADPH, H}^+$  ist der Menge an Lactulose in der analysierten Probe proportional.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurde eine wäßrige Lactose/Lactulose-Lösung (Merck, Darmstadt) parallel zu jeder Analyse untersucht. Die stark ausgeflockten Sterilmilchen ST 5.3 und 5.4 wurden für die Analyse mittels Ultraturax homogenisiert. Bei den Proben ST 6.3 und 6.4 wurde auf eine Homogenisierung verzichtet und der klare Überstand zur Analyse eingesetzt. Aufgrund der hohen Lactulose-

gehalte im Sterilbereich wurden die für den photometrischen Test eingesetzten Filtrate teilweise 1 : 5 verdünnt (ab Lactulosegehalte von 150 mg/100 g).

Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Genauigkeit aus. Die Wiederholbarkeit wurde mit  $r = 1$  mg für eine UHT-Milch (27,6 mg/100 g) und  $r = 3$  mg für sterilisierte Milch (105 mg/100 g) validiert.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der enzymatischen Methode wurden Rohmilchen unterschiedlicher Versuchstage eingesetzt. Die Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch der Versuchsstation Schaedtбек der Bundesanstalt für Milchforschung. Die Standardabweichung  $s_r$  der Analysenmethode wurde aus der 10-fach-Bestimmung der einzelnen Rohmilchen ermittelt. Die Nachweisgrenze NG der Analysenmethode ergibt sich nach  $NG = BI + 3 s_r$  ( $BI$  = Blindwert der eingesetzten Rohmilch). Zur Validierung der Methode im unteren Konzentrationsbereich wurde in die eingesetzte Rohmilch 1 bis 5 mg Lactulose (Merck, Darmstadt) auf 100 ml Milch genau zugewogen und analysiert.

## 2.6 Enzymatische Galactosebestimmung

Die enzymatische Galactosebestimmung wurde entsprechend VDLUFA Methodenbuch VI C 20.2.3 durchgeführt.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Theorie der Lactulosebildung

Lactulose entsteht - thermisch induziert oder in alkalischem Milieu - in Milch und Milchprodukten durch Isomerisierung der Lactose. Zur Entstehung der Lactulose beim Erhitzen von Milch wurden von ADACHI und PATTON (15) zwei mögliche Reaktionswege in Betracht gezogen. Zum einen wurde die Bildung von Lactulose durch eine thermisch induzierte Spaltung des Amadori-Umlagerungsproduktes Lactulosyllysin, das im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet wird, diskutiert. Obwohl N-(p-Tolyl)-lactosylamin bei saurer Hydrolyse Lactulose liefert, wird doch angenommen, daß das Amadoriprodukt Lactulosyllysin sehr stabil ist und die saure Hydrolyse eher zur Spaltung des Disaccharids führt als zur Freisetzung von Lactulose. Als alleiniger Bildungsweg wird daher die LA-Transformation (Lobry de Bruyn-Alberta van Ekenstein-Transformation) angenommen (16,19). GREIG und PAYNE (17) konnten nachweisen, daß die Epimerisierung von Lactose zu Lactulose reversibel ist und die Theorie der LA-Transformation bestätigen. Der Ablauf der LA-Transformation wird in Abbildung 2 verdeutlicht. Unter dem Einfluß geeigneter basischer Reagenzien bildet sich das 1,2-Endiol (II). Lagert sich dieses Endiol in die Aldose um, so wird C-2 zum asymmetrischen C-Atom. Es entsteht entweder Lactose (I) oder Epilactose (VII). Lagert sich das 1,2-Endiol in die 1-Hydroxy-2-keto-Verbindung (III) um, so entsteht Lactulose (4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-fructose) (IV). Eine Katalyse der LA-Transformation durch Aminogruppen ist nicht nachweisbar, stattdessen wird eine verminderte Lactulosebildung in Gegenwart von Lysin festgestellt (17). Aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften haben Citrate und Phosphate eine katalytische Wirkung auf die Umlagerung (15,18). Eine Erhöhung des pH-Wertes der Milch von 6,6 auf 7,0 hat eine deutliche Erhö-

hung des Lactulosegehaltes in der wärmebehandelten Milch zur Folge. Untersuchungen der letzten Zeit haben weiterhin einen Einfluß des Fettgehaltes der Milch auf die Bildung von Lactulose erwiesen (20). Unter vergleichbaren Prozeßbedingungen weist eine Magermilch (1,5 %) deutlich höhere Lactulosegehalte als eine Vollmilch (3 %) auf. Da andere Hitzeindikatoren, wie die Furosinbildung oder die Molkendenaturierung im gleichen Sinne beeinflußt werden, geht Pelligrino (21) von einem geringeren Wärmeeintrag in Abhängigkeit vom Fettgehalt durch eine Erhöhung der Viskosität aus.

### 3.2 Lactulosebildung unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen der Sterilisierung

Die enzymatische Analyse der unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen der Sterilisierung hergestellten Milchproben ergab mit der Prozeßtemperatur und äquivalenter Heißhaltezeit ansteigende Lactulosegehalte (Tab. 1). Bei der Herstellung der Sterilmilchen wurde ein Temperaturbereich von 110 °C bis 135 °C erfaßt. Es wurden Heißhaltezeiten bis 3000 sec eingehalten, die weit über die molkereiüblichen Sterilisierungsbedingungen hinausgehen. Im Gegensatz zum Hitzeindikator Furosin, der mit steigender Hitzebelastung ein Maximum durchläuft, werden für den Hitzeindikator Lactulose steigende Gehalte selbst im oberen Temperaturbereich bis zur längsten Heißhaltezeit beobachtet. Lactulose weist also als Endprodukt der LA-Transformation eine deutlich höhere thermische Stabilität auf als das Maillard-Zwischenprodukt Furosin. Auch bei sehr starken Hitzebelastungen erlaubt die Bestimmung des Lactulosegehaltes eine Charakterisierung der Wärmebelastung. Unter den untersuchten Prozeßbedingungen wurden Lactulosegehalte bis 700 mg/100 g Milch erhalten.

Die graphische Auftragung der Lactulosegehalte über die äquivalente Heißhaltezeit (Abb. 3) läßt nur für die Prozeßtemperatur von 110 °C eine lineare Abhängigkeit erkennen. Bei höheren Prozeßtemperaturen wird selbst bei den unteren Heißhaltezeiten kein linearer Bereich beobachtet. Die Bildung der Lactulose läßt sich im Sterilbereich somit nicht vereinfacht durch eine Reaktion nullter Ordnung beschreiben.

### 3.3 Betrachtung der reaktionskinetischen Parameter für die Bildung von Lactulose im Sterilbereich

Für die Bestimmung der Reaktionsordnung wurde von einer mittleren Lactosekonzentration in Milch von 4,5 % als Ausgangskonzentration ( $c_{ao} = 4500$  mg Lactose/100 g) ausgegangen. Abbildung 4 zeigt die graphische Auftragung von  $\log(c_{ao} - c_t / c_{ao})$  über die äquivalente Heißhaltezeit für die einzelnen Prozeßtemperaturen ( $c_t$  = Lactulosekonzentration in mg/100g zu den entsprechenden Heißhaltezeiten). Im gesamten Temperatur-Zeit-Bereich wird ein linearer Zusammenhang mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $r = -0,9753$  und  $-0,9940$  festgestellt (Tab. 3). Die Bildung von Lactulose im Verlauf der Erhitzung läßt sich im Sterilbereich somit durch eine Reaktion 1. Ordnung beschreiben. Lediglich die am stärksten belasteten Proben ST 5.4 und St 6.4 weisen deutlich geringere Lactulosege-

halte auf und wurden bei der Berechnung der reaktionskinetischen Parameter nicht berücksichtigt.

Bei starker Erhitzung erfolgt eine thermische Zerstörung der Fructosekomponente im Disaccharid Lactulose unter Freisetzung von Galactose (22). Um zu klären, ob ein thermischer Abbau von Lactulose unter Freisetzung von Galactose unter den hier gewählten Temperatur-Zeit-Bedingungen vorliegt, wurde eine Analyse des Galactosegehaltes in den Sterilmilchproben ST 6.1 bis 6.4 durchgeführt. Mit zunehmender Heißhaltezeit wird ein deutlicher Anstieg der Galactosekonzentration beobachtet (Tab. 4). Bei extrem langen Heißhaltezeiten (ST 5.4, 129 °C, 2622 sec; ST 6.4, 134 °C, 2970 sec) ist der thermische Abbau von Lactulose nicht mehr zu vernachlässigen und führt zu einer geringeren Lactulosebildung unter diesen Temperatur-Zeit-Kombinationen.

Ohne Berücksichtigung dieser extrem Hitze belasteten Milchproben ST 5.4 und ST 6.4 läßt sich die Bildung von Lactulose im Temperaturbereich von 110 °C bis 134 °C mit einer Reaktionskinetik 1. Ordnung beschreiben. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergeben sich die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten (Tab. 3). Die Änderung der Geschwindigkeitskonstanten mit der Temperatur erlaubt eine Abschätzung der Aktivierungsenergie  $E_A$  nach der Arrheniusgleichung. Durch Auftragung von  $\ln k$  gegen die reziproke absolute Temperatur ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden die Aktivierungsenergie. Für die Bildung von Lactulose im Temperatur-Zeit-Bereich der Sterilisierung wird eine Aktivierungsenergie  $E_A = 118,3 \text{ kJ/mol}$  erhalten. Der Arrheniusfaktor  $A$  ergibt sich aus dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden ( $A = 1,696 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ).

Zu den von anderen Autoren im UHT-Bereich erhaltenen Ergebnissen ergibt sich eine gute Übereinstimmung (Tab. 5), obwohl bei der reaktionskinetischen Auswertung im UHT-Bereich einer Reaktion 0. (pseudo) Ordnung zugrunde gelegt worden ist. Geier (23) ermittelte im Temperaturbereich von 130 - 150 °C bei indirekter Erhitzung eine Aktivierungsenergie von 114 kJ/mol und bei direkter Erhitzung von 74,2 kJ/mol. Andrews (24) bestimmte im UHT-Bereich unter Nutzung industrieller Anlagen und von Pilot-Erheizungsanlagen eine Aktivierungsenergie für die Lactulosebildung von 151 kJ/mol. Andrews und Prasad (18) ermittelten bei Erhitzung der Milch in Flaschen eine Aktivierungsenergie von 127,8 kJ/mol. Nangpal (10) bestimmte mittels indirekter UHT-Erheizung in einer Pilotanlage eine Aktivierungsenergie von 126 kJ/mol und bei direkter Erhitzung der Milch eine geringere Aktivierungsenergie von 111,3 kJ/mol. Nangpal konnte zeigen, daß die scheinbar geringere Aktivierungsenergie bei direkter Erhitzung auf den durch die Zugabe von Dampf hervorgerufenen Verdünnungseffekt zurückzuführen ist. Die abweichenden Ergebnisse der reaktionskinetischen Untersuchungen in industriellen Anlagen und Pilot-Erheizungsanlagen machen die Schwierigkeiten der exakten Bestimmung der Zeit-Temperatur-Profile und der genauen Verweilzeit deutlich; über die Berechnung der äquivalenten Behandlungszeit (Heißhaltezeit) und die dabei zu beachtenden verfahrenstechnischen Aspekte wurde im 2. Kapitel berichtet.

Mithilfe der in der vorliegenden Arbeit im Sterilbereich ermittelten Geschwindigkeitskonstanten lassen sich die reaktionskinetischen Prozeßparameter für die Bildung von Lactulose, wie die Dezimalreduktionszeit  $D$ , der  $z$ -Wert und der  $Q_{10}$ -Wert bestimmen. Die Berechnung der Dezimalreduktionswerte erfolgte nach Gleichung

chung  $D = 2,303/k$ . Die Bestimmung des z-Wertes erfolgte gemäß (25) durch Auftragen von  $\log D$  über die entsprechende Prozeßtemperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ). Der  $Q_{10}$ -Wert ergibt sich nach Gleichung  $\log Q_{10} = 10/z$ . Der z-Wert einer chemischen Reaktion kann als Maß für die Hitzestabilität der Ausgangsstoffe (Lactose) angesehen werden.

Aus der Temperaturabhängigkeit des Dezimalreduktionswertes (Abb. 6) errechnet sich für die Lactulosebildung im Sterilbereich ein z-Wert von  $25,3^{\circ}\text{C}$  und ein  $Q_{10}$ -Wert von 2,48. Diese Werte stimmen exakt mit den von Nangpal (10) im UHT-Bereich bei indirekter Erhitzung erhaltenen Werte überein.

### 3.4 Lactulosebildung unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen des UHT-Bereiches

Im Bereich der Ultrahoherhitzung liegen umfangreiche Untersuchungen zum Lactulosegehalt in wärmebehandelten Milchen vor (3-14). Auch die meisten Untersuchungen zur Reaktionskinetik der Lactulosebildung beruhen auf Analysen von Milchproben, die indirekt oder direkt ultrahoherhitzt wurden (10,23,24). In der vorliegenden Arbeit wurden ergänzend Milchproben analysiert, die bei einer Prozeßtemperatur von  $140^{\circ}\text{C}$  und äquivalenten Heißhaltezeiten von 4 - 23 sec in einer Pilot-Anlage indirekt erhitzt wurden. Um den Einfluß der Homogenisierung und der damit verbundenen Wärmebelastung der Milchproben zu erfassen, wurden parallel zu Milchproben aus den homogenisierten Ausgangsmilchen (UT-Proben) auch Milchproben aus unbehandelter Rohmilch (RUT-Proben) hergestellt. In Übereinstimmung mit den bislang erhaltenen Ergebnissen wird sowohl für die Milchproben aus Ausgangsmilch wie auch für die Milchproben aus Rohmilch ein linearer Anstieg des Lactulosegehaltes mit der äquivalenten Heißhaltezeit beobachtet (Abb. 7). Die resultierenden Regressionsgeraden verlaufen jedoch nicht durch den Nullpunkt. Diese Beobachtung entspricht den Analysenergebnissen für den Furosingehalt dieser Milchen, bei denen eine vergleichbare Abweichung der Regressionsgeraden festgestellt wurde. Dies könnte ein Hinweis auf eine höhere Wärmebelastung der Milchproben sein, als es die aus den Temperatur-Profilen errechneten äquivalenten Heißhaltezeiten widerspiegeln (vgl. 2. Kapitel). Jedoch sind auch Einflüsse der komplexen Milchmatrix (Konzentrationschwankungen der einzelnen Komponenten, des Fettgehaltes, Änderungen im pH-Wert etc.) nicht auszuschließen. Im vorangegangenen Arbeiten konnte unter anderem ein deutlicher Einfluß des Fettgehaltes der Milch auf die erfolgte Hitzeschädigung nachgewiesen werden (20,21).

Die aus der Ausgangsmilch hergestellten UT-Proben weisen gegenüber den aus Rohmilch hergestellten RUT-Proben erhöhte Lactulosegehalte bei längeren Heißhaltezeiten auf (Tab. 6). Eine Vorschädigung der Ausgangsmilch durch die Wärmebelastung während der Homogenisierung ist nicht eindeutig nachweisbar. Der für die Ausgangsmilch bestimmte Lactulosegehalt von  $2,7 \text{ mg}/100 \text{ g}$  liegt im Bereich der Nachweisgrenze. Aufgrund der Wärmebelastung während der Homogenisierung ist der Lactuloseanstieg in den UT-Proben nicht zu erklären.

### 3.5 Betrachtung der reaktionskinetischen Parameter für die Bildung von Lactulose im UHT-Bereich

Aufgrund der linearen Abhängigkeit des Lactulosegehaltes von der äquivalenten Heißhaltezeit kann die Lactulosebildung im UHT-Bereich durch eine Reaktionskinetik 0. Ordnung beschrieben werden. Im Bereich kleiner Bildungsraten lassen sich auch Reaktionen höherer Ordnung als eine Reaktion nullter Ordnung beschreiben, solange ein linearer Anstieg in der Konzentration des Eduktes vorliegt. In den vorangegangenen Untersuchungen der Reaktionskinetik im UHT-Bereich (10,18,23,24) wurde vereinfachend eine Reaktion 0. (pseudo) Ordnung zu Grunde gelegt.

Die graphische Auftragung von  $\ln c_{ao} - c_l / c_{ao}$  gegen die äquivalente Heißhaltezeit ergibt sowohl für die RUT-Proben aus Rohmilch wie die UT-Proben aus Ausgangsmilch eine lineare Abhängigkeit (Abb. 8). Unter Vernachlässigung der auch hier zu beobachtenden Abweichung der Regressionsgeraden vom Nullpunkt kann die Bildungsreaktion von Lactulose im UHT-Bereich auch als Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden (Korrelationskoeffizient  $r = -0,9986$  für RUT-Proben und  $r = -0,9992$  für UT-Proben). Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten für die Bildungsreaktion von Lactulose bei  $140\text{ °C}$  ( $k(\text{RUT}) = 2,376 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(\text{UT}) = 3,318 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Der Dezimalreduktionswert läßt sich - bei Vorgabe einer Reaktion 1. Ordnung - nach  $D = 2,303/k$  berechnen. Diese im Ultrahoherhitzungsbereich ermittelte D-Werte für eine Prozeßtemperatur von  $140\text{ °C}$  können zur Bestimmung des z-Wertes aus den Daten des Sterilbereiches miteinbezogen werden. Unter Berücksichtigung eines mittleren log D-Wert von 3,908 für eine Prozeßtemperatur von  $140\text{ °C}$  ergibt sich ein z-Wert von  $23,0\text{ °C}$  und somit ein  $Q_{10}$ -Wert von 2,72 (Abb. 11).

### 3.6 Berechnung der Lactulosekonzentration im UHT-Bereich mit Hilfe der im Sterilbereich ermittelten reaktionskinetischen Parametern

Mithilfe der im Sterilbereich bestimmten Aktivierungsenergie  $E_A = 118,3 \text{ kJ/mol}$  und dem Arrheniusfaktor für eine Reaktion 1. Ordnung  $A = 1,696 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$  lassen sich für eine Prozeßtemperatur von  $140\text{ °C}$  unter Berücksichtigung der äquivalenten Heißhaltezeiten die zu erwartenden Lactulosekonzentrationen nach Gleichung (1) berechnen.

$$\text{Gleichung (1): } c_l = (1 - \exp(-A \exp(-E_A/RT) t)) c_{ao}$$

$c_l$  = Lactulosekonzentration bei den entsprechenden Heißhaltezeiten (mg/100 g)

$A$  = Arrheniusfaktor ( $\text{s}^{-1}$ )

$E_A$  = Aktivierungsenergie (J/mol)

$R$  = Universalgaskonstante (J/mol K)

$T$  = absolute Temperatur (K)

$c_{ao}$  = Ausgangskonzentration an Lactulose (mg/100 g)

Die für eine Prozeßtemperatur von  $140\text{ °C}$  für die einzelnen Heißhaltezeiten berechneten Lactulosekonzentrationen liegen deutlich unter den ermittelten Gehal-



ten (Tab. 7). Die graphische Auftragung der berechneten Lactulosegehalte über die äquivalenten Heißhaltezeiten (Abb. 7) macht deutlich, daß die berechneten Lactuloseergebnisse den in den RUT-Proben bestimmten Ergebnissen nach einer Parallelverschiebung durch den Nullpunkt entsprechen würden. Dies wurde analog auch für die Furosin-Gehalte der Milchen beobachtet (s. 4. Kapitel).

### **3.7 Lactulosebildung unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen der Pasteurisierung, Thermisierung und Hoherhitzung**

Unter den Temperatur-Zeit-Bedingungen der Pasteurisierung, Thermisierung und Hoherhitzung ist nur eine geringe Umlagerung der Lactose in Lactulose zu erwarten. In pasteurisierter Milch des Handels konnten in einigen Untersuchungen gaschromatographisch Lactulosegehalte bis 15 mg/100 g Milch nachgewiesen werden (3,8). Bei der Untersuchung von Handelsproben kann jedoch das Vorliegen von zu stark erhitzter Milchen nicht ausgeschlossen werden. Ob eine Analyse der geringen Lactulosegehalte in pasteurisierter Milch erfolgen kann, wird durch die Nachweisgrenze der angewandten Analysenmethode bestimmt. Die Nachweisgrenze der HPLC Referenz-Methode zur Analyse von Lactulose in Milch (6) liegt im allgemeinen bei 4 mg Lactulose/100 ml Milch. Die Verwendung zweier analytischer Säulen ermöglicht eine Verbesserung der Nachweißgrenze auf ca. 1 mg/100 ml (26). Resmini und Pellegrino (26) konnten in hochehitzter Milch (Prozeßtemperatur 90 - 95 °C, Heißhaltezeiten 13 und 38 sec) Lactulosegehalte zwischen 1,0 und 1,5 mg /100 ml nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lactulosegehalte in unter definierten Prozeßbedingungen hergestellten hochehitzten Milchen enzymatisch analysiert. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des enzymatischen Methode wurde Rohmilch des Versuchsgutes SchaedtbeK der Bundesanstalt für Milchforschung eingesetzt. Je nach Rohmilch wurden Nachweisgrenzen zwischen 1,8 und 2,3 mg/100 g bestimmt. Unbehandelte Rohmilch weist einen Blindwert, der einem Lactulosegehalt von 0,7 - 1,5 mg /100 g Milch entsprechen würde, auf. Selbst nach Abzug dieses Blindwertes treten analytisch in Rohmilch, die im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 5 mg/100g mit Lactulose aufgestockt wurde, leicht erhöhte Lactulosegehalte auf (Tab. 8). Im unteren Konzentrationsbereich wird der Lactulosegehalt wärmebehandelter Milchen mittels der amtlichen Methode vermutlich zu hoch bestimmt.

In der für die Hochehitzung eingesetzten homogenisierten Ausgangsmilchen werden Lactulosegehalte von 1,0 - 2,2 mg/100 g bestimmt. Von einem gesicherten Nachweis von Lactulose in den Ausgangsmilchen kann aufgrund der Nachweisgrenze der enzymatischen Bestimmung nicht ausgegangen werden. Die Lactulosegehalte der hochehitzten Milchproben liegen selbst bei der höchsten Prozeßtemperatur von 125 °C nur gering über der Nachweisgrenze (Tab. 9). Die teilweise deutlich erhöhten Ergebnisse des 5. Versuchstages (HE 1.5 - HE 5.5) wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen, da eine korrekte Bestimmung der jeweiligen Heißhaltezeit nicht möglich war. Für eine Prozeßtemperatur von 115 °C wurde ein linearer Anstieg des Lactulosegehaltes mit der äquivalenten Heißhaltezeit ermittelt (Abb. 9).

### 3.8 Betrachtung der reaktionskinetischen Parameter für die Bildung von Lactulose im HE-Bereich

Die graphische Auftragung von  $\ln c_{a0} - c_t / c_{a0}$  gegen die äquivalente Heißhaltezeit ergibt für eine Prozeßtemperatur von 115 °C im HE-Bereich eine lineare Abhängigkeit. Die ermittelten Lactulosekonzentrationen wurden um den mittleren Wert der Ausgangsmilchen reduziert. Es wurde von einer mittleren Lactosekonzentration in Milch von 4,5 % als Ausgangskonzentration ( $c_{a0} = 4500$  mg Lactose/100 g) ausgegangen. Die Bildungsreaktion von Lactulose kann auch im HE-Bereich als Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden (Korrelationskoeffizient  $r = -0,9784$ ). Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante  $k$  für die Lactulosebildung bei 115 °C von  $3,70 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Der Dezimalreduktionswert läßt sich nach  $D = 2,303/k$  berechnen. Der im Hoherhitzungsbereich ermittelte  $\log D$ -Wert für eine Prozeßtemperatur von 115 °C liegt geringfügig über den im Sterilbereich ermittelten Wert (Abb. 10).

### 3.9 Berechnung der Lactulosekonzentration im HE-Bereich mithilfe der im Sterilbereich ermittelten reaktionskinetischen Parametern

Mithilfe der im Sterilbereich bestimmten Aktivierungsenergie  $E_A = 118,3$  kJ/mol und dem Arrheniusfaktor für eine Reaktion 1. Ordnung  $A = 1,696 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$  lassen sich für eine Prozeßtemperatur von 115 °C unter Berücksichtigung der äquivalenten Heißhaltezeiten die zu erwartenden Lactulosekonzentrationen nach Gleichung (1) berechnen.

$$\text{Gleichung (1): } c_t = (1 - \exp(-A \exp(-E_A/RT) t)) c_{a0}$$

$c_t$  = Lactosekonzentration bei den entsprechenden Heißhaltezeiten (mg/100 g)

$A$  = Arrheniusfaktor ( $\text{s}^{-1}$ )

$E_A$  = Aktivierungsenergie (J/mol)

$R$  = Universalgaskonstante (J/mol K)

$T$  = absolute Temperatur (K)

$c_{a0}$  = Ausgangskonzentration an Lactose (mg/100 g)

Die für eine Prozeßtemperatur von 115 °C für die einzelnen Heißhaltezeiten berechneten Lactulosekonzentrationen sind den enzymatisch ermittelten Werten in Tabelle 10 gegenübergestellt. Für geringe Lactulosekonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze liegen die ermittelten Lactulosekonzentrationen wie vermutet deutlich über den berechneten. Aber auch für längere Heißhaltezeiten werden noch etwa um Faktor 2 erhöhte Lactulosegehalte bestimmt. Die große Abweichung der Probe HE 4.5 bestätigt nochmals die nicht korrekt berechnete Heißhaltezeit. Die korrekte äquivalente Heißhaltezeit müßte aufgrund des ermittelten Lactulosegehaltes bei 258 sec liegen.

#### 4. Korrelation der Lactulosegehalte mit den ermittelten Furosingehalten

Sowohl durch die Bildung von Lactulose aus Lactose wie auch die über Furosin nachgewiesene Bildung des Maillard-Zwischenproduktes Lactulosyllysin im Verlauf der Wärmebehandlung von Milch läßt sich das Ausmaß der Hitzebelastung der Milch charakterisieren. Im Bereich der UHT-Erhitzung, in der für beide Hitzeindikatoren lineare Bildungsgeschwindigkeiten für die einzelnen Prozeßtemperaturen beobachtet werden, besteht eine gute Korrelation zwischen dem Lactulose- und dem Furosingehalt (Abb. 11). Für die untersuchte Prozeßtemperatur von 140 °C wird eine Korrelation des Lactulosegehaltes mit dem Furosingehalt von 0,9997 erhalten. Im untersuchten Sterilbereich wird die nur bedingte Eignung des Hitzeindikators Furosin bei hoher Hitzebelastung deutlich. Eine Korrelation der Furosingehalte der Sterilmilchproben mit den ermittelten Lactulosegehalten (Korrelationskoeffizient  $r = 0,9074$ ) kann nur bei Furosingehalten unter 400 mg/100 g Protein festgestellt werden (Abb. 12). Der zunehmende Abbau des Zwischenproduktes Lactulosyllysin im Verlauf der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion läßt eine Charakterisierung der Wärmebelastung über den Furosingehalt nicht mehr zu.

#### 5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Lactulose entsteht während der Wärmebehandlung von Milch durch LA-Transformation aus Lactose. Aufgrund umfangreicher Untersuchungen wird Lactulose als geeigneter Hitzeindikator zur Klassifizierung von UHT- und Sterilmilch angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Lactulosegehalt in unter definierten Prozeßbedingungen hergestellten Milchproben untersucht, wobei erstmals der gesamte Temperatur-Zeit-Bereich der Thermisierung, Pasteurisierung (Kurz- und Langzeiterhitzung), Hoherhitzung, Ultrahoherhitzung und Sterilisierung erfaßt wurde. Der enzymatisch bestimmte Lactulosegehalt erwies sich als geeigneter Hitzeindikator für den UHT- und Sterilbereich. Selbst bei Temperatur-Zeit-Kombinationen (mit  $F_0$ -Werten bis ca. 200 min), die weit über den molkereiüblichen Sterilbereich hinausgehen, konnte die extreme Hitzebelastung der Milchproben durch den Lactulosegehalt problemlos charakterisiert werden. Im gesamten untersuchten Temperaturbereich von 110 - 140 °C läßt sich die Bildung von Lactulose durch eine Reaktionskinetik 1. Ordnung beschreiben. Es konnte eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 118,3 kJ/mol, ein  $z$ -Wert von 25,3 °C und ein  $Q_{10}$ -Wert von 2,48 ermittelt werden.

Die Eignung des Hitzeindikators Lactulose für den Pasteurisierungs/Thermisierungs- und Hoherhitzungsbereich wird durch die Nachweisgrenze der Analyse-methode begrenzt. Die enzymatische Analyse ermöglicht erst ab  $F_0$ -Werten von ca. 1 min (z.B. 125 °C, 26,9 sec) einen gesicherten Nachweis der durch die Wärmebehandlung gebildeten Lactulose (ab ca. 5 mg/100 g). Im Bereich der Pasteurisierung (Kurz- und Langzeiterhitzung), Thermisierung und Hoherhitzung sind jedoch geringere Lactulosegehalte zu erwarten. Aufgrund der ermittelten reaktionskinetischen Daten treten im HE-Bereich Lactulosegehalte zwischen 0,02

und 10 mg/100 g auf. Im Pasteurisierung und Thermisierungsbereich liegen die zu erwartenden Lactulosegehalte noch deutlich niedriger (zwischen 0,005 und 0,1 mg/100 g). Diese Lactulosegehalte liegen um mehrere Größenordnungen unter den Nachweisgrenzen der bislang verfügbar Analysenmethoden. Die Entwicklung einer empfindlicheren Analysenmethode für Lactulose, die eine Bestimmung der Lactulosegehalte auch unterhalb von 5 mg/100 g erlaubt, könnte den Anwendungsbereich des Hitzeindikators Lactulose auch auf schwach erhitzte Milchen ausweiten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann zusammenfassend festgestellt werden, daß Lactulose als chemischer Hitzeindikator für den UHT- und Sterilbereich für Sterilisationswerte zwischen  $F_0 = 1$  und 150 min geeignet ist, die Wärmebelastung der Milch zu charakterisieren.

## 6. Literatur

- (1) Berg, H.E.: Ph. D. thesis (1993), Agricultural University, Wageningen, Niederlande
- (2) Adachi, S.: Proc. 15th Int. Dairy Congr. (London) **3**, 1686 - 1691 (1959)
- (3) Martinez-Castro, I. und Olano, A.: Revista Espanoila Lecheria **110**, 213-217 (1978)
- (4) Geier, H. und Klostermeyer, H.: Milchwissenschaft **38**, 475-477 (1983)
- (5) Andrews, G.R.: J. Soc. Dairy Technol. **37**, 92-95 (1984)
- (6) IDF (1991) Standard 147
- (7) Reimerdes, E.H. und Rothkitt, K.D.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **181**, 408 - 411 (1985)
- (8) Corzo, N., Olano, A. und Martinez-Castro, I.: Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. **26**, 565 - 570 (1986)
- (9) Calvo, M.M., Klett, J.M., Santos, M.P. und Olano, A.: Rev. Esp. Lech. **16**, 11-13 (1987)
- (10) Nangpal, A.: Dissertation, Universität Kiel (1988)
- (11) Clawin-Rädecker, I., Kuhlmann, B., Weiß, G., Klostermeier, H. und Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **44**, 129-141 (1992)
- (12) Lopez-Fandino, R., Corzo, N., Villamiel, M., Delgado, T., Olano, A. und Ramos, M.: J. Food Prot. **56**, 263-264,269 (1993)
- (13) Andrews, G.R.: Int. Dairy Fed. Bull. **238**, 45 -52 (1989)
- (14) Andreini, R., Chiodi, J., De Noni, I., Resmini, P., Batelli, G., Cecchi, L., Todesco, R., Cattaneo, T.M.P., Rampilli, M. und Foschino, R.: Italy. Sci. Tecn. Latt.-Cas. **41**, 472-492 (1990)
- (15) Adachi, S. und Patton, S.: Journal of Dairy Science **44**, 1375 - 1393 (1961)
- (16) Richards, E.L. und Chandrasekhara, M.R.: J. Dairy Res. **27**, 59-66 (1960)
- (17) Greig, B.D. und Payne, G.A.: J. Dairy Res. **52**, 409-417 (1985)
- (18) Andrews, G.R. und Prasat, S.K.: J. Dairy Res. **54**, 207-218 (1987)
- (19) Montgemery, E.M. und Hudson, C.S.: J.A.C.S. **52**, 2101 (1930)
- (20) de Koning, P.J., Badings, H.T., van der Pol, J.J.G., Kaper, J. und Vos-Klomp maker, E.A.J.: Voedingamiddelentechnologie **23**, 11-14 (1990)
- (21) Pelligrino, L.: Neth. Milk Dairy J. **48**, 71-80 (1994)
- (22) Olano, A. und Martinez-Castro, I.: Milchwissenschaft **36**, 533-535 (1981)

- (23) Geier, H.: Dissertation, TU München (1984)
- (24) Andrews, G.R.: J. Dairy Res. 52, 275 (1985)
- (25) Wallhäuser, K.H.: Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)
- (26) Pelligrino, L., Resmini, P. und Luf, W.: „Assessment (Indices) of Heat Treatment of Milk“, 409-453, In: Heat-Induced Changes in Milk, ed. P.F. Fox, IDF, Brüssels, Belgium (1995)

**Tabelle 1****Lactulosegehalte in Milchen des Handels**

Autor	Analysenmethode	Produkt	Lactulosegehalt [mg/100 ml]
Martinez-Castro und Olano (3)	Gaschromatographie	past. Milch	4 - 15
		UHT-Milch	20 - 30
		Sterilmilch	85 - 200
Geier und Klostermeyer (4)	Enzymatisch	UHT-Milch	10 - 51
		Sterilmilch	103 - 137
Andrews (5)	Enzymatisch	Past. Milch	0
		UHT-Milch (indir.)	15 - 75
		UHT-Milch (dir.)	5 - 10
		Sterilmilch	69 - 110
Reimerdes und Rothkitt (7)	Ionenaustausch- chromatographie	UHT-Milch	30 - 49
		Sterilmilch	68 und 87
Corzo et al. (8)	Gaschromatographie	Past. Milch	0 - 8
		UHT-Milch (dir.)	10 - 30
		UHT-Milch (indir.)	30 - 90
		Sterilmilch	50 - 130
Calvo et al. (9)	Gaschromatographie	UHT-Milch (dir.)	9 - 25
		UHT-Milch (indir.)	31 - 57
		Sterilmilch	51 - 184
Clawin-Rädecker et al. (11)	Enzymatisch und Gaschromatographie	UHT-Milch	12,6 - 56,1
Lopez-Fandino (12)	Gaschromatographie	UHT-Milch (dir.)	15,4 - 67,0
		UHT-Milch (indir.)	22,7 - 143,0
Andrews (13)	Enzymatisch	UHT-Milch (dir.)	9,9 - 17,5
		UHT-Milch (indir.)	19,5 - 66,9
		Sterilmilch	57,3 - 168,0
Andreini et al. (14)	HPLC	Past. Milch	0
		UHT-Milch (dir.)	4,1 - 56,6
		UHT-Milch (indir.)	18,0 - 135,8
		Sterilmilch	41,2 - 163,3

**Tabelle 2****Gehalte an Lactulose im Sterilbereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquiv. Heiß- haltezeit $\tau$ (s)	Lactulose [mg/100 g]	F <sub>0</sub> (min)
ST 1.1	110	13,8	21,0	0,28
ST 1.2	"	440,4	40,5	0,57
ST 1.3	"	1224	72,8	1,26
ST 1.4	"	2610	138,5	2,68
ST 2.1	114	199,8	31,7	0,65
ST 2.2	"	594	88,7	1,93
ST 2.3	"	1209	147,9	4,02
ST 2.4	"	2520	222,6	8,20
ST 3.1	119	194,4	56,5	2,00
ST 3.2	"	609,6	133,4	6,27
ST 3.3	"	1416	224,5	11,81
ST 3.4	"	2430	302,7	20,30
ST 4.1	125	150	87,6	6,14
ST 4.2	"	571,8	199,8	23,4
ST 4.3	"	1314	301,7	42,7
ST 4.4	"	2040	413,7	84,0
ST 5.1	129	138	99,0	14,3
ST 5.2	"	678	292,5	71,0
ST 5.3	"	1393	417,9	143,0
ST 5.4	"	2622	527,0	269,5
ST 6.1	134	156	165,7	51,2
ST 6.2	"	780	429,1	255
ST 6.3	"	1122	566,4	364
ST 6.4	"	2970	678,6	966

**Tabelle 3****Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter im Sterilbereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ [°C]	$r^{(1)}$	$k(s^{-1})$	log D
ST 1.1 - 1.4	110	- 0,9891	- $1,10 \cdot 10^{-5}$	5,321
ST 2.1 - 2.4	114	- 0,9777	- $1,97 \cdot 10^{-5}$	5,068
ST 3.1 - 3.4	119	- 0,9940	- $3,30 \cdot 10^{-5}$	4,844
ST 4.1 - 4.4	125	- 0,9805	- $4,41 \cdot 10^{-5}$	4,718
ST 5.1 - 5.4	129	- 0,9753(4)	- $6,77 \cdot 10^{-5}$	4,532
ST 6.1 - 6.4	134	- 0,9906(5)	- $11,40 \cdot 10^{-5}$	4,305

- (1) Korrelationskoeffizient der linearen Regression (bei Auftragung von  $\log \left( \frac{C_{AO} - C_L}{C_{AO}} \right)$  über die äquivalente Heißhaltezeit  $\tau$  (s) mit  $C_{AO} = 4500$  mg Lactose/100 g  
 (2) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$   
 (3) Dezimalreduktionswert  $D = 2,303/k$   
 (4) ohne ST 5.4  
 (5) ohne ST 6.4

**Tabelle 4****Gehalte an Galactose**

Proben	Prozeßtemperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	Galactose (%)
ST 6.1	134	156	0,022
ST 6.2	"	780	0,108
ST 6.3	"	1122	0,166
ST 6.4	"	2970	0,261



**Tabelle 5****Reaktionskinetische Daten der Lactulosebildung in wärmebehandelter Milch**

Quelle	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	Erhitzung	Aktivierungs- energie (kJ/mol)	Arrhenius- faktor (mg/ls)	z-Wert (°C)
Geier (23)	130 - 145	indir. UHT	114	$8,04 \cdot 10^{15}$	27,7
	130 - 155	dir. UHT	74,2	$1,69 \cdot 10^5$	44
Andrews (24)		UHT	151		
Andrews (18)	70 - 131	Sterilisation	127,8	$1,53 \cdot 10^{14}$	
Nangpal (10)	120 - 150	dir. UHT	111,3	$1,189 \cdot 10^{15}$	28,6
	120 - 150	indir. UHT	126,0	$1,084 \cdot 10^{17}$	25,3
Clawin-Rädecker	110 - 134	Sterilisation	118,3	$1,696 \cdot 10^{11*}$	25,3

\* Arrheniusfaktor in  $[s^{-1}]$ **Tabelle 6****Gehalte an Lactulose im UT-Bereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	Lactulose (mg/100 g)	F <sub>0</sub> (min)
RM	-	-	0,7	-
RUT 1.1	140	4	14,1	5
RUT 1.2	"	8	18,1	10
RUT 1.3	"	12	23,4	15,5
RUT 1.4	"	23	34,2	30
AM	-	-	2,7	-
UT 1.1	140	4	13,6	5
UT 1.2	"	8	19,0	10
UT 1.3	"	12	26,1	15,5
UT 1.4	"	23	41,6	30

**Tabelle 7**

**Berechnung der Lactulosekonzentration im UHT-Bereich nach reaktionskinetischen Parametern im Sterilbereich**

Probe	Prozeßtemperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	berechneter Lactulosegehalt (mg/100 g)	ermittelter Lactulosegehalt (mg/100 g)
UT 1.1	140	4	3,3	13,6
UT 1.2	"	8	6,7	19,0
UT 1.3	"	12	10,0	26,1
UT 1.4	"	23	19,1	41,6
RUT 1.1	140	4	3,3	14,1
RUT 1.2	"	8	6,7	18,1
RUT 1.3	"	12	10,0	23,4
RUT 1.4	"	23	19,1	34,2

**Tabelle 8**

**Bestimmung der Nachweisgrenze der enzymatischen Analyse von Lactulose nach der Amtlichen Methode (§ 35 LMBG)**

Lactulosegehalt [mg / 100 g]			
Rohmilch A		Rohmilch B	
nach Einwaage	nach Analyse*	nach Einwaage	nach Analyse*
0	1,31 ± 0,34	0	0,70 ± 0,38
1,0	2,43 ± 0,80	1,4	2,44 ± 0,47
2,0	3,67 ± 0,37	2,5	4,14 ± 0,11
3,2	5,01 ± 0,38	3,4	4,98 ± 0,09
4,1	4,90 ± 0,46	4,3	5,78 ± 0,32
5,1	6,68 ± 0,36	5,0	6,38 ± 0,87

\* Mittelwerte aus 10-fach-Bestimmung (Rohmilch), bzw. 3-fach-Bestimmung (aufgestockte Rohmilch)

**Tabelle 9****Gehalte an Lactulose im HE-Bereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	Lactulose (mg/100 g)	$F_0$ (min)
HE 1.1	86	5,75	n.b.	$0,2 \cdot 10^{-4}$
HE 1.2	"	15	"	$0,6 \cdot 10^{-4}$
HE 1.3	"	25,8	"	$1,6 \cdot 10^{-4}$
HE 1.4	"	45,9	"	$2,6 \cdot 10^{-4}$
HE 1.5*	"	48,6	"	$3,0 \cdot 10^{-4}$
HE 2.1	95	5,4	"	$0,23 \cdot 10^{-3}$
HE 2.2	"	14,8	"	$0,67 \cdot 10^{-3}$
HE 2.3	"	25,7	"	$1,29 \cdot 10^{-3}$
HE 2.4	"	45,6	"	$2,10 \cdot 10^{-3}$
HE 2.5*	"	62,4	3,6	$2,60 \cdot 10^{-3}$
HE 3.1	105	5,3	n.b.	$0,216 \cdot 10^{-2}$
HE 3.2	"	14,7	n.b.	$0,6 \cdot 10^{-2}$
HE 3.3	"	25,5	2,9	$1,4 \cdot 10^{-2}$
HE 3.4	"	45,5	3,9	$1,86 \cdot 10^{-2}$
HE 3.5*	"	84	14,5	$3,4 \cdot 10^{-2}$
HE 4.1	115	5,36	3,5	$0,22 \cdot 10^{-1}$
HE 4.2	"	14,8	3,7	$0,6 \cdot 10^{-1}$
HE 4.3	"	25,6	6,2	$0,35 \cdot 10^{-1}$
HE 4.4	"	45	9,7	$1,8 \cdot 10^{-1}$
HE 4.5*	"	49,2	43,0	$2,0 \cdot 10^{-1}$
HE 5.1	125	6,48	4,3	0,27
HE 5.2	"	16,2	5,8	0,75
HE 5.3	"	26,88	6,3	1,26
HE 5.4	"	46,2	9,2	1,90
HE 5.5*	"	51	43,1	2,09

\* Die Temperatur-Zeit-Kombinationen HE 1.5-HE 5.5 wurden in die reaktionskinetische Auswertung nicht einbezogen, da eine korrekte Bestimmung der jeweiligen äquivalenten Heißhaltezeit nicht möglich war.

n.b. = nicht bestimmbar.

**Tabelle 10****Berechnung der Lactulosekonzentration im HE-Bereich nach reaktionskinetischen Parametern im Sterilbereich**

Probe	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	berechneter Lactulosegehalt (mg/100 g)	ermittelter Lactulosegehalt (mg/100 g)
HE 4.1	115	5,4	0,5	3,5
HE 4.2	"	14,8	1,3	3,7
HE 4.3	"	25,6	2,3	6,2
HE 4.4	"	45,0	4,1	9,7
HE 4.5	"	49,2*	4,4	43,0

\* die korrekte äquivalente Heißhaltezeit müßte aufgrund des ermittelten Lactulosegehaltes bei 258 s liegen

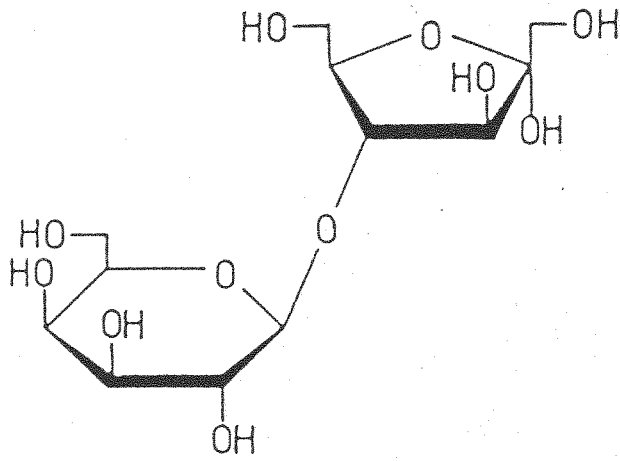


Abb. 1: Lactulose

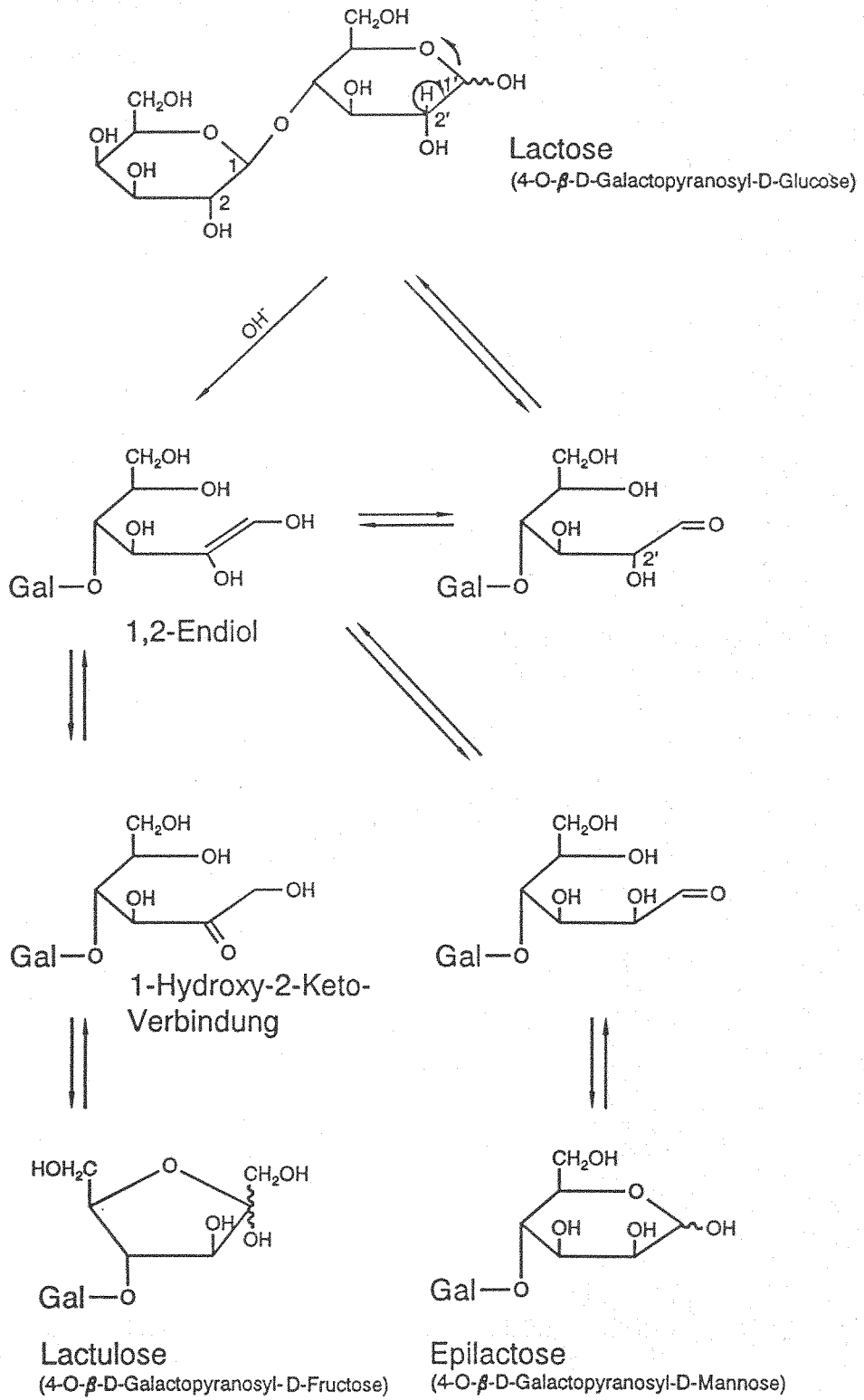


Abb. 2: LA-Transformation

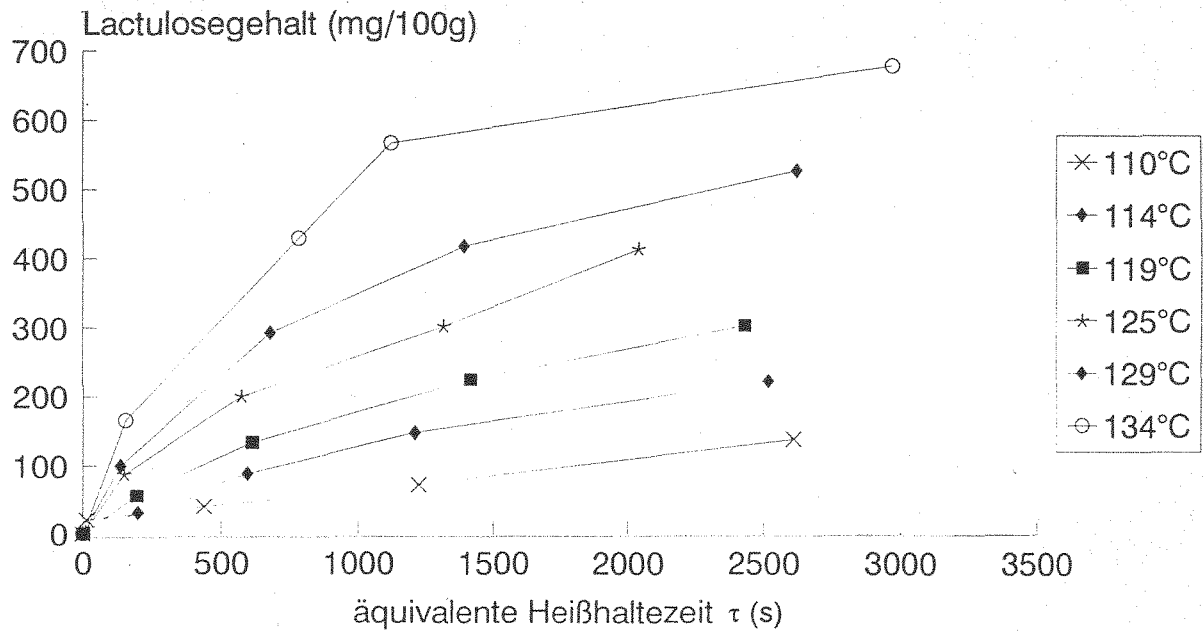


Abb. 3: Lactulosegehalt in Milchproben bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit im Sterilbereich

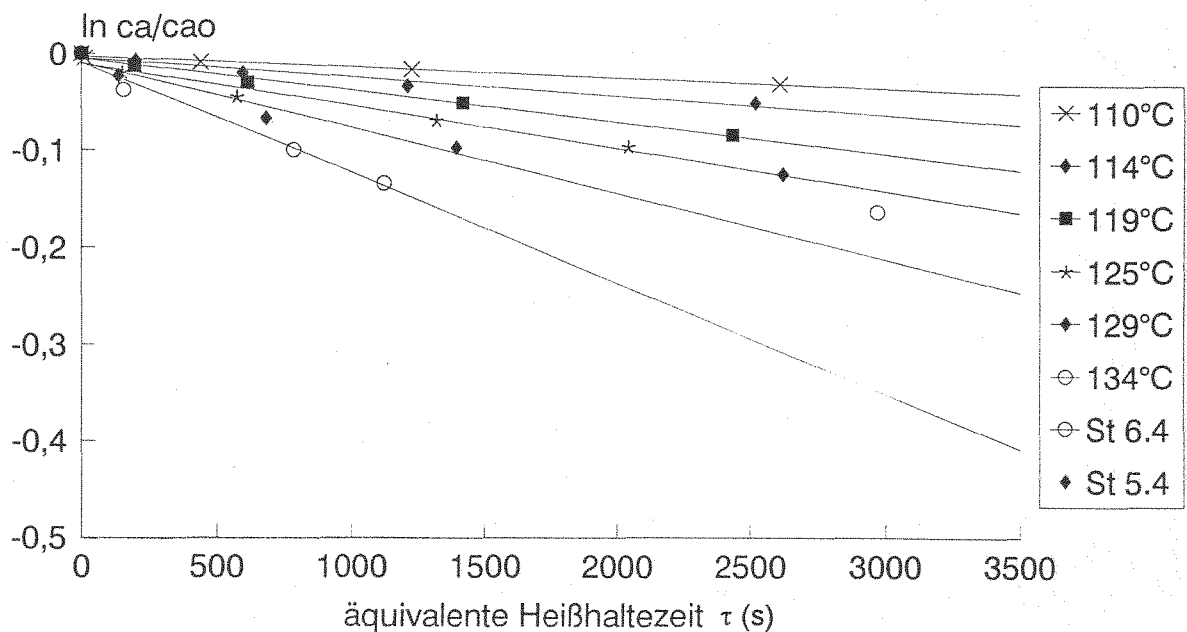


Abb. 4: Lactulosegehalt in Milchproben bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit im Sterilbereich

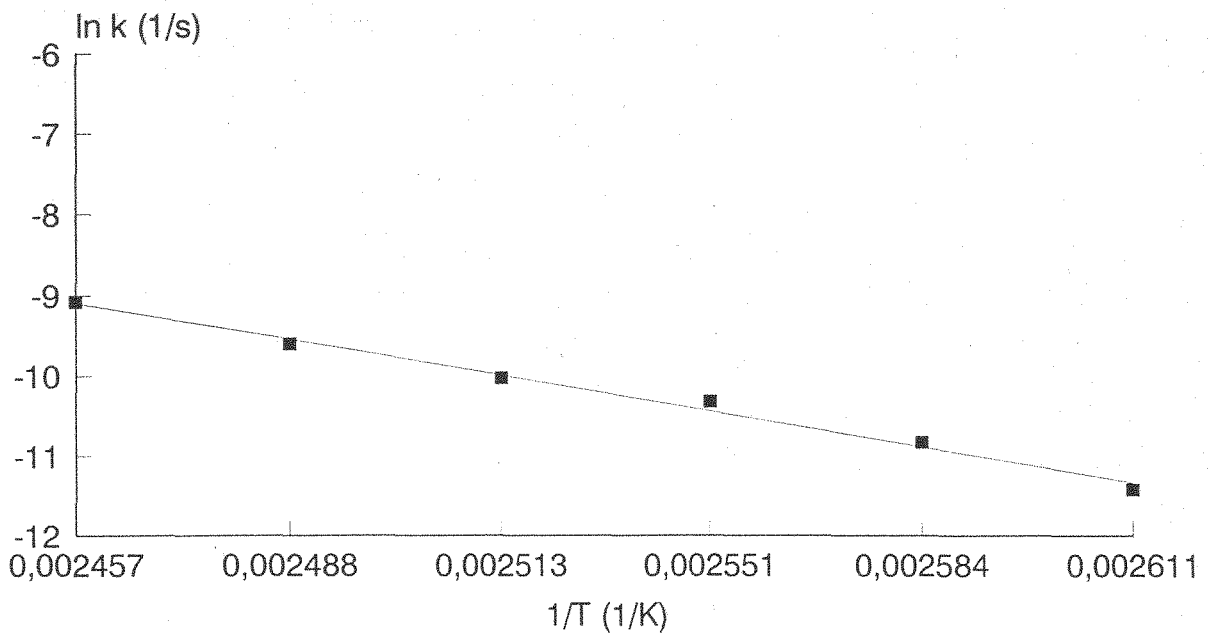


Abb. 5: Arrheniusplot für die Lactulosebildung im Sterilbereich

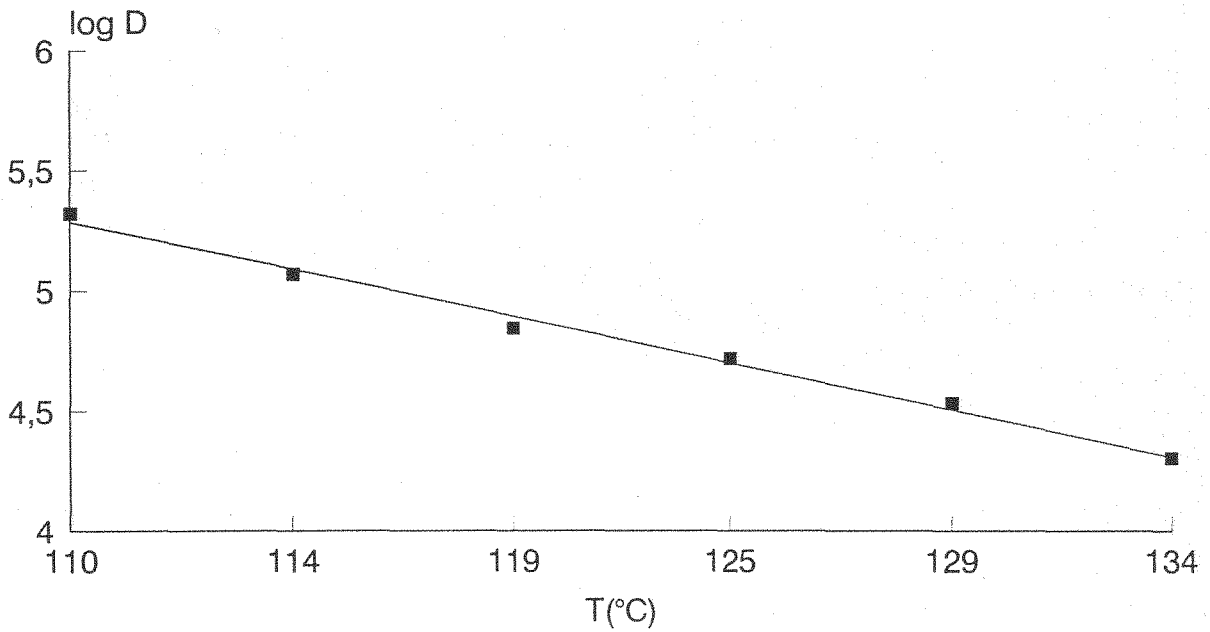


Abb. 6: Bestimmung des z-Wertes für die Bildung von Lactulose im Sterilbereich



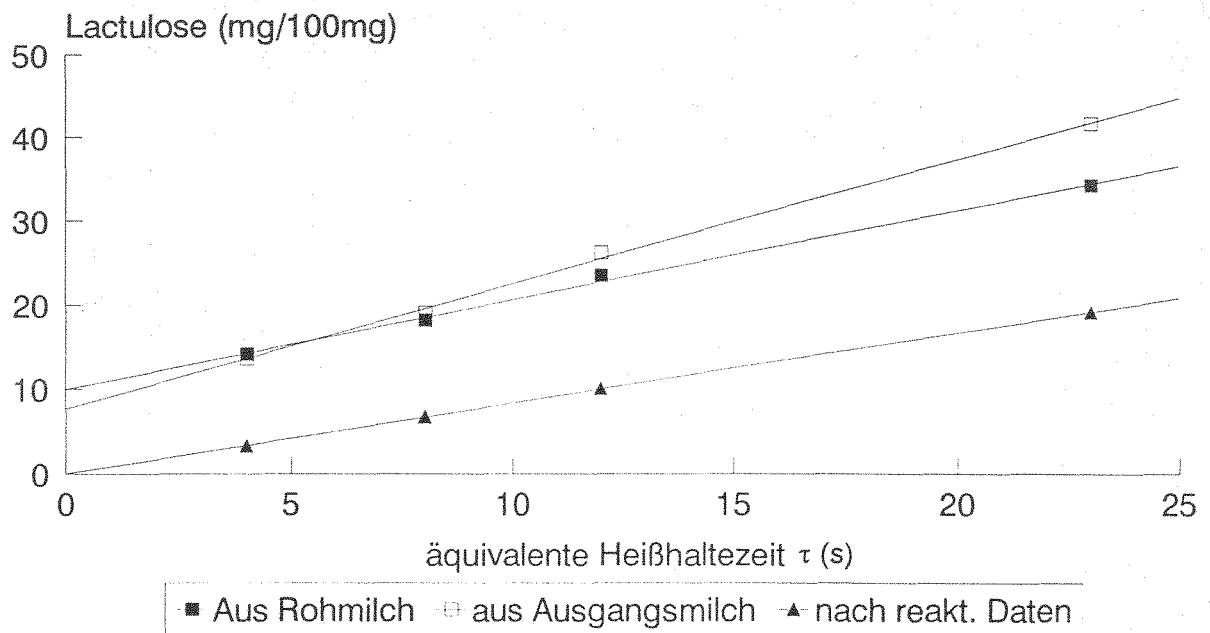


Abb. 7: Lactulosegehalt in Milchproben bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit (UT-Bereich)

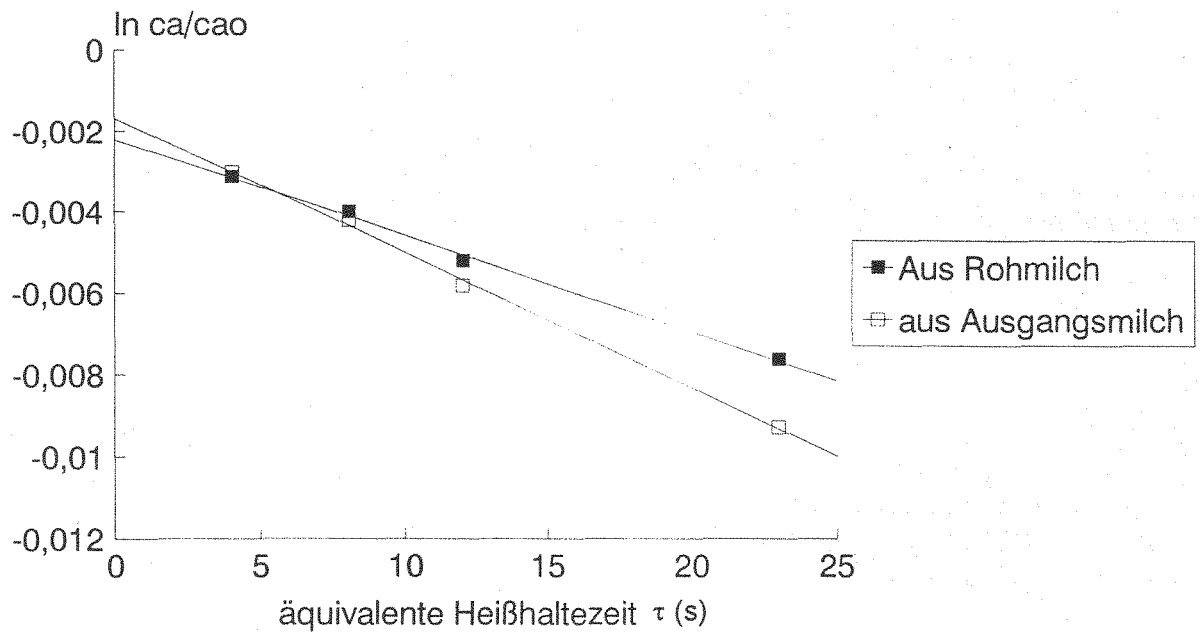


Abb. 8: Lactulosegehalt in Milchproben bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit (UT-Bereich)

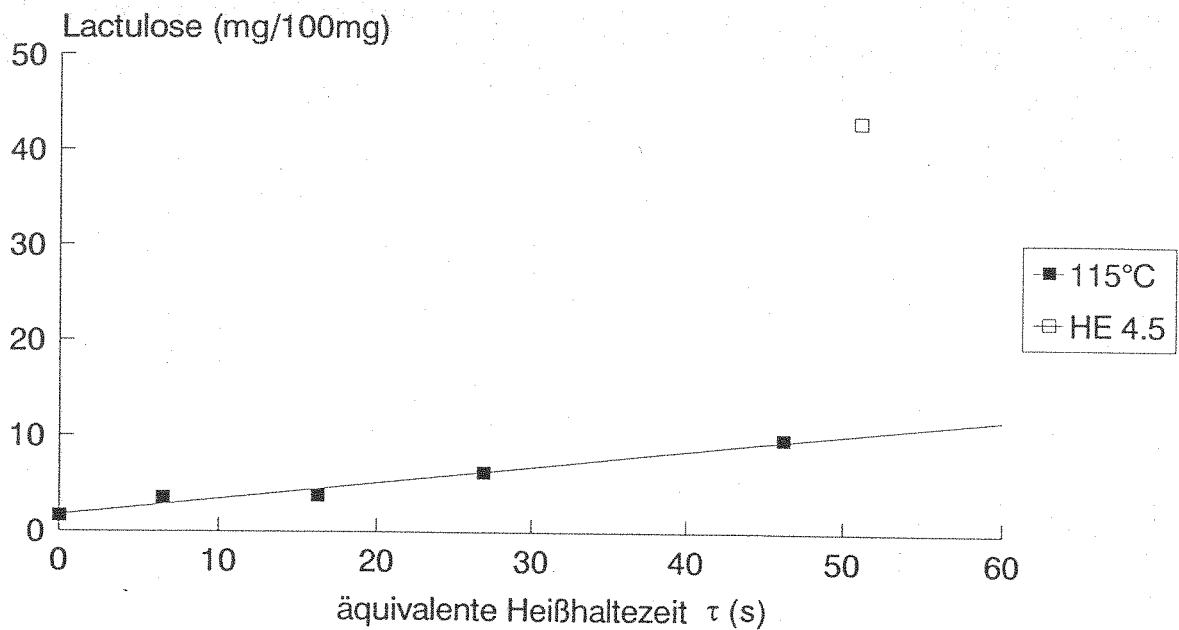


Abb. 9: Lactulosegehalt in Milchproben bei einer Prozeßtemperatur von 115 °C in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit (HE-Bereich)

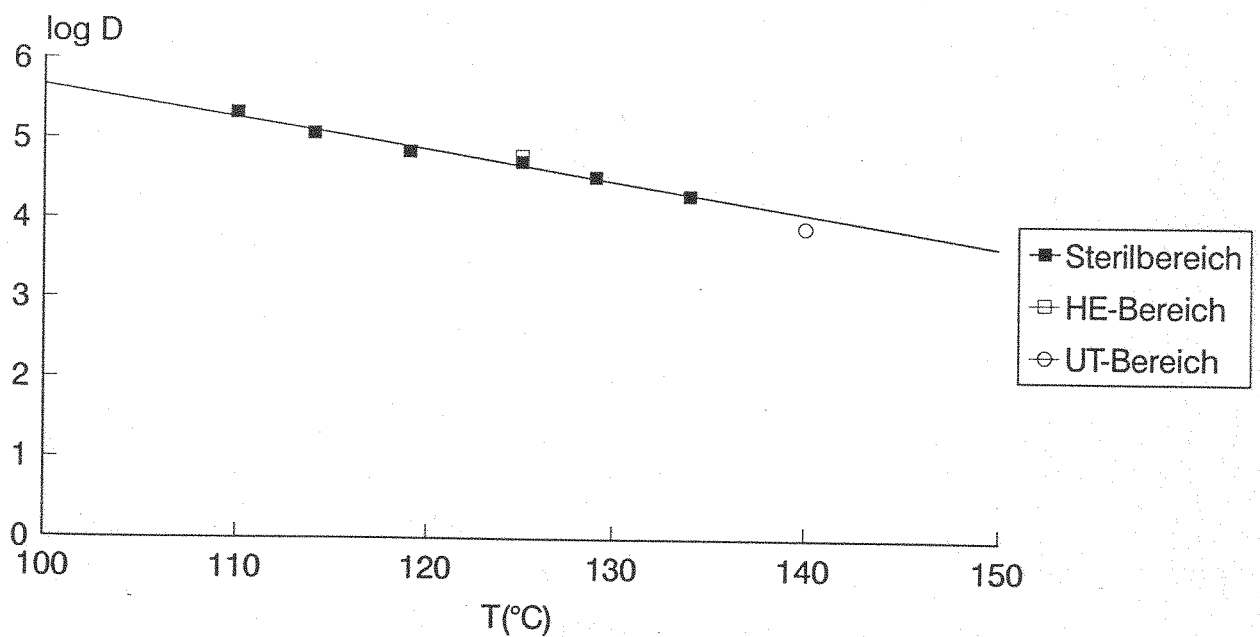


Abb. 10: Bestimmung des z-Wertes für die Bildung von Lactulose

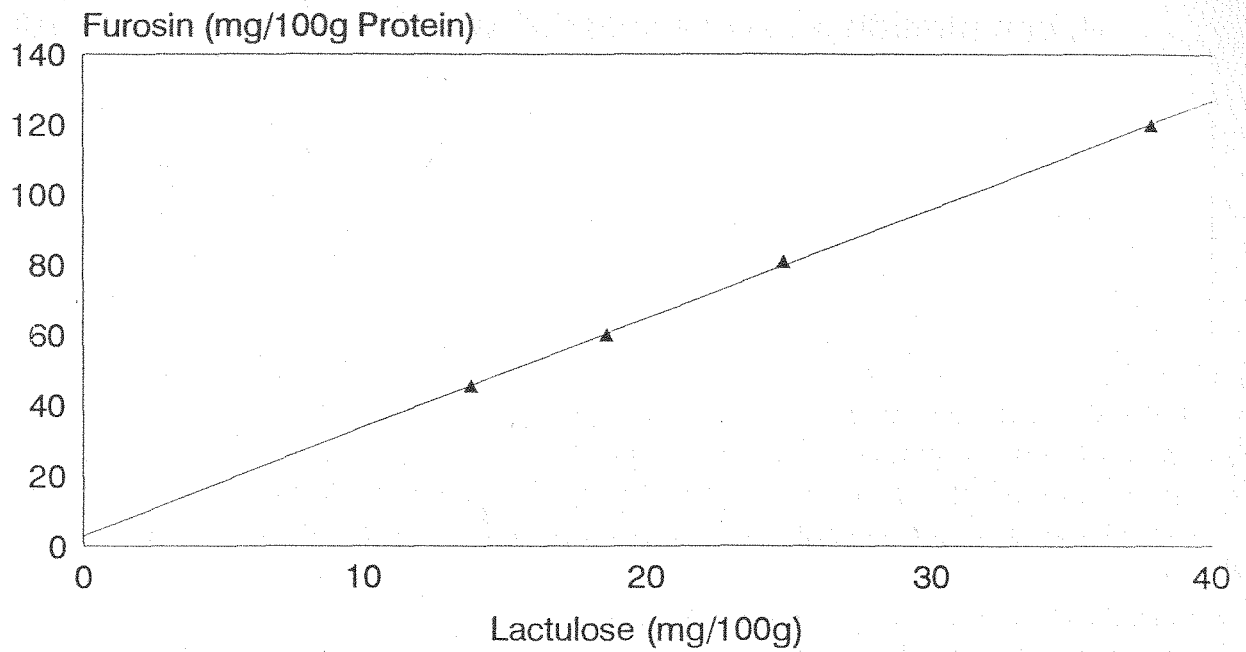


Abb. 11: Korrelation des Furosingehaltes mit dem Lactulosegehalt in Milchproben aus dem Ultrahoherhitzungsbereich

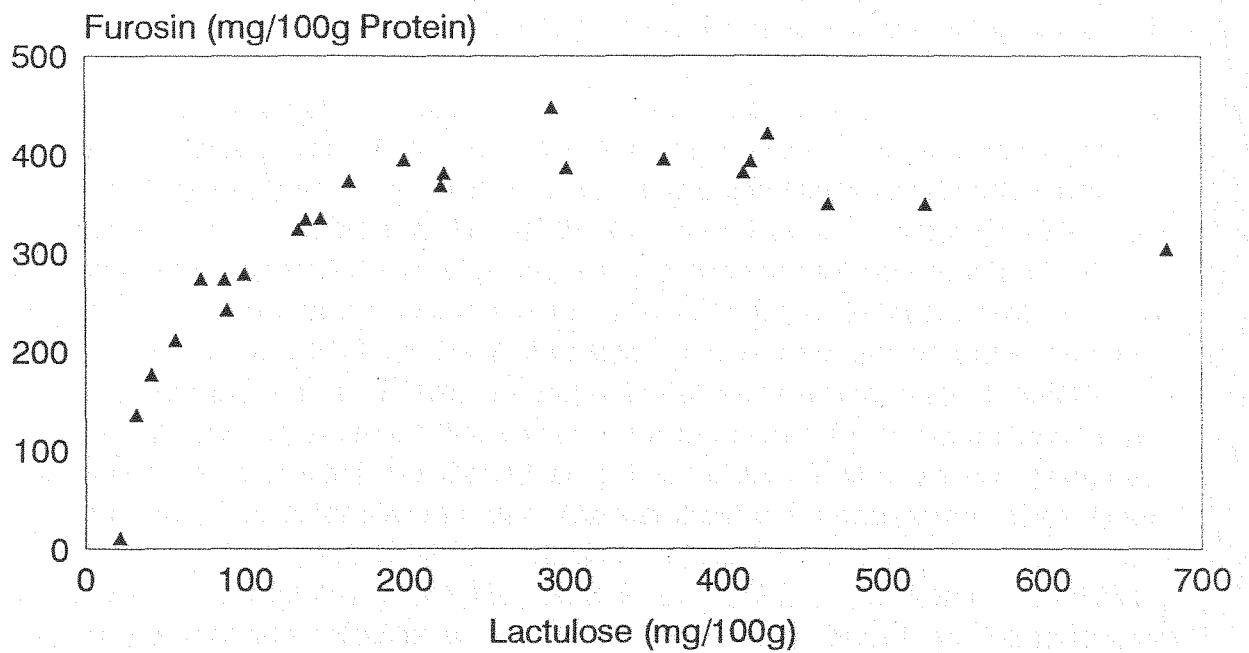


Abb. 12: Korrelation des Furosingehaltes mit dem Lactulosegehalt in Milchproben aus dem Sterilbereich