

6. Kapitel

Kinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung des 1-Methyladenosins in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen des Steril- und des Ultrahoherhitzungsbereiches

D. Martin, C. Kiesner und E. Schlimme

1. Einleitung

Ribonucleoside sind niedermolekulare minore Inhaltsstoffe der Milch (1-6). Sie zeigen ein artentypisches Muster (2-5). Neben Adenosin, Cytidin, Guanosen, 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 $\mu\text{mol/l}$ 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). Im vorliegenden Bericht wird über die reaktionskinetische Analyse der Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin in Milch im erweiterten Sterilbereich und über ergänzende Untersuchungen im Bereich der Ultrahoherhitzung berichtet.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung der Milchproben

2.1.1 Herstellung der Sterilmilchproben

Für die Herstellung der Sterilmilchproben wurde Sammelmilch der Versuchsstation Schaedtbeek 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 bei ca. 40 °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 liquid-

chromatographischen Analysen gereinigt. Die erhaltenen Seren wurden bis zur Analyse bei -21°C gelagert.

2.1.2 Herstellung der Ultrahocherhitzungsmilchproben

Die Milchproben des Ultrahocherhitzungsbereichs (RUT) wurden aus Rohmilch (Sammelmilch von 30 Tieren; aus dem Morgengemelk, Fettgehalt: 3,73 %) der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung hergestellt. Zur Wärmebehandlung wurde eine Versuchsanlage zur kontinuierlichen Erhitzung von Milchen genutzt. Für die Herstellung der UHT-Proben (UT) wurde dieselbe Rohmilch verwendet, bei ca. 70°C homogenisiert und danach der vorgenannten Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milchen zugeführt. Die Erwärmung der Milch auf eine definierte Temperatur erfolgte in dieser Anlage über einen Spiralrohrerwärmer unter Verwendung unterschiedlicher Heißhaltemodule für die Einstellung verschiedener Heißhaltezeiten. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die erhaltenen Versuchsmilchen auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt.

2.2 Nachweis der Ribonucleoside in den Milchproben

Der qualitative und quantitative Nachweis von Ribonucleosiden erfolgte mittels eines Zweisäulen-HPLC-Analysators (9). Die systeminterne Konfiguration erlaubt die chemoselektive kovalente Bindung der in 2',3'-Position befindlichen ribosidischen Hydroxygruppen und damit eine direkte Analyse aus unterschiedlichen biologischen Matrices (9-13), so auch aus den in dieser Arbeit untersuchten Milchseren.

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-threonyladenosin (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 Photodiodenarray-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 $\tau = 0$ s; c_{Bt} = Konzentration an m6Ado nach einer bestimmten Heißhaltezeit τ) über die entsprechende äquivalente Heißhaltezeit τ (s). Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurden gemäß (14) die jeweilige Geschwindigkeitskonstante 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, 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 Ultrahocherhitzungsbereich 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).

3.2 Bildung von N6-Methyladenosin in wärmebehandelten Milchen

3.2.1 Temperatur-Zeit-Bedingungen des Sterilbereiches

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. 1). 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 $^{\circ}\text{C}$ 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. 2).

Es wurde allerdings beobachtet, daß bei Prozeßtemperaturen ≥ 129 $^{\circ}\text{C}$ und Heißhaltezeiten von mehr als 3,6 min (entsprechend F_0 -Werten > 22 min) 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. 2). Im Temperaturbereich zwischen 110 - 119 $^{\circ}\text{C}$ 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 Geschwindigkeitskonstanten und die Halbwert-

zeiten 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 Geschwindigkeitskonstanten 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. 2) 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. 2D) 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-threonyladenosen-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).

3.2.2 Temperatur-Zeit-Bedingungen des Ultrahoherhitzungsbereiches

Zusätzlich zu den Beprobungen im ausgedehnten Sterilbereich wurden - in Ergänzung der reaktionskinetischen Untersuchungen (8) der in einer direkten Piloterhitzungsanlage gewonnenen UHT-Milchproben - weitere Milchproben unter Ultrahoherhitzungsbedingungen gewonnen. Dabei wurde in parallelen Versuchen neben der homogenisierten Ausgangsmilch die unbehandelte Rohmilch erhitzt, um zu prüfen, ob bei der Dimroth-Umlagerung ein Einfluß der Homogenisierung bei identischen Sterilationswerten beobachtet werden kann. Die Untersuchungen, die bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C ausgeführt wurden zeigen keinen Homogenisierungseffekt auf die Dimroth-Umlagerung (Tab. 2). Die Ergebnisse der reaktionskinetischen Untersuchungen stimmen mit denen einer vorläufigen Studie (8) sehr gut überein.

3.3 Berechnung der D-Werte und des z-Wertes

Die Dezimalreduktionswerte (D-Werte) geben die Zeit an, die notwendig ist, um bei einer bestimmten vorgegebenen Prozeßtemperatur 90 % des m1Ado in das Umlagerungsprodukt m6Ado zu überführen. In Tabelle 3 sind die D-Werte für die in den Versuchsreihen ST 1 - ST 3 gewählten Temperatur-Zeit-Bedingungen aufgelistet. Zusätzlich wurden die D-Werte für den Temperaturbereich von 125 - 134 °C abgeschätzt, da in den Versuchsreihen ST 4 - ST 6 eine Auswertung der thermisch bedingten Umlagerung von m1Ado in m6Ado nur bis zu Heißhaltezeiten möglich war, die einen F_0 -Wert von 22 min nicht überschritten (Abb. 3); Milchen in diesem Sterilbereich zeigten nur eine leichte Gelbfärbung durch Bräunungspigmente.

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. 4). Werden neben den D-Werten für den Temperaturbereich 110 - 119 °C auch die D-Werte aus reaktionskinetischen Untersuchungen im Bereich der Ultra- und Hocherhitzung (8) sowie die in der vorliegenden UT-Untersuchung erhaltenen Werte (Tab. 3) 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 26,8 °C (Tab. 3, Abb. 4). 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 bisherige Befunde über die Dimroth-Umlagerung bei der Ultra- und Hocherhitzung von Milch (8) und stimmen mit anderen in der Literatur berichteten z- und Q_{10} -Werten thermisch-induzierter chemischer Reaktionen in Milch (Tab. 4) sehr gut überein. Für Temperatur-Zeit-Kombinationen im Sterilbereich zwischen 110 und 134 °C und Heißhaltezeiten, die einen F_0 -Wert von 22 min nicht überschreiten (Abb. 3), 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.

4. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Eine auf 3,5 % Fettgehalt eingestellte und homogenisierte Milch sowie Rohmilch wurde jeweils unter definierten Temperatur-Zeit-Bedingungen im Steril- und Ultra- und Hocherhitzungsbereich erhitzt. Die liquidchromatographischen Analysen der Milchproben ergaben, daß die Dimroth-Umlagerung zum N6-Methyladenosin im untersuchten Bereich einer Reaktionskinetik 1. Ordnung unterliegt. Die aus den jeweiligen temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten 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 Temperaturen 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 im Bereich der Ultrahoherhitzung (bis $F_0 = 30$ min) und aus vorlaufenden 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 für Temperatur-Zeit-Kombinationen, bei denen die Sterilisationswerte zwischen 0,5 und 22 min liegen.

Anmerkung: Teile der Arbeit wurden aus Gründen der Prioritätssicherung vorab publiziert: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **47**, 75-86 (1995).

5. 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
- (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)

Tabelle 1

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

Proben	Prozeß- temperatur ϑ (°C)	Heißhalte- zeit (äquival.) τ (s)	m1Ado c_{A0} ($\mu\text{mol/l}$) ^b	m6Ado c_{Bt} ($\mu\text{mol/l}$) ^c	Geschwindig- keitskonstante ^d k [s^{-1}] ^d	Halbwertszeit ^f	
						r^e	$\tau_{1/2}$ [s]
ST 1.2 ^a - 1.4	110	13,8; 440,4; 1224; 2610	0,40; 0,41; 0,41; 0,41	0,06; 0,12; 0,22; 0,26	$3,795 \times 10^{-4}$	-0,9634	1826,5
ST 2.1 - 2.4	114	199,8; 598,0; 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; 609,3; 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; 1214; 2040	0,39; 0,39; 0,39; 0,39	0,21; 0,27; 0,29; 0,32	$5,048 \times 10^{-3g}$	-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	$4,626 \times 10^{-3g}$	-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	$6,171 \times 10^{-3g}$	-1	110 ^g

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

(b) Konzentration von m1Ado ($\mu\text{mol/l}$) in der Fett-eingestellten, thermisierten und homogenisierten Versuchsmilch vor der Erhitzung.

(c) Konzentration von m6Ado ($\mu\text{mol/l}$) in der Versuchsmilch nach der jeweiligen Heißhaltezeit τ (s).

(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 $t = 0\text{s}$ und der kürzesten Heißhaltezeit (ST 4.1; ST 5.1) konnte ausgewertet werden, da bei längeren Heißhaltezeiten und Temperaturen ≥ 129 °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.

Tabelle 2**Reaktionskinetischen Parameter aus Analyseergebnissen von Milchproben aus dem UT-Bereich**

Proben	Heißhalte- temperatur ϑ (°C)	r^a	k^b [s ⁻¹]	$\tau_{1/2}^c$ [s]	D^d [s]	log D
RUT 1.1 - 1.4	140	- 0,9718	$7,8287 \times 10^3$	88,5	294,2	2,4686
UT 1.1 - 1.4	140	- 0,9904	$7,2335 \times 10^3$	95,8	318,4	2,5030

(a) Korrelationskoeffizient r der linearen Regression (bei der Auftragung $\log (C_{A0} - C_{Bt})$ über äquival. Heißhaltezeit τ (s)).

(b) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k (s⁻¹).

(c) Halbwertszeit $\tau_{1/2}$, berechnet gemäß $\tau_{1/2} = \ln 2/k$ (s) (gültig bei Reaktionen 1. Ordnung).

(d) Dezimalreduktionswert; $D = 2,303 / k$ (s).

Tabelle 3

Prozeßtechnische Parameter (D-Werte, z-Wert, Q₁₀-Wert) für die Dimroth-Umlagerung in Milch

Proben	Prozeßtemperatur θ(°C)	D-Wert (s) ^b	log ₁₀ D	z-Wert (°C)	Q ₁₀ -Wert
ST 1.2 ^a - 1.4	110	6069	3,783		
ST 2.1 - 2.4	114	3807	3,581	22,9	2,73
	115 (aus (8))*	3170 (aus (8))	3,501		
ST 3.1 - 3.4	119	2451	3,389		
ST 4.1	125	(460) ^c			
ST 5.1	129	(500) ^c			
ST 6.1	134	-		(26,8) ^d	(2,36) ^d
	135 (aus (8))*	608 (aus (8))	2,784		
RUT 1.1 - 1.4	140*	294	2,469		
UT 1.1 - 1.4	140*	318	2,503		
	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 Q₁₀-Werte aus den ST-Messungen unter Einbeziehung der Meßwerte aus UHT-Erhitzungsuntersuchungen (*) für den Temperaturbereich 115 - 150 °C; die in Klammern angegebenen verfahrenstechnischen Parameter gelten somit für den gesamten Temperaturbereich von 110 - 150 °C.

Tabelle 4**Prozeßtechnische Parameter von thermisch induzierten chemischen Reaktionen in Milch**

Reaktionsprodukt	Prozeßtemperatur θ (°C)	z-Wert (°C)	Q ₁₀ -Wert	Quellen
5-Hydroxymethylfurfural (total)	50 - 160	23,5	2,67	Fink, Kessler, 1986 (19)
	75 - 130	27,8 - 23,7	2,29 - 2,64	Peri, Pagliarini, Pierucci, 1988 (20)
	100 - 147	23,7	2,64	Konietzko, Reuter, 1980 (21)
	130 - 150	27,8	2,29	Mottar, 1981 (22)
Lactulose	60 - 145	27,7 - 21,0	2,30 - 3,00	Geier, Klostermeyer, 1983 (23)
	120 - 150	28,6 - 25,3	2,20 - 2,50	Nangpal, Reuter, 1990 (24)
	120 - 150	21,0	3,0	Andrews, 1985 (25)
Thiamin (Verlust)	120 - 150	31,5	2,08	Horak, Kessler, 1981 (22)
		29,4	2,19	Kessler, Fink, 1986 (27)
N6-Methyladenosin	115 - 150	30,5	2,13	Bayoumi, Reuter 1980 (28) Schlimme, Ott, Kiesner, 1994 (8)

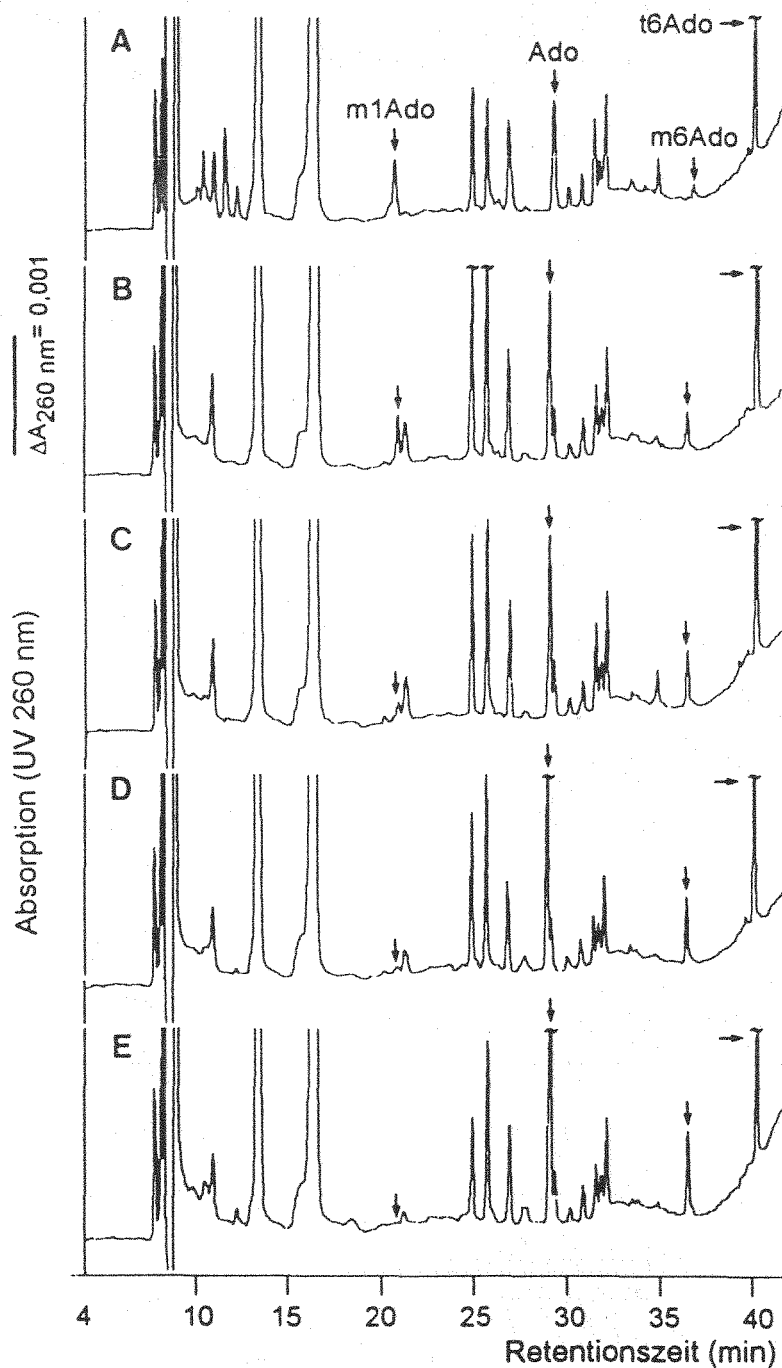


Abb. 1: Diagramme der liquidchromatographischen Trennung von Ribonucleosiden aus je 100 μl Milch. Milchproben der fetteingestellten (3,5 %), thermisierten und homogenisierten Versuchsmilch nach folgenden Heißhaltezeiten: 0 s (A), 199,8 s (B), 594 s (C), 1209 s (D) und 2520 s (E) bei einer Prozeßtemperatur von 114 °C

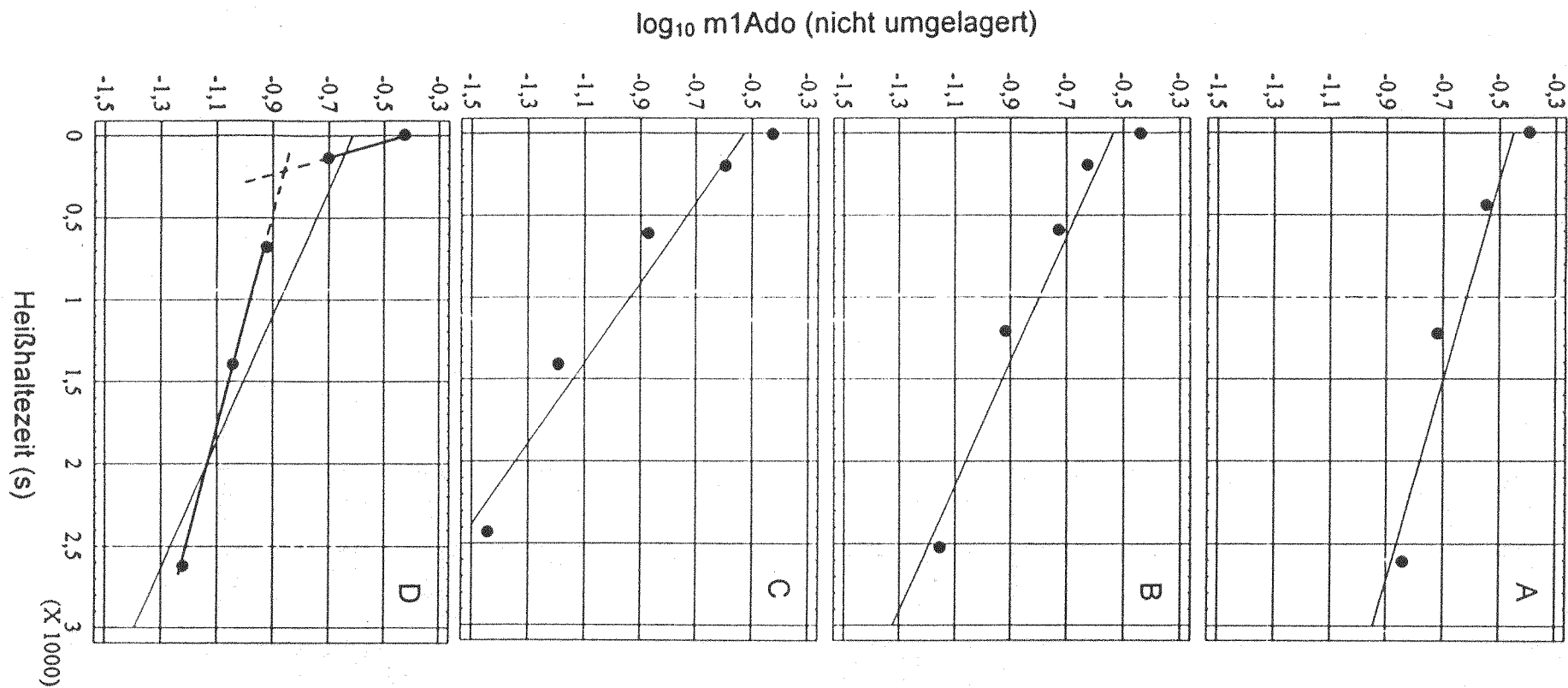


Abb. 2: Semilogarithmische Auftragung der Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) an nicht umgelagertem 1-Methyladenosin (m1Ado) gegen die Heißhaltezeit (s) bei Prozeßtemperaturen von $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), $114\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B), $119\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D). Die graphische Darstellung 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 die überlagerte Reaktion schneiden sich bei einer Heißhaltezeit von 216 s . Die in den Versuchen eingesetzte Sammelmilch stammte von verschiedenen Tagen.

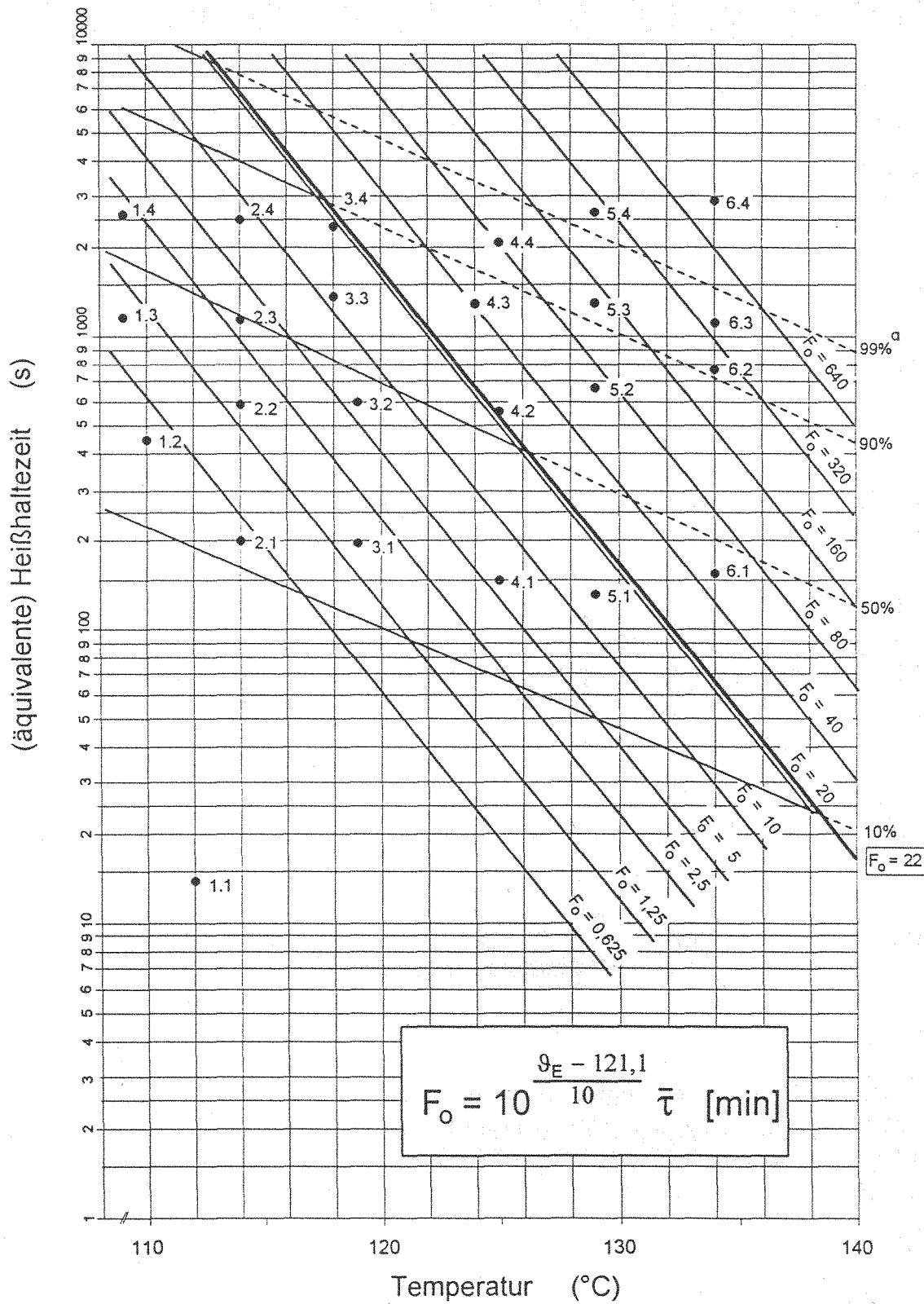


Abb. 3: Temperatur-Zeit-Kombinationen der untersuchten Milchproben.
 (a) prozentualer Anteil des in m6Ado umgelagerten m1Ado.

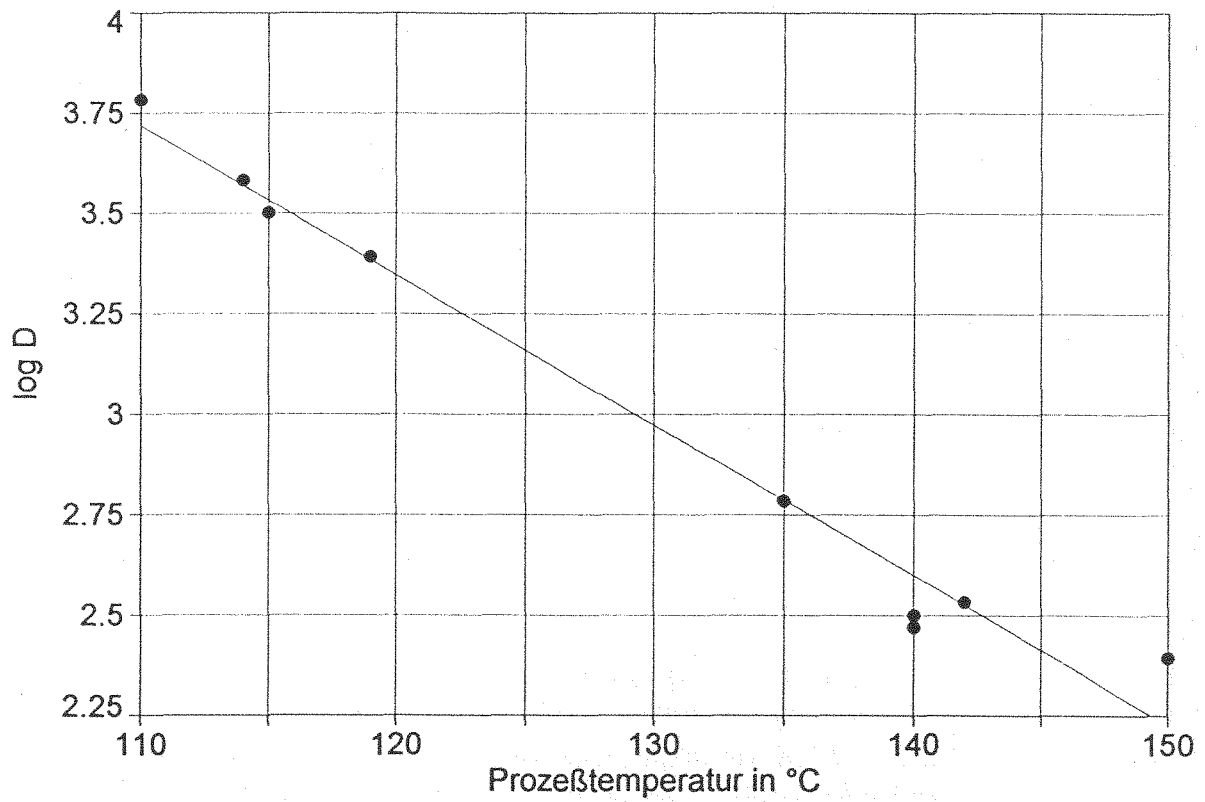


Abb. 4: Bestimmung des z-Wertes der Dimroth-Umlagerung im Temperaturbereich von 110 - 150 °C. Eine Auftragung von log D über den gesamten Temperaturbereich von 110 - 150 °C ergibt die Geradengleichung $y = -0,0373 x + 7,8243$, der z-Wert errechnet sich dann zu 26,8 ($r = -0,9883$).