

Master-Thesis
Im Studiengang Lebensmitteltechnologie
der
Hochschule Anhalt

**Berechnung der Proteinschädigung
bei unterschiedlichen Temperaturen und Verweilzeiten**

Name: Christel Groebel
Matrikelnummer: 4061789
Betreuender Professor: Prof. Dr.-Ing. Thomas Kleinschmidt
Bearbeitungszeitraum: 27. Oktober 2017 bis 26. April 2018

Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Master-Thesis mit dem Thema:

„Berechnung der Proteinschädigung bei unterschiedlichen Temperaturen und Verweilzeiten“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Eppingen, den 26. April 2018

Ort, Datum

Unterschrift des Erstellers

Vorwort

Die vorliegende Master-Thesis wurde im Zeitraum von Ende Oktober 2017 bis Ende April 2018, während meiner Tätigkeit als Master-Student des Master-Fernstudienganges der Lebensmitteltechnologie, an der Hochschule Anhalt, geschrieben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Kleinschmidt für die Betreuung der Master-Thesis von Seiten der Hochschule Anhalt, sowie Frau M.Sc. Christin Fischer für die praktische Unterstützung zu all meinen Fragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Studienganges für Ihre herzliche Unterstützung bedanken. Denn genau darauf ist man insbesondere in einem Fernstudium angewiesen.

Mein ganz persönlicher Dank, in Liebe, gilt meinem Mann Markus und meinem kleinen Sohn Mika, die mir stets den Freiraum für dieses Studium gegeben und erkämpft haben. Sie sind mein Silberstreifen am Horizont.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Berechnung von Proteinschädigungen der Moleküle β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin. Auf der Grundlage einer Literaturrecherche wird der Einfluss der Temperatur sowie der Konzentrationen und des pH-Wertes auf die reaktionskinetische Beschreibung der Proteinschädigung untersucht.

Die Proteinschädigung lässt sich grob in zwei Schritte aufteilen, die der Denaturierung durch Konformationsänderung des Proteins und einer anschließenden Aggregation. Die Untersuchungen zeigen, dass diese Vorgänge durch formale Reaktionskinetiken abbildbar sind. Dabei reicht eine Kinetik mit einer festen Reaktionsordnung je Protein aus, um beide Schritte berechnen zu können. Je nach Temperaturbereich dominiert der eine oder der andere Teilschritt die Kinetik. Dies zeigt sich durch eine Aufteilung des Temperaturbereiches in zwei Abschnitte. Im unteren Temperaturbereich prägt die Denaturierung, im oberen Bereich die Aggregation die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies führt bei gleicher formaler kinetischer Beschreibung zu einem anderen Satz von Parametern zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten.

Es zeigt sich, dass die Beschreibungen und Parameter der Reaktionskinetiken nach Dannenberg (Dannenberg, 1986) die derzeit beste Berechnungsmöglichkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten als Funktion von Temperatur und Konzentrationen darstellen.

Ein einfaches Modell zur dynamischen Simulation eines Rührwerksverdampfers liefert plausible Ergebnisse hinsichtlich der Proteinschädigung und der zeitabhängigen Konzentrationsverläufe bei Simulationsexperimenten im Batchbetrieb und kontinuierlicher Fahrweise bei unterschiedlichen Temperaturen.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
Symbolverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
2 Allgemeines zur Milch	2
2.1 Zusammensetzung von Milch	2
2.2 Thermische Behandlung von Milch.....	3
3 Grundlagen der Proteindenaturierung.....	5
3.1 Grundsätzlicher Proteinaufbau	5
3.2 Definition der Proteindenaturierung	6
3.3 Molkenproteindenaturierung	7
3.3.1 Denaturierung von β -Lactoglobulin.....	7
3.3.2 Denaturierung von α -Lactalbumin	9
4 Reaktionskinetik.....	9
4.1 Abbaureaktion n-ter Ordnung einer Komponente im geschlossenen System	11
4.2 Temperaturabhängige Kinetik.....	13
4.2.1 Arrhenius Ansatz	13
4.2.2 Theorie des aktivierten Übergangskomplexes	14
5 Kinetiken der Denaturierung von Molkenproteinen	15
5.1 Denaturierungskinetiken von β -Lactoglobulin	24
5.1.1 Analysen zur Reaktionsordnung.....	24
5.1.2 Temperaturabhängigkeit der Kinetik.....	27
5.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik	33
5.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik	36
5.2 Denaturierungskinetiken von α -Lactalbumin.....	40
5.2.1 Analysen zur Reaktionsordnung.....	40
5.2.2 Temperaturabhängigkeit der Kinetik.....	42
5.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik	46
5.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik	48
6 Modellierungsansatz der Eindampfung.....	48
6.1 Modellansatz für einen Rührwerksverdampfer	49
6.2 Simulationsbeispiele	52
7 Ergebnis und Diskussion.....	59
8 Zusammenfassung und Ausblick	64
9 Anhang.....	66

9.1	Lösungen der Differentialgleichung (Gl.4-5)	66
9.2	Umrechnung <i>k_{app1}</i> in <i>k_{app2}</i> , (Gl.4-10)	67
9.3	Ermittlung der Denaturierungsrate von β -Lactoglobulin A+B	68
9.4	Dichte von Milch.....	69
10	Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GP FPLC	Gel Permeation Fast Protein Liquid Chromatography
HP GPC	High Performance Gel Permeation Chromatography
native PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ORD	Optical Rotatory Dispersion
RP HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
UDIEF	Ultradünnschicht Isoelektrofokussierung
β -Lg A	β -Lactoglobulin A
β -Lg B	β -Lactoglobulin B

Symbolverzeichnis

Allgemeine Formelzeichen

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Einheit</i>
c	Konzentration	$g/l, Gew. \%$
D	entfaltete monomere Proteine	-
D_{nN}	Agglomerate aus n aufgefalteten Monomeren	-
E_A	Aktivierungsenergie	$kJ/kmol$
$\Delta G^\#$	Änderung der freien Enthalpie (auch Gibbs-Energie)	kJ
$\Delta H^\#$	Änderung der Enthalpie	kJ
h_p	Planck'sches Wirkungsquantum	$J \cdot s$
k	Geschwindigkeitskonstante	$(l/g)^{n-1} \cdot 1/s, 1/s$
k_0	Frequenzfaktor der Arrheniusgleichung	$(l/g)^{n-1} \cdot 1/s, 1/s$
k_B	Boltzmann-Konstante	J/K
n	Reaktionsordnung, Anzahl	-
N	natives monomeres Protein, gefaltet	-
\dot{r}_i	volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit einer Komponente i	$kg/(m^3 \cdot s)$
R	allgemeine Gaskonstante = 8,314	$kJ/(kmol \cdot K)$
$\Delta S^\#$	Änderung der Entropie	kJ/K

t	Zeit	s
T	Temperatur	$^{\circ}C, K$
U	Gesamtumsatz der Proteine, Gesamtproteinverlust	kg
V	Volumen	m^3

Indices

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
A	β -Lactoglobulin A
app	applied
B	β -Lactoglobulin B
F	Folgeprodukt
i	Komponentenindex
n	zur Reaktionsordnung n
nc	Anzahl der Komponenten (number of components)
ref	Referenzwert
t	zeitabhängige Größe
0	Startwert zum Zeitpunkt $t = 0$
1	Komponentenindex, bzw. zur Startkonzentration 1
2	Komponentenindex, bzw. zur Startkonzentration 2

Griechische Formelzeichen

α_{AB}	Verhältnis der Konzentrationen von β -Lactoglobulin A zu β -Lactoglobulin B	—
---------------	--	---

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Denaturieren von Molkenproteinen beim Erhitzen auf verschiedenen Temperaturen über 30 min. 1 Molkenproteine insgesamt, 2 β -Lactoglobulin, 3 α -Lactalbumin, 4 Proteose-Pepton, 5 Immunglobulin, 6 Serumalbumin (Bellitz, et al., 1985).....	4
Abbildung 3-1: Strukturebenen von Proteinen (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)	5
Abbildung 3-2 Schema der Denaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin (Dannenberg, 1986)	7
Abbildung 3-3 Schema der temperaturabhängigen Denaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin ($\text{pH}>6,8$) (De Wit, 2009)	8
Abbildung 4-1: Relative Konzentrationsänderungen c_t/c_0 abhängig von der Reaktionsordnung	11
Abbildung 5-1: Zeitverlauf der Denaturierung von β -Lactoglobulin A bei 120°C mit Kinetiken unterschiedlicher Reaktionsordnung (Dannenberg 1988 $n=1,5$; $n=1,3$ mit angepasstem k , $n=1,5$ mit angepasstem k)	26
Abbildung 5-2 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} für die Denaturierung von β -Lactoglobulin A und B nach Arrhenius (k_{app} in $1/s$) (Dannenberg, 1986)	28
Abbildung 5-3 pH-Abhängigkeit der Reaktionsordnung σ und der Geschwindigkeitskonstanten \square für β -Lactoglobulin in Magermilch bei 80°C (Law, et al., 2000)	37
Abbildung 5-4 Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeitskonstante von β -Lactoglobulin bei $\sigma 110^\circ\text{C}$ und $\Delta 80^\circ\text{C}$ (Tolkach, et al., 2005)	38
Abbildung 5-5 Einfluss des pH-Wertes auf die Temperaturabhängigkeit der Kinetik der β -Lactoglobulin-Denaturierung (\circ pH3 \square pH4,5 \diamond pH6,5 ∇ pH8) (Tolkach, et al., 2005)	39
Abbildung 5-6 Zeitverlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch bei 80°C mit Kinetiken unterschiedlicher Reaktionsordnung (Dannenberg 1988 $n=1$; $n=0,9$ mit angepasstem k ; $n=1,1$ mit angepasstem k)	41
Abbildung 5-7 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k für die Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch nach Arrhenius (k in $1/s$) (Dannenberg, 1986)	43
Abbildung 5-8 Zeitlicher Verlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch bei 80°C , berechnet mit Kinetiken von (Dannenberg, 1986), (Anema, et al., 1996), (Anema, et al., 2006), Reaktionsordnung 1	45
Abbildung 5-9 Arrhenius-Darstellung der α -Lactalbumin Denaturierung; \circ 9,6%TS, \bullet 19,2%TS, \square 28,8%TS, \blacksquare 39,4%TS (Anema, 2001)	47

Abbildung 6-1 Bilanzraum für eine einfache modelltechnische Darstellung eines Rührwerksverdampfers für die Materiebilanzierung	49
Abbildung 6-2 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 80°C, Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 1: Heißhaltung ohne Abdampfung im Batch-Betrieb	54
Abbildung 6-3 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 80°C, Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 2: Eindampfung im Batchbetrieb	55
Abbildung 6-4 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 70°C, Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 3: Eindampfung im Batchbetrieb	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Durchschnittliche Milchzusammensetzung (Dannenberg, 1986).....	2
Tab. 2-2: Durchschnittliche Zusammensetzung der Milchproteinfraktion, inklusive Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt der einzelnen Fraktionen (Dannenberg, 1986).....	3
Tab. 5-1 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Milch a).....	17
Tab. 5-2 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Milch b).....	18
Tab. 5-3 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Lsg.	19
Tab. 5-4 Steigungswechsel der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstante für β -Lactoglobulin A und B	29
Tab. 5-5 Vergleich der Aktivierungsenergien der Denaturierungskinetiken von β -Lactoglobulin in Milch, Reaktionsordnung $n = 1,5$	31
Tab. 5-6 Vergleich gemessener und berechneter Werte für k für β -Lactoglobulin bei 80°C in Magermilch (verdünnt mit UF Permeat bzw. aufkonzentriert mittels UF) (Messwerte aus (Law, et al., 1997))	35
Tab. 5-7 Steigungswechsel der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstante für α -Lactalbumin.....	43
Tab. 5-8 Vergleich der Frequenzfaktoren und Aktivierungsenergien von Denaturierungskinetiken von α -Lactalbumin im Milch, Reaktionsordnung $n = 1$	44
Tab. 5-9 Werte für k für α -Lactalbumin bei 80°C in Magermilch (verdünnt mit UF Permeat bzw. aufkonzentriert mit Proteinkonzentrat, (Law, et al., 1997)).....	46
Tab. 6-1 Kinetikparameter nach (Dannenberg, 1986).....	53

1 Einleitung

Die thermische Behandlung spielt in der Verarbeitung von Milch eine große Rolle. Einerseits erfolgt die Erhitzung mit dem Ziel der Haltbarmachung (z.B. Pasteurisieren oder Sterilisieren), andererseits soll der Wassergehalt durch Eindampfung reduziert werden, um beispielsweise Kondensmilch mit unterschiedlichen Fettgehalten zu erhalten oder um für eine anschließende Trocknungsstufe vorab eine hohe Reduktion des Wassergehaltes zu erreichen. Bei allen Prozessen mit Hitzeeinwirkung spielt der Einfluss der Temperatur auf den Zustand der Milchproteine eine wichtige Rolle. Die Denaturierung kann neben erwünschten Effekten zur gezielten Einflussnahme auf Produkte auch zu unerwünschten Zuständen führen. Unerwünschte Zustände wären zum Beispiel:

- Fouling im Verdampfer,
- Verfestigung von Ablagerungsschichten bei der Ultrafiltration,
- Erhöhung der Ausbeute von Molkenproteinen in der Käseerei.

((Dannenberg, 1986), (Kessler, 2006)).

Dabei ist es wichtig, die thermisch induzierte Proteindenaturierung nicht nur qualitativ beurteilen zu können, vielmehr kommt auch einer quantitativen Beschreibung eine immer größere Bedeutung zu. Um einen gezielten Einfluss auf den Denaturierungsgrad verschiedener Proteinfractionen nehmen zu können oder diesen zu beurteilen, ist es notwendig, das Denaturierungsverhalten mit Hilfe von Reaktionskinetiken beschreiben zu können. Damit ist es möglich, den Denaturierungsgrad zu modellieren (Kessler, 2006) und über Simulationsrechnungen zu analysieren.

Kinetiken zur Denaturierung von Molkenproteinen sind schon lange Gegenstand von Forschungsarbeiten. Erste Arbeiten, die sich mit der Vermessung und Identifikation solcher Kinetiken beschäftigen, finden sich bereits Anfang der 50er Jahre, z.B. (Larson, et al., 1952) oder (Harland, et al., 1953). In den Folgejahren nahmen diesbezügliche Forschungsaktivitäten zu. Einerseits verbesserten sich die Analysemethoden, so dass genauere und differenziertere Messungen möglich wurden. Andererseits steigerte sich die Produktion bzw. die Anlieferung von Milch in Molkereien kontinuierlich. Alleine in Deutschland verzeichnete sich von 1960 bis 2014 ein Anstieg um mehr als 100%, von ca. 14,5 auf etwa 31,4 Millionen Tonnen angelieferter Milch in deutschen Molkereien (WD, 2016). Damit war und ist auch das Interesse an besseren Berechnungsgrundlagen verbunden, um die Auslegung und den Betrieb von Produktionsanlagen sowohl im Batchbetrieb als auch bei kontinuierlicher Anlagenfahrweise zu optimieren.

Es existiert eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit derartigen Kinetiken beschäftigen,

also Untersuchungen im Hinblick darauf, das Denaturierungsverhalten aus reaktionskinetischer Sicht zu beschreiben und verfügbar zu machen.

Ziel dieser Arbeit ist es, Untersuchungen zur thermischen Denaturierung von Molkenproteinen zu analysieren und miteinander zu vergleichen, um am Ende aus einer Vielzahl von Arbeiten zu diesem Thema eine möglichst gute kinetische Beschreibung des Denaturierungsverhaltens zu extrahieren. Aufgrund der großen Anzahl von Arbeiten und dem breiten Spektrum an Milchproteinen erfolgt die Konzentration auf die beiden Molkenproteine, die in größter Menge in Milch vorliegen, das β -Lactoglobulin (A und B) sowie das α -Lactalbumin.

Neben der Temperaturabhängigkeit der Denaturierung fließt auch der Einfluss von Proteinkonzentrationen sowie der pH-Wert in die Untersuchungen mit ein.

2 Allgemeines zur Milch

2.1 Zusammensetzung von Milch

Milch, als wässriges, mehrphasiges System, bestehend aus gelösten Komponenten (Lactose, Molkenproteine, Salze, organische Säuren), emulgierten Komponenten (Milchfettkugeln) sowie kolloidal gelösten Komponenten (Casein). Den jeweiligen Anteil der Bestandteile für durchschnittliche Kuhmilch zeigt Tabelle Tab. 2-1 (hierbei handelt es sich um Durchschnittswerte, die Summe der Gewichtsprozentanteile ergibt daher nicht 100%).

Komponente	Durchschnittsgehalt [Gew.-%]
Wasser	87
Lactose	4,6
Fett	3,9
Proteine	3,3
davon Casein	2,6
und Molkenproteine	0,7
Salze, organische Säuren und Übriges	0,7

Tab. 2-1: Durchschnittliche Milchzusammensetzung (Dannenber, 1986)

Komponente	Konzentration [g/kg]	MG [Dalton]	IEP
Gesamtprotein	33		
Gesamtcasein	26		4,6
α_{S1}^-	10,0	23600	5,1
α_{S2}^-	2,6	25200	5,1
β^-	9,3	24000	5,3
γ^-	0,8	12000-	5,8
κ^-	3,3	21000	3,7-
		19000	4,2
Molkenproteine	6,3		
β -Lactoglobulin	3,2	18300	5,3
α -Lactalbumin	1,2	14200	5,1
Blutserumalbumin	0,4	63000	4,7
Immunoglobuline	0,7	160000-	4,6-
		400000	6,0
Proteose-		4000-	
Peptone u.a.	0,8	40000	3,7
Fettkugelmembran- proteine	0,4		

Tab. 2-2: Durchschnittliche Zusammensetzung der Milchproteinfraktion, inklusive Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt der einzelnen Fraktionen (Dannenber, 1986)

Die in der Milch enthaltenen Proteine, lassen sich in drei Proteinfraktionen unterteilen, das Casein, die Molkenproteine sowie die Fettkugelmembranproteine (vgl. Tabelle Tab. 2-2). Dabei bildet das Casein, inklusive den genetischen Varianten α_{S1}^- , α_{S2}^- , κ^- , β^- und γ^- -Casein, mit 26 g/kg, den größten Anteil. Die beiden Hauptkomponenten der Molkenproteine sind das β -Lactoglobulin (3,2 g/kg) mit seinen beiden maßgebenden genetischen Varianten β -Lactoglobulin A und B, sowie das α -Lactalbumin mit 1,2 g/kg. Alle anderen Proteine weisen deutlich geringere Konzentrationen auf (Dannenber, 1986). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf diese beiden Komponenten, die mit etwa 70% die Hauptanteile der Molkenproteine darstellen.

2.2 Thermische Behandlung von Milch

Die thermische Behandlung von Milch hat in der Praxis eine große Bedeutung. So erfolgt beispielsweise das Haltbarmachen meist durch Erhitzen, wobei unterschiedliche Temperaturbereiche zur Anwendung kommen. So findet das Thermisieren bei Temperaturen von 62-65°C statt, das klassische Pasteurisieren von 72-75°C, die Hochpasteurisierung im Bereich 125-135°C sowie die Ultrahocherhitzung von 135-150°C. Ziel ist es, durch das Abtöten von Keimen, die Haltbarkeit der Milch zu erhöhen. Die Verweilzeit hängt dabei von der Absterbekinetik der Keime ab. Diese wird mit zunehmender Temperatur schneller, das bedeutet, höhere Temperaturen erfordern geringere Verweilzeiten als niedrigere Temperaturen.

Eine weitere Anwendung der thermischen Behandlung ist das Eindampfen. Durch das Abdampfen von Wasser konzentrieren sich die Inhaltsstoffe der Milch auf. Das Verdampfen des Wassers erfolgt üblicherweise bei niedrigen Prozessdrücken um die Siedetemperatur gering zu halten. Durch niedrige Prozesstemperaturen lassen sich Produktschädigungen minimieren.

Die thermische Behandlung von Milch hat Veränderungen bei einigen weiteren Inhaltsstoffen zur Folge, beeinflusst von zahlreichen Faktoren, beispielsweise (Belitz, et al., 1985):

- Koagulation von Casein (Koagulationstemperatur 130-150°C),
- durch Temperatur und pH-Wert kann eine Mizelländerung bewirkt werden (z.B. fällt die Koagulationstemperatur mit fallendem pH-Wert),
- Erhitzen von Natrium- bzw. Calciumcaseinatlösung auf 120 °C für über 5 h führt zu einer 100 %-igen bzw. 85 %-igen Dephosphorylierung und einer Freisetzung von 15 % des Stickstoffes in Form niedermolekularer Bruchstücke,
- die thermische Instabilität von Milch steigt mit dem Gehalt an freiem Calcium,
- Denaturierung von Molkenproteinen durch höhere Temperaturen bei kürzeren oder niedrigere Temperaturen bei längeren Verweil-/Erhitzungszeiten,

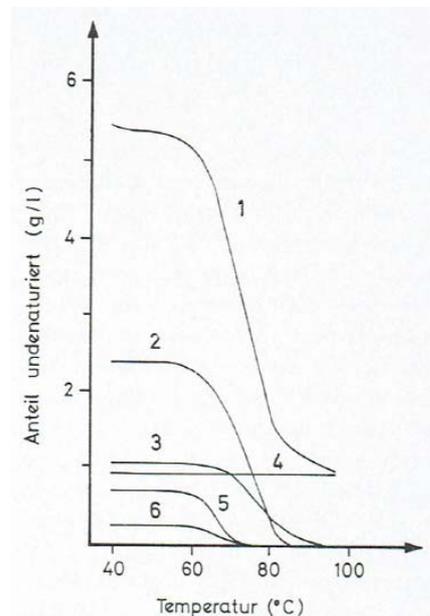


Abbildung 2-1: Denaturieren von Molkenproteinen beim Erhitzen auf verschiedenen Temperaturen über 30 min. 1 Molkenproteine insgesamt, 2 β-Lactoglobulin, 3 α-Lactalbumin, 4 Proteose-Pepton, 5 Immunglobulin, 6 Serumalbumin (Bellitz, et al., 1985)

- Aktivierung von Thiolgruppen,
- Calciumphosphatniederschläge auf Caseinmizellen,
- Maillard-Reaktionen zwischen Lactose und Aminogruppen (Lysin),
- Bildung von δ-Lactonen und Methylketonen aus Glyceriden mit Hydroxy- bzw. Ketofettsäuren,
- Abbau von Thiamin,
- Veränderungen an der Milchfettmembran

Berechnungsmöglichkeiten zur Beurteilung von Veränderungen oder Schädigungen von Inhaltsstoffen der Milch sind somit von großer Bedeutung.

3 Grundlagen der Proteindenaturierung

3.1 Grundsätzlicher Proteinaufbau

Proteine sind wie Peptide aus Aminosäuren aufgebaut. Es handelt sich um lange Polypeptidketten, im Prinzip lange Aminosäureketten, die per Peptidbindung (säureamidartig) verbunden sind. Neben Peptidbindungen können auch kovalent gebundene Heterobausteine vorhanden sein, z.B. enthalten Phosphoproteine, wie Caseine (Milch) oder Phosvitin (Eidotter) mit Phosphorsäure veresterte Serin- bzw. Threoninreste. Glykoproteine enthalten ein oder mehrere Mono- bzw. Oligosaccharide, die O-glykosidisch an Serin, Threonin oder δ -Hydroxylysin bzw. N-glykosidisch an Asparagin gebunden sind, wie z.B. κ -Casein, Kollagen oder Serumproteine einiger Fischarten. Die Proteinstruktur ist abhängig von der Aminosäuresequenz, der Primärstruktur. Die Konformation des Moleküls, die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, hängt wiederum von der Primärstruktur ab. Sie wird durch nicht kovalente Bindungen wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, kolloidale Calciumphosphatbrücken, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Bindungen aufrechterhalten, die Quartärstruktur in Einzelfällen auch über Disulfid-Brückenbindungen. Während die Sekundär- und Tertiärstruktur aus einem Molekül, dem eigentlichen Protein bestehen, handelt es sich bei der Quartärstruktur um multimolekulare Gebilde (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg).

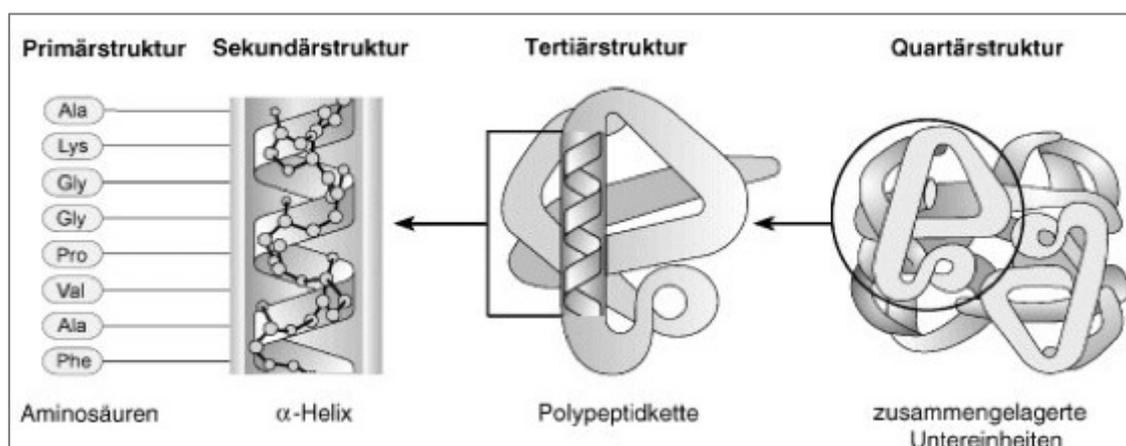


Abbildung 3-1: Strukturebenen von Proteinen (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

3.2 Definition der Proteindenaturierung

Unter der Denaturierung von Proteinen wird die reversible oder irreversible, partielle oder vollständige Änderung der nativen Konformation eines Proteins verstanden. Dabei erfolgt keine Auftrennung kovalenter Bindungen, ausgenommen sind mögliche Disulfid-Brückenbindungen (Belitz, et al., 1985). Die Wirkung eines Proteins und dessen technofunktionelle Eigenschaften ist direkt mit seiner räumlichen Struktur verbunden. Wird demnach die Proteinstruktur verändert, so verliert es seine ursprüngliche Wirkung. Die Denaturierung beinhaltet somit die Strukturänderung von Proteinen. Dabei werden fast immer mehrere Ordnungsstufen zerstört, wobei die Primärstruktur davon nicht betroffen ist.

Die chemischen oder biologischen Ursachen einer Denaturierung können alle Einflüsse beinhalten die Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen oder hydrophobe Bindungen lösen, beispielsweise

- Hitze,
- pH-Wert Änderung,
- organische Lösemittel,
- Salze,
- Harnstoff,
- Alkohole,
- mechanische Einflüsse wie Rühren oder Schlagen,
- Bestrahlung,
- Ultraschalleinwirkung, etc.

Eine Denaturierung ist reversibel, wenn die Peptidkette im aufgefalteten Zustand durch die Wechselwirkung mit dem auslösenden denaturierenden Stoff, stabilisiert wird. Nach Entfernung dieses Stoffes bildet sich die Struktur des Proteins wieder zur nativen Struktur zurück.

Eine irreversible Denaturierung tritt auf, wenn es durch intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Peptidketten zu Effekten kommt, welche die Peptidkette im aufgefalteten Zustand stabilisieren. Das geschieht beispielsweise beim Eierkochen, also bei der thermischen Koagulation von Proteinen. Durch die Auffaltung der Peptidketten können reaktive Gruppen, z.B. Thiolgruppen, freigesetzt werden, die im gefalteten Zustand nicht zugänglich sind. Diese Gruppen können durch die Bildung kovalenter Bindungen (z.B. Disulfid-Brückenbindung) zu irreversibler Denaturierung führen (Fiedler, 1985).

3.3 Molkenproteindenaturierung

Nach obiger Definition ist die Proteindenaturierung auf die Entfaltung der Proteine beschränkt. Nach der Entfaltung erfolgt jedoch häufig die Aggregation. Diese beiden Vorgänge beruhen jedoch auf unterschiedlichen Mechanismen, die zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten im Ablauf führen (Dannenberg, 1986). Dies zeigt sich auch bei der Ermittlung der makrokinetischen Reaktionsgeschwindigkeiten.

3.3.1 Denaturierung von β -Lactoglobulin

Dannenberg geht von einem zweistufigen Denaturierungsverlauf aus: Entfaltung und Aggregation (Dannenberg, 1986).

Dimeres und monomeres β -Lactoglobulin liegt in einem Gleichgewicht vor (bezeichnet als Sekundärgleichgewicht). Dieses verschiebt sich unter Wärmeeinwirkung immer weiter in Richtung des Monomers, bis ab Temperaturen von 55°C nur noch native Monomere (N) vorliegen. Dabei finden molekulare Umordnungen unter erhöhter Reaktionsaktivität der Thiol-Gruppen statt. Bei Temperaturen von 65 bis 70°C stellt sich ein weiteres Gleichgewicht ein, auch Primärgleichgewicht genannt. Hierbei stehen native und denaturierte Monomere (D) im Gleichgewicht. Aufgrund hoher Werte der dabei zu findenden Enthalpieänderungen kann von größeren Änderungen der Tertiär- und Sekundärstruktur ausgegangen werden. Da die Bildung des Primärgleichgewichtes sehr schnell abläuft, interpretiert Dannenberg die Bildung des Primär- und Sekundärgleichgewichtes als einen Schritt.

Die entfalteten Monomere (D) reagieren in einem Gleichgewicht unspezifisch ohne kovalente Bindungen zu D_x . Mit steigender Temperatur kommt es zu irreversibler, unspezifischer Aggregation der entfalteten Monomere (Bildung von $D_{1N} \dots D_{nN}$), dem zweiten Schritt, vgl. Abbildung 3-2.

Casein stabilisiert das denaturierte β -Lactoglobulin über unspezifische Calcium-Bindungen und reduziert damit die Aggregationsbildung. Das bedeutet, dass β -Lactoglobulin als isoliertes Protein in Lösung ein anderes Verhalten zeigt als in Milch unter Beisein von Casein (Dannenberg, 1986).

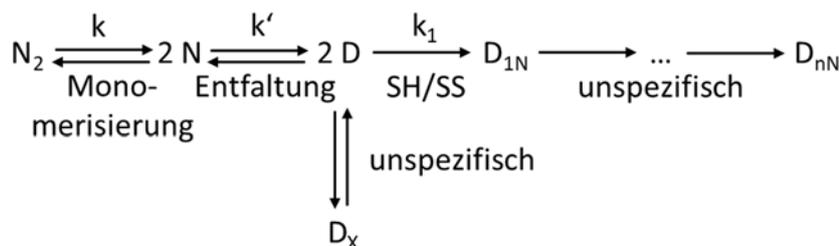


Abbildung 3-2 Schema der Denaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin (Dannenberg, 1986)

De Wit (De Wit, 2009) detailliert diese Mechanismen noch weiter (vgl. Abbildung 3-3).

Durch Auswertung vieler Arbeiten zum Thema Denaturierung von β -Lactoglobulin kommt De Wit zu den nachfolgenden -er nennt sie „vorsichtige“- Schlussfolgerungen, geltend für pH-Werte über 6,8.

β -Lactoglobulin liegt bei Raumtemperatur als natives Dimer vor (N-N). Bei einer Erwärmung auf 55°C kommt es zu einer Dissoziation in die Monomere. Dabei erfolgen kleine reversible Konformationsänderung (R) unter Freilegung der Thiol-Gruppen, auch als Tanford Transition bezeichnet. Zwischen 60 und 70°C kommt es zu partiellen Auffaltungen bei gleichzeitiger irreversibler Änderungen der Monomere (D), induziert durch freie Thiol-Gruppen, auch „molten globule“ genannt. Im Temperaturbereich zwischen 65 und 75°C bilden sich kleinere Oligomere durch Thiol/Thiol-Oxidationsreaktionen und in geringem Maße durch Disulfid-Brückenbildung. Bis 100°C erfolgen weitere Auffaltungen unter Beibehaltung von Reststrukturen der Konformationen. Bei Temperaturen zwischen 75 und 85°C entstehen größere Oligomere durch Bildung nichtkovalenter Bindungen. Oberhalb von 85°C bis etwa 105°C bilden Disulfid-Brücken die Basis für die Aggregation. Schließlich kommt es bei Temperaturen über 125°C zur Auffaltung der konformativen Reststrukturen, vermutlich durch Auftrennung der Disulfid-Brückenbindungen.

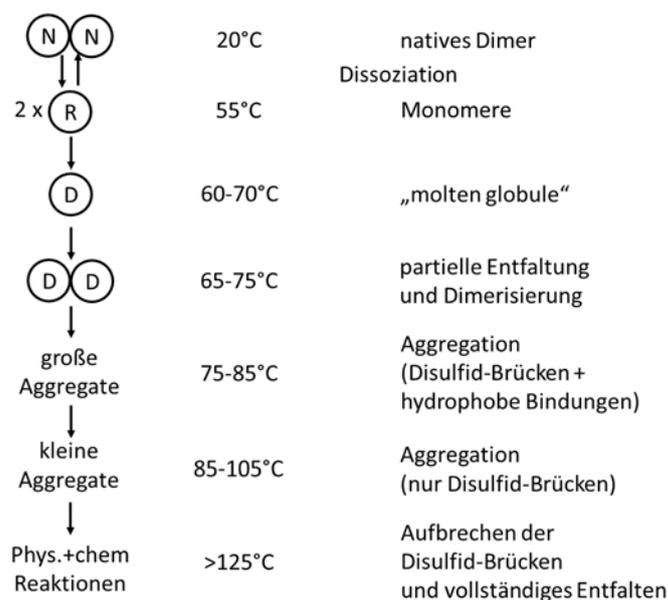


Abbildung 3-3 Schema der temperaturabhängigen Denaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin (pH>6,8) (De Wit, 2009)

3.3.2 Denaturierung von α -Lactalbumin

Im Vergleich zu β -Lactoglobulin gibt es für α -Lactalbumin nur sehr wenige Untersuchungen zum Hergang der Denaturierung. Dannenberg (Dannenberg, 1986) kommt bei seiner Auswertung zum Schluss, dass hier ebenfalls ein zweistufiger Prozess vorliegt, die Auffaltung als eigentliche Denaturierung mit anschließender Aggregation. Lediglich für den Entfaltungsmechanismus gibt es anhand der Höhe der Denaturierungsenthalpie Indizien auf einen komplizierteren Vorgang. Im Vergleich zum β -Lactoglobulin verfügt das α -Lactalbumin über vier statt zwei Disulfidbrücken. Solange diese intakt sind, begünstigen sie die Rückfaltung, das Lactalbumin weist daher eine höhere Reversibilität für die Entfaltung auf, als das Lactoglobulin.

4 Reaktionskinetik

Reaktionskinetiken beschreiben die Reaktionsgeschwindigkeit von Reaktionen. Sie sind im Allgemeinen eine Funktion von Druck, Temperatur und Zusammensetzung. Mit der Zusammensetzung finden auch Komponenten Berücksichtigung, die nach der Reaktionsgleichung nicht an der Reaktion teilnehmen, beispielsweise gelöste Salze oder H_3O^+ -Ionen (in Form des pH-Wertes).

Laufen die Reaktionen unter dem Einsatz von Katalysatoren ab, so ergeben sich für unterschiedliche Katalysatoren unterschiedliche Beschreibungen der Reaktionsgeschwindigkeit.

Untersuchungen zur Kinetik laufen üblicherweise als Batch-Versuche ab. Unter der Voraussetzung eines thermodynamisch geschlossenen Systems ohne Phasenwechsel und lediglich einer Reaktion lautet die Komponentenbilanz im Reaktionsvolumen V für eine Komponente i

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = -V \cdot \dot{r}_i \quad (\text{Gl.4-1})$$

und damit

$$\frac{dV}{dt} \cdot c_i + V \cdot \frac{dc_i}{dt} = -V \cdot \dot{r}_i \quad (\text{Gl.4-2})$$

Die Komponente i reagiert hier mit einer volumenspezifischen Reaktionsgeschwindigkeit \dot{r}_i in der Reaktionsphase mit Volumen V . Unter der Annahme eines konstanten Reaktionsvolumens ergibt sich damit aus Gleichung (Gl.4-2) die üblicherweise für die Vermessung von Reaktionskinetiken in Batch-Versuchen angesetzte Gleichung

$$-\frac{dc_i}{dt} = \dot{r}_i \quad (\text{Gl.4-3})$$

Eine allgemeingültige Gleichung lässt sich für \dot{r}_i nicht herleiten. Bei der Denaturierung der Moleküle wird zunächst davon ausgegangen, dass makrokinetisch gesehen, lediglich die Komponente selbst an der Reaktion teilnimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Reaktion in einer Phase abläuft (hier die flüssige Phase), lässt sich damit für die Reaktionsgeschwindigkeit \dot{r}_i

$$\dot{r}_i = k_n \cdot c_i^n \quad (\text{Gl.4-4})$$

ansetzen. k ist dabei die Geschwindigkeitskonstante und n die Reaktionsordnung. Konformationsänderungen der Proteinmoleküle finden hierbei formal Berücksichtigung als Reaktion, obwohl vom chemischen Standpunkt aus gesehen keine eigentliche Reaktion zustande kommt (ausgenommen eventuelle Trennungen von Disulfid-Brücken).

Die Reaktionsordnung n ist dabei vorab nicht festgelegt, die Ermittlung basiert auf experimentellen Daten. Mittels der Reaktionsordnung erfolgt die Beschreibung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration. Die Reaktionsordnung ist im klassischen Ansatz ein fester Wert für eine definierte Reaktion unter definierten Bedingungen. Sie ist nicht ohne weiteres auf andere Reaktionsbedingungen übertragbar.

Abbildung 4-1 zeigt qualitativ den zeitlichen Verlauf relativer Konzentrationen (aktuelle Konzentration c_t bezogen auf die Ausgangskonzentration c_0) für unterschiedliche Reaktionsordnungen aber gleicher Geschwindigkeitskonstante.

Mit voranschreitender Reaktion wird Edukt verbraucht, die Konzentration eines oder mehrerer Ausgangsstoffe nimmt also ab. Da mit höherer Ordnung die Geschwindigkeit auch stärker von den Konzentrationen abhängt, laufen diese zu Reaktionsbeginn relativ schnell ab, um mit zunehmender Reaktionsordnung langsamer zu werden. Ob eine Reaktion in Gänze am Ende schnell oder langsam ist hängt zusätzlich noch von der Geschwindigkeitskonstanten k ab. Kinetiken 0. Ordnung sind hängen nicht von der Konzentration der Edukte ab. Damit ist eine derartige Beschreibung nicht geeignet, wenn mit hohen Umsätzen gerechnet werden muss. Rein formal könnte es hierbei selbst dann noch zum Abbau der Edukte kommen, wenn keine mehr vorhanden sind, für die Konzentrationen ergäben sich dann negative Werte.

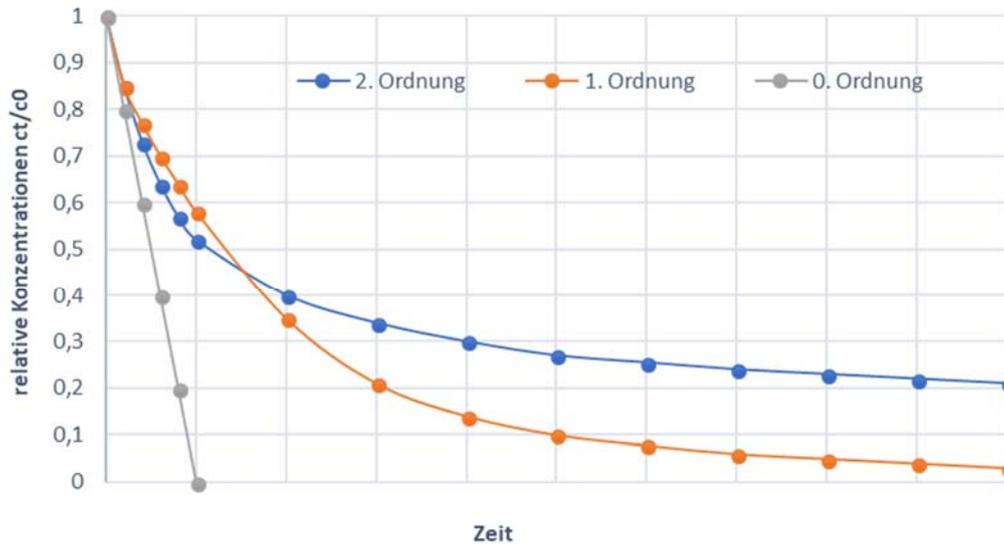


Abbildung 4-1: Relative Konzentrationsänderungen c_t/c_0 abhängig von der Reaktionsordnung

4.1 Abbaureaktion n-ter Ordnung einer Komponente im geschlossenen System

Die Ermittlung von Kinetiken erfolgt meist im thermodynamisch geschlossenen System, d. h. es existieren keine Zu- oder Abströme (Batch-Betrieb). Findet die Reaktion ohne Phasenwechsel bei konstantem Reaktionsvolumen statt, so ergibt die Kombination der Gleichungen (Gl.4-3) und (Gl.4-4) die Differentialgleichung für den Abbau einer Komponente.

$$-\frac{dc}{dt} = k_n \cdot c^n \quad (\text{Gl.4-5})$$

Für die Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei davon ausgegangen, dass lediglich die abreagierende Komponente an der Reaktion teilnimmt, der Komponentenindex wird daher nicht mehr berücksichtigt.

Die Reaktionsordnung n stellt einen empirisch ermittelten Wert dar. Es ist nicht gewährleistet, dass dieser auch den molekularen Reaktionsablauf exakt wiedergibt. Bei der Reaktionsordnung n handelt es sich eher um eine „kinetische“ oder „scheinbare“ Reaktionsordnung. Die Ursachen hierfür können folgende Punkte sein:

- Zwischenprodukte,
- Parallel- oder
- Folgereaktionen,

die den Reaktionsablauf so beeinflussen, dass diese Abweichung auftritt (Kessler, 2006).

Für die Anfangswerte c_0 und $t_0 = 0$ bei einer Reaktionsordnung $n = 1$ ergibt sich die Lösung der Differentialgleichung (Gl.4-5) zu

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t} \quad \text{für } n=1 \quad (\text{Gl.4-6})$$

c_t ist hierbei die zeitabhängige Konzentration der Ausgangskomponente (siehe Anhang).

Für die Anfangswerte c_0 und $t_0 = 0$ bei einer Reaktionsordnung $n \neq 1$ lautet die Lösung der Differentialgleichung (Gl.4-5)

$$\frac{c_t}{c_0} = \left[1 + (n-1) \cdot k_n \cdot (c_0)^{(n-1)} \cdot t \right]^{\frac{1}{1-n}} \quad \text{für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.4-7})$$

(siehe Anhang). Da die Ausgangskonzentrationen häufig nicht oder nur unter hohem Aufwand messbar sind, erfolgt meist eine Zusammenfassung von $k_n \cdot (c_0)^{(n-1)}$ zu

$$k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{(n-1)} \quad (\text{Gl.4-8})$$

Damit vereinfacht sich Gl. (Gl.4-7) zu

$$\frac{c_t}{c_0} = \left[1 + (n-1) \cdot k_{app} \cdot t \right]^{\frac{1}{1-n}} \quad \text{für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.4-9})$$

Bei der Formulierung nach Gleichung (Gl.4-9) ist zu berücksichtigen, dass die Geschwindigkeitskonstante k_{app} von der Ausgangskonzentration c_0 abhängt. Das bedeutet, auf diese Art ermittelte Geschwindigkeitskonstanten sind nur dann miteinander direkt vergleichbar, wenn unter ansonsten gleichen Bedingungen auch die Startkonzentration identisch waren.

Ist dies nicht der Fall, so muss eine Umrechnung nach

$$\frac{k_{app1}}{k_{app2}} = \left(\frac{c_{01}}{c_{02}}\right)^{(n-1)} \quad (\text{Gl.4-10})$$

erfolgen (siehe Anhang). Der Index 1 bzw. 2 bedeutet hierbei: Wert in Versuch 1 bzw. 2.

Handelt es sich um eine äquimolare Bildungsreaktion (Konzentration c_t [mol/l]) mit einem Produkt oder geht die abreagierte Komponente massebezogen lediglich in das Folgeprodukt F über (Konzentration c_t [g/l]), dann gilt für die Konzentration c_{Ft} des Folgeproduktes

$$c_{Ft} = c_0 - c_t \quad (\text{Gl.4-11})$$

und damit

$$\frac{c_t}{c_0} = 1 - \frac{c_{Ft}}{c_0} \quad (\text{Gl.4-12})$$

Für den zeitlichen Verlauf der relativen Produktkonzentration ergibt sich

$$\frac{c_{Ft}}{c_0} = 1 - e^{-k \cdot t} \quad \text{für } n = 1 \quad (\text{Gl.4-13})$$

bzw.

$$\frac{c_{Ft}}{c_0} = 1 - [1 + (n-1) \cdot k_{app} \cdot t]^{-\frac{1}{n-1}} \quad \text{für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.4-14})$$

4.2 Temperaturabhängige Kinetik

Die Geschwindigkeitskonstante k beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit und ist durch unterschiedliche Ansätze beschreibbar.

4.2.1 Arrhenius Ansatz

Ein Ansatz dafür die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante ist die Arrhenius-Beziehung, eigentlich aus der klassischen chemischen Reaktionstechnik (Emig, et al., 2005)

$$k = k_0 \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{R \cdot T}\right)} \quad (\text{Gl.4-15})$$

Dabei ist k_0 der Frequenzfaktor, E_A die Aktivierungsenergie, R die allgemeine Gaskonstante und T die Reaktionstemperatur in Kelvin.

Der Ansatz von Arrhenius findet auch in der Form

$$k = k_{ref} \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right)} \quad (\text{Gl.4-16})$$

Verwendung. k_{ref} ist eine Referenzgeschwindigkeitskonstante bei einer Referenztemperatur T_{ref} . Ein Vergleich der Gleichungen (Gl.4-15) und (Gl.4-16) ergibt, dass

$$k_0 = k_{ref} \cdot e^{\left(\frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T_{ref}}\right)} \quad (\text{Gl.4-17})$$

ist und sich damit für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k keine Unterschiede ergeben. Der Vorteil der Variante nach Gleichung (Gl.4-17) liegt in der etwas besseren numerischen Identifikation durch eine geringere Korrelation der Parameter (van Boekel, 1996).

Die überwiegend zu findenden Identifikationen basieren jedoch auf dem Standardansatz nach (Gl.4-16). Dieser findet sowohl in der klassischen Reaktionstechnik, der Bioprozesstechnik als auch in der Molkereitechnik Anwendung (vgl. (Emig, et al., 2005), (Chmiel, 2006), (Kessler, 2006)).

4.2.2 Theorie des aktivierten Übergangskomplexes

Diese Theorie geht davon aus, dass während des Reaktionsablaufes ein sogenannter Übergangszustand bzw. aktivierter Komplex durchlaufen wird. Dabei wird angenommen, dass sich dieser Komplex mit den Ausgangsstoffen im Gleichgewicht befindet (vgl. (Dannenberg, 1986)). Der um den aktivierten Komplex zu erreichende erforderliche Energieaufwand ist die Aktivierungsenergie E_A . Eyring (Eyring, 1935) definiert die Geschwindigkeitskonstante zu

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h_P} \cdot e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}} \quad (\text{Gl.4-18})$$

Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante und h_B das Plancksche Wirkungsquantum (auch Planck-Konstante genannt).

Mit der Definition der Gibbs-Enthalpie und deren Änderung im aktivierten Komplex

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T \cdot \Delta S^\# \quad (\text{Gl.4-19})$$

folgt

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h_P} \cdot e^{\frac{\Delta S^\#}{R}} \cdot e^{\frac{-\Delta H^\#}{R \cdot T}} \quad (\text{Gl.4-20})$$

Unter der Annahme, dass die Aktivierungsenergie E_A gleich der Differenzenthalpie $\Delta H^\#$ ist, ergibt ein Vergleich der Gleichungen (Gl.4-20) mit (Gl.4-15)

$$k_0 = \frac{k_B \cdot T}{h_P} \cdot e^{\frac{\Delta S^\#}{R}} \quad (\text{Gl.4-21})$$

Berechnungen der Entropieänderung $\Delta S^\#$ aus der Geschwindigkeitskonstanten k lassen je nach Vorzeichen Rückschlüsse auf den Ordnungsgrad des Produktes im Vergleich zum Edukt zu. So lässt sich eine negative Entropieänderung als eine Zunahme des Ordnungsgrades interpretieren, eine positive Änderung steht somit für eine Abnahme des Ordnungsgrades.

5 Kinetiken der Denaturierung von Molkenproteinen

Die Denaturierung von Molkenproteinen in Produktionsanlagen hat verschiedene Ursachen. So hat die Temperatur bei entsprechender Verweilzeit einen deutlichen Einfluss auf die Proteine. Ob in Sterilisationsstrecken bei hohen Temperaturen und kurzen Verweilzeiten oder in Eindampfanlagen bei niedrigeren Temperaturen und größeren Verweilzeiten, eine Denaturierung durch Hitze liegt immer vor. Daher sind Untersuchungen des Temperatureinflusses von großer Wichtigkeit.

Ändern sich im Verlauf der Verarbeitung die Konzentrationen, beispielsweise durch Eindampfung oder die Aufkonzentrierung in Membrananlagen, so hat dies ebenfalls über die Reaktionsgeschwindigkeit Einfluss auf die Denaturierung der Proteine und damit auf deren Wertigkeit im Lebensmittel.

Weitere Einflussfaktoren im Hinblick auf die Denaturierung sind der pH-Wert (z.B. in Sauer-
milch) oder ein sehr hoher Betriebsdruck bei der Drucksterilisation von Milch.

Nachfolgend liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den Einflüssen von Temperatur, Konzentrationen und pH-Wert auf die Denaturierung der Proteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin.

Die Forschungsarbeiten zur Kinetik der Molkenproteine unterscheiden sich zunächst grundsätzlich darin, welches Erhitzungsmedium als Basis dient. So kommt beispielsweise Magermilch zum Einsatz (z.B. (Lyster, 1970), (Manji, et al., 1986), (Dannenber, 1986)) oder Magermilch aus Magermilchpulver bzw. Vollmilch aus Vollmilchpulver (z.B. (Anema, 2000), (Anema, et al., 1996)). Um den Einfluss von Nichtproteinen auf die Kinetik auszuschließen untersuchen etliche Autoren synthetische Lösungen von Molkenproteinen. Einerseits basieren diese auf Lösungen von Molkenproteingemischen (z.B. (Galani, et al., 1997), (Wolz, et al., 2015)), andererseits auf Lösungen von isolierten Molkenproteinen, wie isoliertes β -Lactoglobulin (z.B. (De Wit, et al., 1980), (Gotham, et al., 1992), (Croguennec, et al., 2004)).

Ein weiterer Unterschied zeigt sich bei der Vermessung des Proteins β -Lactoglobulin. Hier findet teilweise eine Kinetikbestimmung für die Proteinformen A und B in Summe statt (z.B. (Lyster, 1970), (Anema, 2000)), ebenso finden sich Arbeiten, bei denen diesbezüglich eine getrennte Betrachtung erfolgt (z.B. (Dannenber, 1986), (Oldfield, et al., 2005)). Selbst die Arbeiten eines Autors sind hier nicht immer konsequent (z.B. (Anema, et al., 1996): β -Lactoglobulin A und B getrennt, (Anema, 2000) und (Anema, et al., 2006): β -Lactoglobulin gesamt).

Die Arbeiten von Dannenberg zur Molkenproteindenaturierung (z.B. (Dannenber, et al., 1988a), (Dannenber, et al., 1988b)) finden in nahezu allen Veröffentlichungen ab 1989 große Beachtung. Sie stellen praktisch eine Referenz für andere Arbeiten zum Thema dar. Daher erfolgt im Weiteren der Vergleich von Kinetiken mit Bezug auf die von Dannenberg ermittelten Reaktionskinetiken.

Die Tabellen Tab. 5-1 und Tab. 5-2 zeigen eine Auflistung von Ergebnissen basierend auf Untersuchungen von Milch bzw. auf Milch, hergestellt aus Magermilchpulver (ohne den Anspruch auf Vollständigkeit)

Verfasser/Jahr	Erhitzungsmedium	Analysenmethode	Protein	T-Bereich [°C]	Reaktionsordnung n	k*1000 [1/s]	ln(k0)	EA [kJ/mol]	ΔH* [kJ/mol]	ΔS* [J/(mol K)]	Bemerkung
Lyster 1970	Magermilch	Immundiffusionsmethode	β-Lg	68-90	2		87,4	279			k für C(t)/CO in
				90-135	2		13,8	55		[(g/kg)^(1-n)*1/s]	CO=2,72 g/kg
				90-155	1		16,5	69		kges = k*CO^(n-1)	
Manji 1986	Magermilch	FPLC	β-Lg A	70-90	2		87,3	276			
				90-140			4,8	46			
				70-90	2		81,1	260			
				90-140			11,6	46			
				70-90	1		52,1	176			
				90-140			16,7	71			
Dannenberg 1988	Magermilch	UDIEF	β-Lg A	70-90	1,5		84,2	265	262,28	450	
				95-150			14,4	54	50,80	-140	
				70-90	1,5		89,4	280	277,02	490	
				95-150			12,7	48	44,48	-150	
				70-80	1		84,9	269	265,66	450	
				85-150			17,0	69	65,80	-110	
Anema 1996	Vollmilch aus Milchpulver	native PAGE	β-Lg A	70-85	1,5		84,9	263	260,58	450	Durchschnittswerte,
				100-115			14,1	51	47,98	-140	Normierung mit
				70-85	1,5		96,4	296	0,00	547,5	rel. Konzentration
				100-115			8,4	34	30,71	-190	
				70-85	1		60,2	195	192,22	250	
				100-115			13,5	58	54,39	-140	
Plock 1997	verdünntes Süßmolkekonzentrat (auf 39,6 g/l Gesamtproteine)	RP HPLC	β-Lg A	75-95	1,5		90,9	291			CO = 11-16,4 mg/ml
				96-120			25,5	91			
				75-95	2		141,8	444			ln(k0) für
				96-120			24,8	86			k*CO^(n-1)
				75-80	1		123,9	383			
				85-120			23,1	86			CO = 2,87-4,28 mg/ml
Law 1997	Magermilch, verdünnt mit UF-Permeat auf 75% 50% 25% mit aufkonzentrierten Proteinen 100% 125% 150% 200%	Gel Permeations FPLC	β-Lg 25	80	1,5	0,585					
				β-Lg 50			0,644				
				β-Lg 75			1,03				
				β-Lg 100			2,06				
				β-Lg 125			2,24				
				β-Lg 150			2,59				
				β-Lg 200			3,61				
				α-La 100			0,73				
				α-La 125			0,78				
				α-La 150			0,93				
α-La 200			1,37								

Tab. 5-1 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Milch a)

Verfasser/Jahr	Erhitzungsmedium	Analysemethode	Protein	T-Bereich [°C]	Reaktions- ordnung n	k*1000 [1/s]	ln(k0)	EA [kJ/mol]	ΔH* [kJ/mol]	ΔS* [J/(mol K)]	Bemerkung								
Oldfield 1998	Magermilch	native PAGE	β-Lg A	70-90	1		91	285,5				CO=1,79 g/kg							
				95-130	1,2		15,3	58,8				CO=1,56 g/kg							
				70-90	1,4		95,1	296,7				CO=1,94 g/kg							
				95-130	1,6		10,9	44				CO=1,76 g/kg							
				70-80	0,9		62,6	203,3				CO=0,74 g/kg							
				85-130	1		11,9	52,9				CO=0,73 g/kg							
Anema 2000	Magermilch aus Milchpulver	native PAGE	β-Lg 9,6%TS	75-90	1,5		82,3	259,8	356,86	430	Normierung k0 mit rel. Konzentration								
				90-100			8,2	36,3	33,27	-190									
				75-90			85,1	269,5	266,55	580									
				90-100			26,4	92,4	89,31	-170									
				75-90			98,5	310,5	307,57	630									
				90-100			32,8	112,4	109,34	30									
				75-90			100,8	319,1	316,15	640									
				90-100			38,0	128,3	125,27	140									
				75-80			56,7	186,5	183,6	0,22									
				80-100			28,0	12,1	99,1	-0,02									
Anema 2001	Magermilch aus Milchpulver	native PAGE	α-La 19,2%TS	75-80	1		66,2	214,1	211,2	0,3									
				80-100			27,9	101,5	98,4	-0,02									
				75-80			57,6	189,2	186,3	0,22									
				80-100			29,8	107,4	104,4	-0,01									
				75-80			55,2	182,3	179,4	0,21									
				80-100			32,3	109,8	106,8	-0,0002									
				Oldfield 2005			Magermilch	native PAGE	β-Lg A	80		1,5		1,68				k für C(t)/CO in [(g/kg)^(1-n)*1/s] kges = k*CO^(n-1)	CO = 1,86 g/kg
										90				9,60					
										120				86,00					
										80				2,04					
90	15,50																		
120	92,00																		
80	1,01																		
120	9,30																		
Anema 2006	Magermilch aus Milchpulver TS=9,6%	native PAGE	β-Lg		75-90	1					83,0			262			ln(k0) für k*CO^(n-1)		CO=3,33 g/kg
					90-100						10,0			42					
				75-80	56,3		185												
				85-100	20,9		81												
				Dissanayake 2013	Milch Retentat aus Membrananlage verdünnt mit Permeat Gew.% Proteine a) 10 b) 17,5 c) 25 jeweils pH 4 5 6		Kapillar- Elektrophorese	β-Lg a) pH 4 β-Lg a) pH 5 β-Lg a) pH 6 β-Lg b) pH 4 β-Lg b) pH 5 β-Lg b) pH 6 β-Lg c) pH 4 β-Lg c) pH 5 β-Lg c) pH 6	140		1		40						
									174										
62																			
46																			
64																			
74																			
42																			
44																			
46																			

Tab. 5-2 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Milch b)

Verfasser/Jahr	Erhitzungsmedium	Analysemethode	Protein	T-Bereich [°C]	Reaktionsordnung n	k*1000 [1/s]	ln(k0)	EA [kJ/mol]	ΔH* [kJ/mol]	ΔS* μ/(mol K)	Bemerkung				
Dupont 1961	PO4-Lsg. pH 6,9	Löslichkeit bei pH 5,2 und Abs. bei 280 nm	β-Lg	70-90	2				250	470	Parameter 72°C max. 60% Umsatz				
Gough 1962	β-Lg A und B in PO4-Lsg. pH 6,7	Löslichkeit bei pH 5 und N-Bestimmung	β-Lg A	67-75	1				272	479	Durchschnittswerte				
			β-Lg B					320	623						
			β-Lg gesamt					297	553						
Pantaloni 1964	PO4-Lsg. pH 6,9	ORD	β-Lg	68-80	1				160	167	Parameter 75°C				
Dupont 1965	PO4-Lsg. pH 6,85	ORD	β-Lg A	30-75	2										
			β-Lg B												
			β-Lg A					209	364	Parameter für 75°C					
de Wit 1980	β-Lg PO4-Lsg. pH 6,85	DSC	β-Lg	65-72	1			343							
			β-Lg	<90	2			520							
Park 1984	β-Lg PO4-Lsg. pH 7,0	DSC	β-Lg	75-90	1			376	373	730	Durchschnittswerte				
Galani 1999	gefriergetr. Proteine aus Rohmilch in Lösung	GP-FPLC	β-Lg	95-120	2			70	66	-90					
			β-Lg A a)			1,96	0,35					k für C(t)/CO in [(g/L)^(1-n)*1/s]			
Croguennec 2004	β-Lg A bzw. B in H2O, pH 6,6 a) ohne Salz b) 15 mM/L NaCl c) 1 mM/L CaCl2	HP-GPC	β-Lg A b)	85	1,35	1,35									
			β-Lg A c)		1,95	1,07									
			β-Lg B a)		1,98	0,85								kges = k*CO^(n-1)	
			β-Lg B b)		1,11	4,25									
			β-Lg B c)		1,33	4,52								CO=7g/l	
Woliz 2015	Milkenprotein-konzentrat (mit 50,2% β-Lg) in H2O auf 10-40 Gew.% β-Lg	RP-HPLC	β-Lg	70-80 10%	1,5		111,1	342				k für C(t)/CO in [(%)/(1-n)*1/s]			
				80-95 10%		37,5	126								
				70-80 20%		109,0	334								
				80-95 20%		37,0	123								
				70-80 30%		106,6	326								kges = k*CO^(n-1)
				80-95 30%		37,0	111								
70-80 40%	85,6	263									CO in Gew.%				
80-95 40%	33,4	110													

Tab. 5-3 Reaktionskinetische Untersuchungen zur Denaturierung von Molkenproteinen in Lsg.

Tabelle Tab. 5-3 zeigt die Ergebnisse zu reaktionskinetischen Versuchen auf der Basis von Molkenproteinen in Lösung (ohne Anspruch auf Vollständigkeit). Während einige Untersuchungen Lösungen mit isolierten Proteinen verwenden (z.B. (Gough, et al., 1962), (De Wit, et al., 1980) oder (Croguennec, et al., 2004)), untersuchen andere Lösungen aus Molkenproteingemischen (z.B. (Galani, et al., 1999) oder (Wolz, et al., 2015)).

Die aufgeführten Arbeiten weisen bereits offensichtliche Unterschiede bei der Herangehensweise auf. Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Kinetik der Denaturierung von Molkenproteinen sind damit nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. Sie unterscheiden sich in etlichen Punkten. Ohne den Anspruch auf Vollständigkeit sind dies:

- 1) Erhitzungsmedium
 - a) Magermilch (z.B. (Lyster, 1970), (Dannenbergh, 1986), (Oldfield, et al., 2005))
 - b) Magermilch aus Milchpulver (z.B. (Anema, 2000))
 - c) Vollmilch aus Milchpulver (z.B. (Anema, et al., 1996))
 - d) Milch-Retentate aus Membrananlagen (z.B. (Dissanayake, et al., 2013))
 - e) verdünnte Süßmolke aus Eindampfkonzentraten (z.B. (Plock, et al., 1997))
 - f) Lösungen aus Proteinkonzentrat (z.B. (Galani, et al., 1999), (Wolz, et al., 2015))
- 2) Konzentrationen
 - a) der Proteine (z.B. (Law, et al., 1997), (Anema, 2000), (Wolz, et al., 2015))
 - b) Verhältnis β -Lactoglobulin A zu β -Lactoglobulin B (z.B. (Gough, et al., 1962))
 - c) Salzkonzentrationen (z.B. (Croguennec, et al., 2004))
- 3) pH-Wert (z.B. (Dissanayake, et al., 2013))
- 4) Analysemethoden
- 5) unterschiedliche kinetische Ansätze
 - a) Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten nach Arrhenius nach Gleichung (Gl.4-15) oder (Gl.4-16)
 - b) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten in der Form k_{app} (vgl. Gleichung (Gl.4-9) oder $k_n \cdot (c_0)^{n-1}$ nach Gleichung (Gl.4-7))
- 6) Differenzierung nach β -Lactoglobulin A und B oder die Bestimmung von β -Lactoglobulin gesamt.
- 7) Versuchsdurchführung
 - a) Labor- oder Pilotanlage
 - b) Aufheizvorgang (Form und Dauer)
 - c) Art der Beheizung, beispielsweise mittels Thermostat oder Direktdampfeinspritzung

- d) Probenahme (mehrere Einzelproben vorab, die getrennt unabhängig voneinander entnommen werden können oder Entnahme aus einem Gesamtansatz)
- e) Behandlung der Proben nach der Entnahme, z.B. Abkühlung für X Minuten im Eisbad

Zu 1)

Wird davon ausgegangen, dass Rohmilch eine einigermaßen gleiche Zusammensetzung aufweist, so ist es wahrscheinlich, dass gleiche Erhitzungsmedien zumindest ähnliche Startbedingungen für Untersuchungen liefern und damit die Ergebnisse vergleichbar sind. Dennoch ist es ein Unterschied, ob beispielsweise Magermilch direkt zum Einsatz kommt oder Magermilch basierend auf Magermilchpulver. So hat über Eindampfung erzeugtes Magermilchpulver im Vergleich zu frischer Magermilch bereits eine nicht unerhebliche Wärmebehandlung erfahren. Es ist daher davon auszugehen, dass selbst bei schonender Erhitzung mit Abweichungen hinsichtlich der Zusammensetzung zu rechnen ist. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn mit einer Geschwindigkeitskonstanten k_{app} nach Gleichung (Gl.4-9) gearbeitet wird, da hier die Startkonzentration in k_{app} enthalten ist.

Bei Erhitzungsmedien basierend auf isolierten Proteinen liegen keine Einwirkungen von NebenkompONENTEN vor, ein direkter Vergleich mit auf Milch basierten Medien erscheint damit quantitativ nicht sinnvoll. Qualitativ ist ein Vergleich denkbar, um Tendenzen abzuschätzen.

Zu 2)

Grundsätzlich gelten vermessene Kinetiken nur im untersuchten Bereich. Ändert sich die Zusammensetzung durch Zugabe von beispielsweise Salzen oder variiert das Verhältnis von β -Lactoglobulin A zu β -Lactoglobulin B und wird hierbei die Denaturierung des Gesamt- β -Lactoglobulins gemessen, kommt es selbst unter ansonsten identischen Bedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Zu 3)

Der pH-Wert hat einen erheblichen Einfluss auf das Verhalten von Milch. Unterscheiden sich die pH-Werte bei ansonsten gleicher Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen deutlich, so ist mit unterschiedlichen Ergebnissen zu rechnen. Bewegt sich der pH-Wert jedoch in engen Grenzen, so ist dessen Einfluss vermutlich eher gering (Ausnahme in der Nähe des isoelektrischen Punktes).

Zu 4)

Unterschiedliche Analysemethoden haben unterschiedliche Genauigkeiten. Abweichungen hinsichtlich Konzentrationsmessungen liegen daher immer vor. Nicht alle Methoden eignen sich für

detaillierte Messungen, beispielsweise für die Differenzierung von β -Lactoglobulin A und β -Lactoglobulin B. Dies könnte der Grund dafür sein, dass einige Arbeiten dieses Protein summarisch betrachten, andere dagegen differenziert.

Analysemethoden die keine direkte Konzentrationsmessung ermöglichen, sondern lediglich Änderungen relativ zur Ausgangsreferenzmessung erlauben, bedingen zwangsläufig eine Formulierung der kinetischen Geschwindigkeitskonstanten als k_{app} in der Form nach Gleichung (Gl.4-8)

$$k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{(n-1)}$$

Damit hängt die Geschwindigkeitskonstante von der Anfangskonzentration c_0 ab und ist nicht auf andere Startkonzentrationen anwendbar da c_0 hier nicht bekannt ist.

Vermessungen mittels DSC (Differential Scanning Calorimetry) weisen im Übergangsbereich zwischen reiner Denaturierung und Aggregation die Enthalpie für beides aus (Denaturierung ist endotherm, Aggregation leicht exotherm). Es kommt somit zu einer Überlagerung wodurch die Bestimmung der Denaturierung verfälscht wird (Gotham, et al., 1992). Ergebnisse hierzu sind daher interpretationsfähig.

Zu 5)

Die verschiedenen Parameter nach 5) a) sind ineinander umrechenbar (siehe Gleichung (Gl.4-15)).

Für den Fall 5) b) gilt: liegen Informationen über die Startkonzentration c_0 vor, so hängen ermittelte Geschwindigkeitskonstanten über Gleichung (Gl.4-8) voneinander ab.

Zu 6)

Bei der Ermittlung von Kinetiken zu β -Lactoglobulin finden sich Veröffentlichungen, die hier zwischen β -Lactoglobulin A und β -Lactoglobulin B unterscheiden (z.B. (Gough, et al., 1962), (Dannenbergh, et al., 1988a) oder (Oldfield, et al., 2005)). Andere wiederum betrachten das gesamte β -Lactoglobulin (z.B. (De Wit, et al., 1980) oder (Dissanayake, et al., 2013)).

Auch hier ist prinzipiell eine Umrechnung möglich. So ist die Gesamtkonzentration c_t an β -Lactoglobulin die Summe aus den Konzentrationen der Varianten A und B, also c_{tA} und c_{tB} und somit

$$\frac{c_t}{c_0} = \frac{c_{tA} + c_{tB}}{c_{0A} + c_{0B}} \quad (\text{Gl.5-1})$$

Mit der Definition des Verhältnisses der Startkonzentrationen an β -Lactoglobulin A und B

$$\alpha_{AB} = \frac{c_{0A}}{c_{0B}} \quad (\text{Gl.5-2})$$

ergibt sich nach Umformung von Gleichung (Gl.5-1)

$$\frac{c_t}{c_0} = \frac{\frac{c_{tA}}{c_{0A}} \cdot \alpha_{AB} + \frac{c_{tB}}{c_{0B}}}{\alpha_{AB} + 1} \quad (\text{Gl.5-3})$$

eine einfache Gleichung mit deren Hilfe, bei Kenntnis des Wertes α_{AB} , aus den Abbauraten der Proteinvarianten A: c_{tA}/c_{0A} und B: c_{tB}/c_{0B} die Abbauraten des gesamten β -Lactoglobulins: c_t/c_0 berechenbar ist (Beispiel siehe Anhang).

Zu 7)

Die Versuchsdurchführung hat einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse. So ist es ein Unterschied ob die Vermessung in einer Laboranlage (z.B. (Dannenberg, et al., 1988a)) oder in einer Technikums-/Pilotanlage erfolgt (z.B. (Oldfield, 1996)). Während in kleinen Laboranlagen recht gut für definierte Bedingungen gesorgt werden kann (z.B. gute Durchmischung unter konstanten Temperaturbedingungen), weisen größere Anlagen Inkonsistenzen auf. Hier ist zumindest mit örtlich teilweise variierenden Temperaturbedingungen rechnen, im Bereich der Direktampfeinspritzung sogar mit deutlichen Temperaturüberhöhungen im Vergleich zur Durchschnittstemperatur im System.

Weiterhin spielt die Dauer und die Form des Aufheizvorganges eine Rolle, vor allem im höheren Temperaturbereich bei dem bei kurzer Verweil-/Haltezeit bereits hohe Umsätze erzielbar sind. Hier ist davon auszugehen, dass bereits während des Aufheizvorganges nennenswerte Raten an Denaturierung im Vergleich zur Haltezeit zustandekommen.

Die Art der Beheizung spielt ebenfalls eine Rolle. So ist eine Temperaturhaltung mittels eines Thermostaten bei kleinen Versuchsmengen gut zu bewerkstelligen. Bei Versuchen mit einer Beheizung mittels diskontinuierlicher Direktampfeinspritzung ist dies jedoch nicht der Fall (z.B. (Oldfield, et al., 1998)).

Ebenso kann sich die Probennahme und -behandlung auf die Messergebnisse und damit auf die Versuchsergebnisse insgesamt auswirken. So hat beispielsweise die Art und Dauer der Probenabkühlung/-aufbereitung einen Einfluss auf das Stoppen der Denaturierungsreaktion und damit auf den Zusammenhang zwischen der Zeit der Probennahme und der Zeit der Analyse.

5.1 Denaturierungskinetiken von β -Lactoglobulin

Mehr als 50 Gew.% der Molkenproteine in Kuhmilch bestehen aus β -Lactoglobulin (Dannenberg, 1986). Damit ist β -Lactoglobulin besonders wichtig bei der Beurteilung von Proteinschädigungen im Verarbeitungsprozess von Milch. In den nächsten Unterkapiteln erfolgt zunächst ein Vergleich der Reaktionsordnungen unterschiedlicher Arbeiten. Des Weiteren findet eine Analyse zu Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeiten der Kinetiken statt, sowie Betrachtungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die Denaturierungskinetik von β -Lactoglobulin.

5.1.1 Analysen zur Reaktionsordnung

Die Beschreibung der Kinetik zur Denaturierung von β -Lactoglobulin erfolgt üblicherweise nach Gleichung (Gl.4-7) für eine Reaktionsordnung $n \neq 1$ mit der Geschwindigkeitskonstanten k^*

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n-1) \cdot k^* \cdot t]^{-\frac{1}{n-1}} \text{ für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.5-4})$$

wobei k^*

$$k^* = k_n \cdot c_0^{(n-1)} \quad (\text{Gl.5-5})$$

bei bekannter Startkonzentration c_0 ist. Ist dagegen c_0 unbekannt, so ist

$$k^* = k_{app} \quad (\text{Gl.5-6})$$

und gilt lediglich für die (unbekannte) Startkonzentration.

Für den Sonderfall einer Reaktion erster Ordnung ergibt sich für den Verlauf der Denaturierung laut Gleichung (Gl.4-6)

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t} \text{ für } n=1$$

mit einer von der Startkonzentration unabhängigen Geschwindigkeitskonstanten.

Strukturelle Unterschiede in der Beschreibung der Reaktionskinetik sind in der Reaktionsordnung zu finden. Kinetiken auf Basis von Milch bzw. Milchpulver weisen überwiegend eine Reaktionsordnung von $n = 1,5$ auf. Nur wenige Arbeiten identifizieren eine Reaktionsordnung von 1 oder 2 (vgl. Tabellen Tab. 5-1 und Tab. 5-2).

Arbeiten mit Süßmolke zeigen eine Reaktionsordnung von 2 (Plock, et al., 1997). Es ist bekannt, dass Komponenten der Milch die Denaturierung von Proteinen beeinflussen. So zeigt Kessler (Kessler, et al., 1991), dass Beimischungen von Casein zu Süßmolke die Reaktionsordnung im Falle von β -Lactoglobulin von 2 auf 1,5 reduzieren. Damit deutet auch die Arbeit von Plock auf eine Reaktionsordnung von 1,5 in Milch.

Untersuchungen mit variierenden Konzentrationen an Proteinen zeigen eine Ordnung von $n = 1,5$ über einen breiten Temperaturbereich (Kessler, et al., 1991), (Law, et al., 1997), (Anema, 2000)). Eine einzige Arbeit identifiziert hier eine Reaktionsordnung von $n = 1$ (Dissanayake, et al., 2013), wobei hier lediglich bei einer einzigen Temperatur von 140°C bei vom Standard-Wert von Milch abweichenden pH-Werten (4,5,6) gemessen wurde.

Alle Arbeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen zeigen allerdings eine gleichbleibende Reaktionsordnung. Anema (Anema, 2000) vermutet, dass der Reaktionsmechanismus von der Konzentration praktisch unabhängig ist und damit keine Änderung bzgl. der Reaktionsordnung bewirkt.

Auch Arbeiten mit Proteinlösungen, z.B. (Wolz, et al., 2015) zeigen eine weitgehende Unabhängigkeit der Reaktionsordnung von der Proteinkonzentration.

Dies lässt den Schluss zu, dass der Einfluss der Konzentration auf die Reaktionsordnung im Allgemeinen vernachlässigbar gering ist.

Dannenberg gibt bei einer ersten Auswertung seiner Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Reaktionsordnungen an (Dannenberg, 1986). Für β -Lactoglobulin A schwanken diese zwischen 1,3 und 1,5 mit einem Mittelwert von 1,4 (zusätzlich zweier Extremwerte von 1,1 und 1,8), für β -Lactoglobulin B liegen die Werte zwischen 1,4 und 1,7 mit einem Mittelwert von 1,5 (zusätzlich eines Extremwertes von 2,1 bei 150°C). Nach Dannenberg (Dannenberg, 1986) können bei reaktionskinetischen Überlegungen die entsprechenden Konzentrations-Zeit Gesetze für β -Lactoglobulin A und B mit einer Reaktionsordnung von 1,5 mit hinreichender Genauigkeit Anwendung finden. Mit dieser Reaktionsordnung erfolgten dann seine Auswertungen zur Identifikation der Kinetikparameter.

Loveday (Loveday, 2016) hat in seiner Arbeit Messdaten unterschiedlicher Untersuchungen neu ausgewertet, unter anderem auch die von Dannenberg, basierend auf (Dannenberg, 1986). Die

in nahezu allen Untersuchungen angewandte Methode der Parametergewinnung ist die Integralmethode, einige wenige arbeiten mit der Differentialmethode. Loveday (Loveday, 2016) analysierte umfangreiche Messdaten anderer Veröffentlichungen, allerdings mittels nichtlinearer Regression. Die damit identifizierten Parameter weichen von den Ergebnissen der anderen Autoren ab. So schwanken seine Reaktionsordnungen auf Basis der Messdaten von Dannenberg (Dannenberg, 1986) für β -Lactoglobulin B zwischen 1,57 und 1,96 bei einem Mittelwert von 1,7 (Dannenberg ermittelt 1,5).

Abbildung 5-1 zeigt einen Vergleich von Kinetiken unterschiedlicher Reaktionsordnung bis zu einem Denaturierungsgrad von 80%.

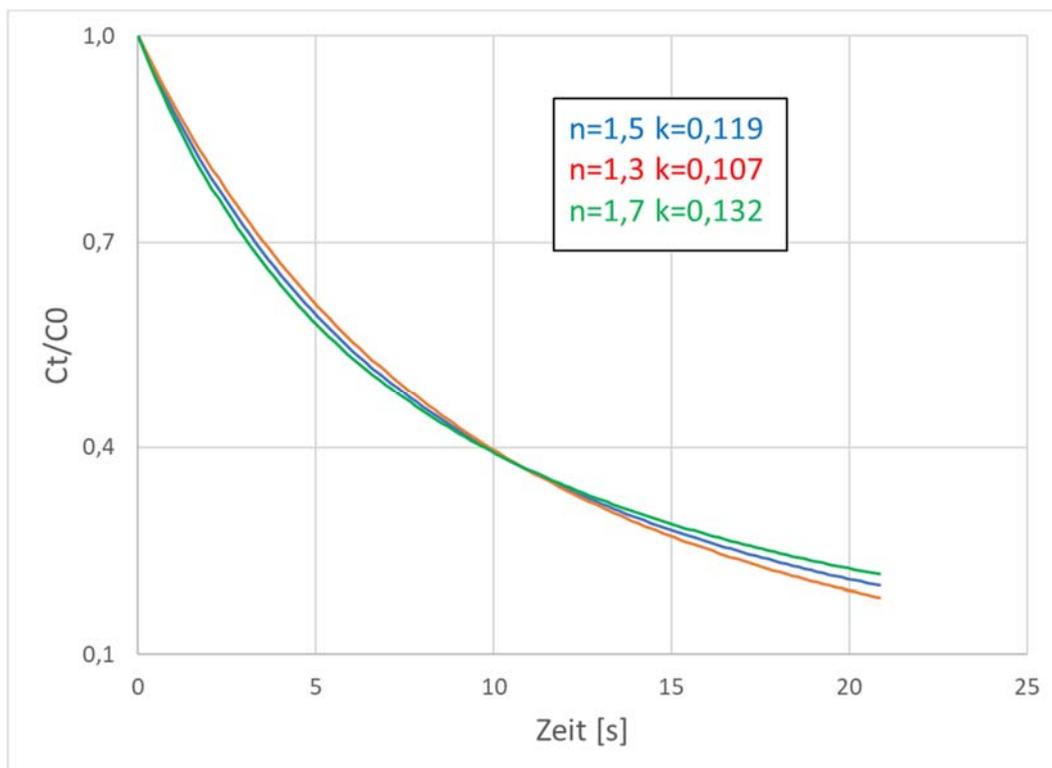


Abbildung 5-1: Zeitverlauf der Denaturierung von β -Lactoglobulin A bei 120°C mit Kinetiken unterschiedlicher Reaktionsordnung (Dannenberg 1988 $n=1,5$; $n=1,3$ mit angepasstem k , $n=1,5$ mit angepasstem k)

Die Basiskurve ist die Denaturierung von β -Lactoglobulin A bei 120°C (Dannenberg, et al., 1988a): Parameter k [1/s] berechnet über den Arrhenius-Ansatz nach Gleichung (Gl.4-15) mit einer Aktivierungsenergie von $E_A = 54070$ [J/mol] und einem Frequenzfaktor $\ln(k_0) = 14,41$, bei einer Reaktionsordnung von $n = 1,5$). Für die Vergleichskurven mit $n = 1,3$ bzw. $1,7$ erfolgte eine numerische Optimierung der Geschwindigkeitskonstanten k gegen die Kurve mit Daten von Dannenberg. Ein Vergleich der Kurvenwerte für $n = 1,3$ mit $k = 0,107$ im Vergleich zu $n = 1,5$ ergibt eine Abweichung von maximal +1,8%/-1,6%, für $n = 1,7$ mit $k = 0,132$ im Vergleich

zu $n = 1,5$ mit $k = 0,119$ von maximal $+3,2\%$ / $-3,3\%$. Ähnlich gute, nahe beieinanderliegende Ergebnisse lassen sich auch für andere Beispiele erzielen. D.h. weicht die Reaktionsordnung nicht zu stark vom Mittelwert ab, sind mit einer mittleren Reaktionsordnung ähnlich gute Ergebnisse erzielbar.

Das bedeutet, dass eine konstante Reaktionsordnung von $n = 1,5$ für praktische Anwendungen ausreichend ist um die Kinetik der Denaturierung von β -Lactoglobulin zu beschreiben.

Reaktionsordnungen von isolierten Proteinen oder Proteinmischungen in Lösung zeigen überwiegend einen Wert von 1 oder 2 (vgl. Tabelle Tab. 5-3). Lediglich die Arbeit von Wolz (Wolz, et al., 2015) weist hier eine Reaktionsordnung von $n = 1,5$ auf. Wolz untersucht allerdings das Denaturierungsverhalten bei variierenden Proteinkonzentrationen bis zu 40 Gew.% Proteingemisch in Wasser und liegt damit deutlich über den Konzentrationen anderer Arbeiten (z.B. (Galani, et al., 1999)). Auch im Vergleich mit natürlichen Proteingehalten in Milch liegt diese Arbeit bezüglich der Konzentrationen wesentlich darüber. Die Ergebnisse von Wolz legen jedoch nahe, dass in Proteinlösungen deren Konzentrationen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Reaktionsordnung besitzen.

Fazit

Die Untersuchungen in Milch bzw. Lösungen aus Milchpulver und Süßmolke lassen den Schluss zu, dass die Formulierung der Reaktionskinetik zur Denaturierung von β -Lactoglobulin in Milch mit einer Reaktionsordnung von $n = 1,5$ gut beschreibbar ist. Dies zeigt sich in einem weiten Temperaturbereich von 70 bis 150°C. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass in weiten Konzentrationsbereichen das Arbeiten mit einer praktisch konstanten Reaktionsordnung möglich ist.

5.1.2 Temperaturabhängigkeit der Kinetik

Der Temperaturbehandlung von Milch hat eine große Bedeutung bei der Verarbeitung. Während bei der Sterilisation höhere Temperaturen mit kurzer Verweilzeit zur Anwendung kommen (geringe Produktschädigung bei gleichzeitig hohem Sterilisationsgrad) erfolgt die Eindampfung bei niedrigeren Temperaturen und höherer Verweilzeit (geringe Produktschädigung).

Da unterschiedliche Temperaturen in den Prozessen zum Einsatz kommen, ist es von besonderem Interesse ganze Temperaturbereiche beschreiben zu können. Ein bewährter Ansatz ist der von Arrhenius (vgl. Gleichung (Gl.4-15)). Für die Denaturierung von β -Lactoglobulin ist jedoch keine einheitliche Beschreibung für einen weiten Temperaturbereich möglich.

Temperaturbereiche

Unter Verwendung von (Gl.4-15) ergibt sich nach dem Logarithmieren

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{Gl.5-7})$$

und damit eine Geradengleichung bei einer Auftragung von $\ln(k)$ über $1/T$.

Abbildung 5-2 zeigt den temperaturabhängigen Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} für β -Lactoglobulin A und B, basierend auf den Daten von Dannenberg (Dannenberg, 1986). Zur einfacheren Lesbarkeit ist die die Abszisse mit dem Faktor 1000 multipliziert.

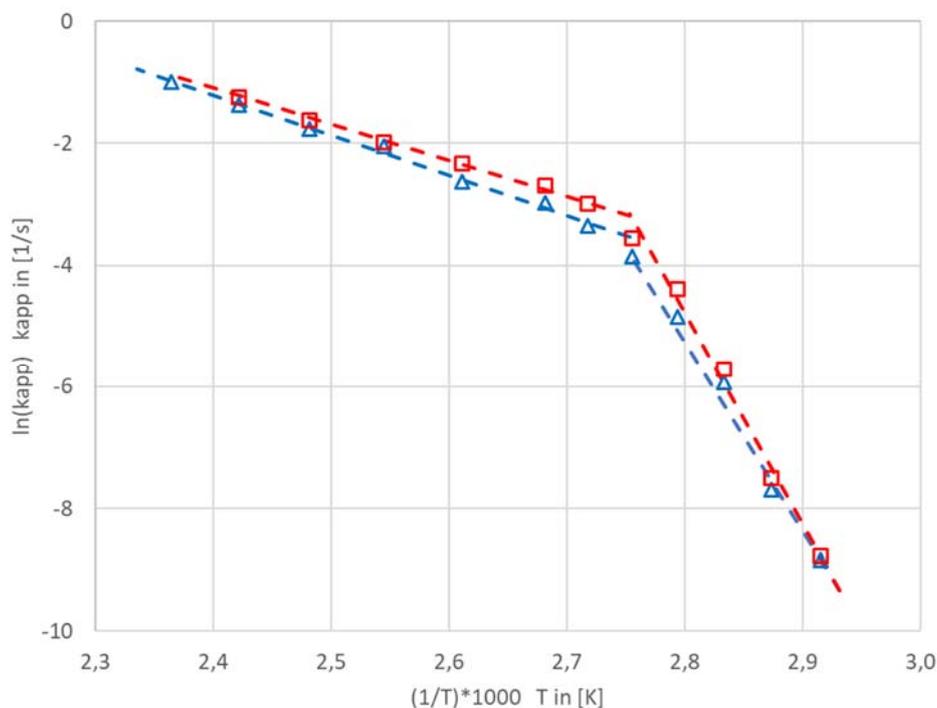


Abbildung 5-2 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} für die Denaturierung von β -Lactoglobulin A und B nach Arrhenius (k_{app} in [1/s]) (Dannenberg, 1986)

Auffallend ist, dass es zwei Temperaturbereiche gibt, in denen sich die Steigung deutlich unterscheidet. Die Temperatur am „Knickpunkt“ liegt bei 90°C für beide Varianten des β -Lactoglobulins. Auch andere Veröffentlichungen zeigen diesen Knick in der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten.

Nach Dannenberg (Dannenberg, et al., 1988a) beschreibt die Denaturierungskinetik einerseits den Effekt der eigentlichen Denaturierung, also der Auffaltung des Proteins. Andererseits

ist die Aggregation dieser Proteine enthalten. Bis zu einer Temperatur von etwa 90°C ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Denaturierung. Oberhalb von 90°C ist die Aggregation der zeitbestimmende Schritt, der einer anderen Beschreibung bedarf wie die reine Denaturierung. Als Grundlage für diese Schlüsse zieht Dannenberg die Berechnung der unterschiedlichen Aktivierungsenthalpien sowie der Aktivierungsentropien nach der Theorie des aktivierten Übergangskomplexes in den beiden Temperaturbereichen heran (vgl. 4.2.2). So ergeben sich im oberhalb von 90°C Aktivierungsenthalpien in einer Größenordnung, die eher einer chemischen Reaktion entsprechen, während sie unterhalb von 90°C etwa vier Mal so große Werte annehmen. Bei der Berechnung der Aktivierungsentropien berechnet er unterhalb von 90°C positive Werte, d.h. die Entropie nimmt zu. Dies lässt sich als die Auffaltung der Proteine und damit mit einer „Zunahme an Unordnung“ interpretieren. Über 90°C ist die Aktivierungsentropie negativ, wodurch eine „Abnahme der Unordnung“ erfolgt. Dies wiederum ist mit der Aggregation der Proteine interpretierbar.

Tab. 5-4 zeigt den Punkt des Steigungswechsels für die Geschwindigkeitskonstante $k_{app} = f(1/T)$ aus verschiedenen Arbeiten. Mit zwei Ausnahmen liegt der Wechsellpunkt bei 90°C. Die beiden Ausnahmen sind bei Messungen in Vollmilch aus Milchpulver mit 85°C (Anema, et al., 1996) und bei Untersuchungen in Süßmolke als Produkt einer Eindampfanlage entstanden (95°C, (Plock, et al., 1997)). Selbst bei Arbeiten mit gefriergetrockneten Proteinen in Lösung (Galani, et al., 1999) lag der Steigungswechsel bei 90°C. Damit kann zumindest für Magermilch ein zweiteiliger Temperaturbereich für die Geschwindigkeitskonstante mit einer Trennung bei 90°C als gesichert angesehen werden.

(Dannenberg, et al., 1988a)	90°C	Magermilch
(Anema, et al., 1996)	85°C	Vollmilch aus Milchpulver
(Anema, 2000)	90°C	Magermilch aus Milchpulver
(Anema, et al., 2006)	90°C	Magermilch aus Milchpulver
(Oldfield, et al., 1998)	90°C	Magermilch
(Lyster, 1970)	90°C	Magermilch
(Manji, et al., 1986)	90°C	Magermilch
(Plock, et al., 1997)	95°C	Süßmolke aus Eindampfanlage
(Galani, et al., 1999)	90°C	gefriergetrocknete Proteine in Lösung

Tab. 5-4 Steigungswechsel der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstante für β -Lactoglobulin A und B

Temperaturabhängigkeit

Der zeitliche Verlauf von c_t/c_0 berechnet sich zu

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n-1) \cdot k_n \cdot (c_0)^{(n-1)} \cdot t]^{-\frac{1}{n-1}} \text{ für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.4-7})$$

bzw. mit $k_n \cdot (c_0)^{n-1} = k_{app}$

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n-1) \cdot k_{app} \cdot t]^{-\frac{1}{n-1}} \text{ für } n \neq 1 \quad (\text{Gl.4-9})$$

(vgl. Kapitel 4.1).

Bei gleicher Reaktionsordnung ergibt sich mit dem Arrheniusansatz für die Geschwindigkeitskonstante

$$k_n = k_0 \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T}\right)} \quad (\text{Gl.4-15})$$

bzw. unter Einbeziehung der Startkonzentration c_0

$$k_{app} = k_{app0} \cdot e^{-\left(\frac{E_{Aapp}}{R} \cdot \frac{1}{T}\right)} \quad (\text{Gl.5-8})$$

und mit $k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{n-1}$

$$k_n \cdot (c_0)^{n-1} = k_{app0} \cdot e^{-\left(\frac{E_{Aapp}}{R} \cdot \frac{1}{T}\right)} \Leftrightarrow k_n = \frac{k_{app0}}{(c_0)^{n-1}} \cdot e^{-\left(\frac{E_{Aapp}}{R} \cdot \frac{1}{T}\right)} \quad (\text{Gl.5-9})$$

Durch Logarithmieren lassen sich die Gleichungen in eine Geradenform bringen

$$\ln(k_n) = \ln(k_0) - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{Gl.5-10})$$

und

$$(\text{Gl.5-11})$$

$$\ln(k_n) = \ln\left(\frac{k_{app0}}{(c_0)^{n-1}}\right) - \frac{E_{appA}}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

mit der Variablen $\frac{1}{T}$ mit der linear Abhängigen $\ln(k_n)$. In dieser Form ist die eigentliche Temperaturabhängigkeit nur durch die Aktivierungsenergie E_A bzw. E_{appA} gegeben, welche die Steigung der Geraden beeinflusst. Die Konstante $\ln(k_0)$ bzw. $\ln\left(\frac{k_{app0}}{(c_0)^{n-1}}\right)$ gibt lediglich eine vertikale Verschiebung der Geraden an.

Bei gleicher Reaktionsordnung ist selbst bei unterschiedlichen Startkonzentrationen lediglich die Aktivierungsenergie für die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten maßgeblich.

Für β -Lactoglobulin lässt sich eine Reaktionsordnung von $n = 1,5$ ansetzen (vgl. Kapitel 5.1.1).

Für vergleichbare Untersuchungen ergibt sich

		EA kJ/mol		EA Abw. zu Dannenberg	
		<90°C	>90°C	<90°C	>90°C
β -Lg A	mit n=1,5				
Dannenberg 86	Magermilch	265,21	54,07		
Anema 96	Vollmilch aus Pulver	263,49	51,14	-1%	-5%
		EA kJ/mol		EA Abw. zu Dannenberg	
		<90°C	>90°C	<90°C	>90°C
β -Lg B	mit n=1,5				
Dannenberg 86	Magermilch	279,96	47,75		
Anema 96	Vollmilch aus Pulver	296,46	33,87	6%	-29%
Oldfield 98	Magermilch (bis 90°C n=1,4 / über 90°C n=1,6)	296,7	44	6%	-8%
		EA kJ/mol		EA Abw. zu Dannenberg	
		<90°C	>90°C	<90°C	>90°C
β -Lg gesamt	mit n=1,5				
Dannenberg 86	Magermilch (β -Lg A+B) (TS=9,3-9,4%)	270,9	51,6		
Anema 2000	Magermilch aus Pulver (TS=9,6%)	259,8	36,3	-4%	-30%
Anema 2006	Magermilch aus Pulver (TS=9,6%)	262	42	-3%	-19%

Tab. 5-5 Vergleich der Aktivierungsenergien der Denaturierungskinetiken von β -Lactoglobulin in Milch, Reaktionsordnung $n = 1,5$

Dannenberg (Dannenberg, 1986) untersucht die Proteinvarianten A und B getrennt. Um einen Vergleich der Aktivierungsenergien für A und B gesamt zu ermöglichen, wurde der Denaturie-

rungsverlauf für β -Lactoglobulin A und B mit den jeweiligen Parametern bei einem angenommenen Verhältnis von A/B: $\alpha_{AB} = 1,46$ (Ng-Kwai-Hang, et al., 1996) bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Berechnung der Gesamtdenaturierung erfolgte nach Gleichung (Gl.5-3). Darauf basierend ließen sich für die Gesamtdenaturierung mittels nichtlinearer Regression temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstanten ermitteln, die über den Arrheniusansatz die in Tabelle Tab. 5-5 aufgeführten Aktivierungsenergien für Magermilch (β -Lg A+B) ergaben (siehe Anhang).

Für den Temperaturbereich $<90^{\circ}\text{C}$ liegen die Abweichungen der Arbeiten zwischen -4% und +6% und sind damit relativ klein. Im Temperaturbereich $>90^{\circ}\text{C}$ sind die Abweichungen größer, wobei zu berücksichtigen ist, dass Dannenberg in Magermilch misst, die anderen Arbeiten in Vollmilch bzw. Magermilch basierend auf Milchpulver durchgeführt wurden. Offensichtlich scheint hier im oberen Temperaturbereich ein deutlicherer Unterschied, bedingt durch das Erhitzungsmedium, zu bestehen. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede könnte in der Versuchsanlage begründet liegen. Während Dannenberg mit extrem kleinen Aufheizzeiten und konstanter Reaktionstemperatur durch Temperierbäder arbeitet, wurden die Versuche von Anema in einer Pilotanlage mit Direktdampfeinspritzung zur Beheizung durchgeführt. Dadurch bedingt sind die Aufheizzeiten unterschiedlich und es kommt vermutlich zu lokalen Überhitzungen, die eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge haben und damit bei der Parameteridentifikation zu kleineren Aktivierungsenergien führen. Durch die bei niedrigeren Temperaturen erforderlichen geringeren Dampfmengen ist dieser Effekt geringer ausgeprägt und der Einfluss damit kleiner.

Diese Überlegungen führen zu dem Schluss, dass die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten basierend auf den Daten von Dannenberg über einen weiten Temperaturbereich eine gute Grundlage bilden.

Fazit

Die Teilung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für die Denaturierungskinetik von β -Lactoglobulin A und B in zwei Bereiche ist plausibel. Der bei 90°C liegende Übergangspunkt ist durch etliche Arbeiten hinreichend nachgewiesen und kann als gültig angesehen werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten basierend auf den Daten von Dannenberg über einen weiten Temperaturbereich bildet eine gute Grundlage für Berechnungen.

5.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik

Die Konzentration der Proteine kann sich auf die Kinetik bzw. auf deren Parameter auf 2 verschiedenen Arten auswirken. Einerseits hängt je nach gewählter Beschreibung der Kinetik die Geschwindigkeitskonstante k_{app} von der Startkonzentration ab, andererseits können sich deutlich unterschiedliche Startkonzentrationen möglicherweise auf den Reaktionsmechanismus auswirken und damit zu unterschiedlichen Parameterwerten auch für k führen.

Auswirkung von kleineren Änderungen der Startkonzentration

Als kleinere Änderungen der Startkonzentration werden hier solche definiert, die sich aus der natürlichen Zusammensetzung der Milch ergeben.

Identifizierte Parameter einer Gleichung gelten streng genommen nur für den Bereich, für den die zugrunde gelegten Daten vermessen wurden. Liegt nun formal die Beschreibung der Kinetik in der Form nach Gleichung (Gl.4-7) vor

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n-1) \cdot k_n \cdot (c_0)^{(n-1)} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}} \text{ für } n \neq 1$$

so ist auch in einem Konzentrationsbereich für c_0 die Bestimmung eines Wertes für k möglich. Voraussetzung ist natürlich die gleiche Reaktionsordnung n .

Der oft verwendete Ansatz nach Gleichung (Gl.4-9)

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n-1) \cdot k_{app} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}} \text{ für } n \neq 1$$

mit $k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{(n-1)}$ führt jedoch dazu, dass bei unterschiedlichen Startkonzentrationen auch unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten k_{app} als Ergebnis vorliegen. Diese lassen sich bei Kenntnis der Startkonzentration c_0 in einander umrechnen. Sind die Startkonzentrationen jedoch unbekannt, so ist ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten untereinander nicht sinnvoll möglich. Abhilfe könnte eine Abschätzung der unterschiedlichen Konzentration bzw. deren relative Unterschiede bezogen auf eine Referenzkonzentration schaffen. Dann ist eine Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} nach Gleichung (Gl.4-10) möglich.

Auswirkung von größeren Änderungen der Startkonzentration

Als größere Änderungen der Startkonzentrationen werden im Rahmen dieser Arbeit solche bezeichnet, die deutlich voneinander abweichen, also nicht auf der natürlichen Zusammensetzung

von Milch beruhen. Dies ist in der Praxis bei der Eindampfung von Milch von Bedeutung. Hier ist die Milch größeren Verweilzeiten ausgesetzt als bei der Sterilisation. Während bei der Sterilisation das Volumen konstant bleibt, erfährt die Milch bei der Eindampfung eine Volumenreduktion der Flüssigphase durch Abdampfung von Wasser. Damit verbunden ist die Aufkonzentrierung der sonstigen Milchinhaltsstoffe und damit auch der Molkenproteine in deutlichem Maße.

Die nachfolgenden Aussagen beziehen sich auf die Formulierung $k_n \cdot c_0^{n-1}$ bzw. auf eine Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} nach Gleichung (Gl.4-10).

Kessler (Kessler, et al., 1991) untersucht den Einfluss der Proteinkonzentration an β -Lactoglobulin B bis zu einer Verdreifachung des ursprünglichen Wertes in Magermilch. Dabei stellt er weder Auswirkungen auf die Reaktionsordnung noch auf die temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstante fest (Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten nach Gleichung (Gl.4-10)). Ebenso ändert sich die Aktivierungsenergie für den Arrheniusansatz praktisch nicht. Die Ergebnisse zu Auswirkungen von höheren Proteinkonzentration (isoliertes β -Lactoglobulin in Lösung) zeigen, dass sich hier zwar die Reaktionsordnung unterhalb von 90°C auf 2 erhöht, wogegen dies bei Temperaturen darüber bei 1,5 bleibt. Die Aktivierungsenergien ändern sich jedoch nicht mit der Konzentration (bei steigender Konzentration oberhalb der Normalkonzentration in Milch) (Kessler, et al., 1991).

Anema (Anema, et al., 1996) vergleicht die Auswirkungen von Proteinkonzentrationen bei abnehmender Startkonzentration in Vollmilch, hergestellt aus Vollmilchpulver. Für β -Lactoglobulin A und B sind die Auswirkungen kaum merkbar, lediglich bei sehr niedrigen Startkonzentrationen (ca. 20% des Bezugswertes) nehmen die k-Werte leicht zu (Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten nach Gleichung (Gl.4-10)).

Die Arbeit von Law (Law, et al., 1997) (Magermilch mit aufkonzentrierten Proteinen) untersucht unterschiedliche Konzentrationen bei einer Temperatur von 80°C. Die Ergebnisse zeigen einen leichten Abfall der Geschwindigkeitskonstanten mit abnehmender Proteinkonzentration. Die Werte für steigende Konzentrationen dagegen lassen sich gut mit einer Umrechnung nach Gleichung (Gl.4-10) nachbilden. Tabelle Tab. 5-6 zeigt den Vergleich gemessener und berechneter Werte für k_{app} , basierend auf dem 100%-Wert. Die Umrechnung erfolgt entsprechend (Gl.4-10) zu

$$k_{appX\%} = k_{app100\%} \left(\frac{X\%}{100\%} \right)^{(0,5)}$$

Proteine	k_{app} [1/s] gemessen	k_{app} [1/s] gerechnet auf Basis 100%	
25%	0,59	1,03	+ 74,9%
50%	0,65	1,46	+124,6%
75%	1,03	1,78	+72,8%
100%	2,06		
125%	2,24	2,30	+2,7%
150%	2,56	2,52	-1,6%
200%	3,61	2,95	-18,3%

Tab. 5-6 Vergleich gemessener und berechneter Werte für k_{app} für β -Lactoglobulin bei 80°C in Magermilch (verdünnt mit UF Permeat bzw. aufkonzentriert mittels UF) (Messwerte aus (Law, et al., 1997))

Im Verdünnungsbereich (<100%) nehmen die Messwerte deutlich stärker ab als die berechneten. Im Aufkonzentrierungsbereich (>100%) passen die berechneten Werte relativ gut zu den gemessenen. Das bedeutet, auch Law findet im Bereich steigender Konzentrationen keine starke Abhängigkeit der tatsächlichen Geschwindigkeitskonstanten für $k_n \cdot (c_0)^{(n-1)}$.

Dannenberg (Dannenberg, 1986) zeigt, dass erst ab Reaktionsumsätzen > 80-90% eine sinnvolle Identifikation der Kinetikparameter möglich ist. Aus der Arbeit von Anema (Anema, 2000) (Magermilch aus Magermilchpulver) sind daher lediglich die Ergebnisse bei Temperaturen oberhalb von 90°C sinnvoll verwertbar. Diese zeigen, wie die vorgenannten Arbeiten, nur eine geringe Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Konzentration im steigenden Konzentrationsbereich. Die Versuche bei niedrigeren Temperaturen wurden deutlich vor einem Umsatz von 80-90% abgebrochen, sie finden daher keine Berücksichtigung bei der Beurteilung des Einflusses auf die Geschwindigkeitskonstante.

Bei Dissanayake (Dissanayake, et al., 2013) (Milchretentat aus Membranaufbereitung mit hohen Konzentrationen an Proteinen von 10 bis 25 Gew.% und damit deutlich höher als in Milch) ist keine eindeutige Abhängigkeit zu finden. So steigt die Geschwindigkeitskonstante zunächst mit steigender Proteinkonzentration an um danach wieder abzufallen. Dissanayake legt im Vergleich zu den obigen Arbeiten allerdings eine Reaktionsordnung von 1 zugrunde und untersucht bei einem pH-Wert von 6, der bereits deutlich von dem obiger Arbeiten abweicht (ca. 6,7 bei normaler Milch). Des Weiteren liegt den Versuchen lediglich eine Temperatur von 140°C zugrunde bei hohen Proteinkonzentrationen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf normale Milch bzw. ein Vergleich mit obigen Arbeiten erscheint daher nicht sinnvoll.

Wolz (Wolz, et al., 2015) analysiert ebenfalls den Einfluss steigender Proteinkonzentration, allerdings an Proteinlösungen in Wasser bei höheren Konzentrationen. Während die Reaktionsordnung unverändert bei 1,5 bleibt, finden sich jedoch steigende Geschwindigkeitskonstanten (für die Formulierung $k_n \cdot c_0^{n-1}$). Dies steht im Widerspruch zu den Aussagen von Kessler (Kessler, et al., 1991), der ähnliche Versuche durchgeführt hat.

Fazit

Steigende Konzentrationen, wie sie z.B. bei der Eindampfung von Milch vorkommen, haben einen geringen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierungskinetik von β -Lactoglobulin. Somit kann mit guter Näherung eine Berechnung mit den Ansätzen und Parametern von normaler Milch erfolgen, auch beispielsweise bei der thermischen Behandlung von Konzentraten aus Membrananlagen.

5.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik

Milch weist je nach Produkt einen etwas unterschiedlichen pH-Wert auf. So findet sich ein Wert von 6,7 bei Milch (Vollmilch, Magermilch), bei Süßmolke liegt er bei etwa 6,1 bis 6,6 und für Sauermilch zwischen 4 und 5. Der interessante pH-Bereich für die Denaturierung der Molkenproteine in Milch liegt somit bei $4 < \text{pH} < 7$.

Law untersucht den Einfluss des pH-Wertes auf die Denaturierungskinetik von β -Lactoglobulin in Magermilch (Law, et al., 2000). Dabei variiert der pH-Wert von 5,2 bis 8,8 bei einer Temperatur von 80°C. Für den interessierenden Bereich bis $\text{pH}=7$ zeigen sich nur kleine Auswirkungen auf die Reaktionsordnung (vgl. Abbildung 5-7). Unter Vernachlässigung der beiden Ausreisserwerte von 1,8 ergibt sich ein Mittelwert für die Reaktionsordnung von 1,6. Wie in Kapitel 5.1.1 bereits gezeigt, bedeutet dies lediglich eine geringe Abweichung vom sonst zu findenden Wert von 1,5. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsordnung ist damit für praktische Belange im pH-Bereich von 5,2 bis 7 vernachlässigbar.

Oberhalb von $\text{pH} 7$ steigt die Reaktionsordnung jedoch deutlich an.

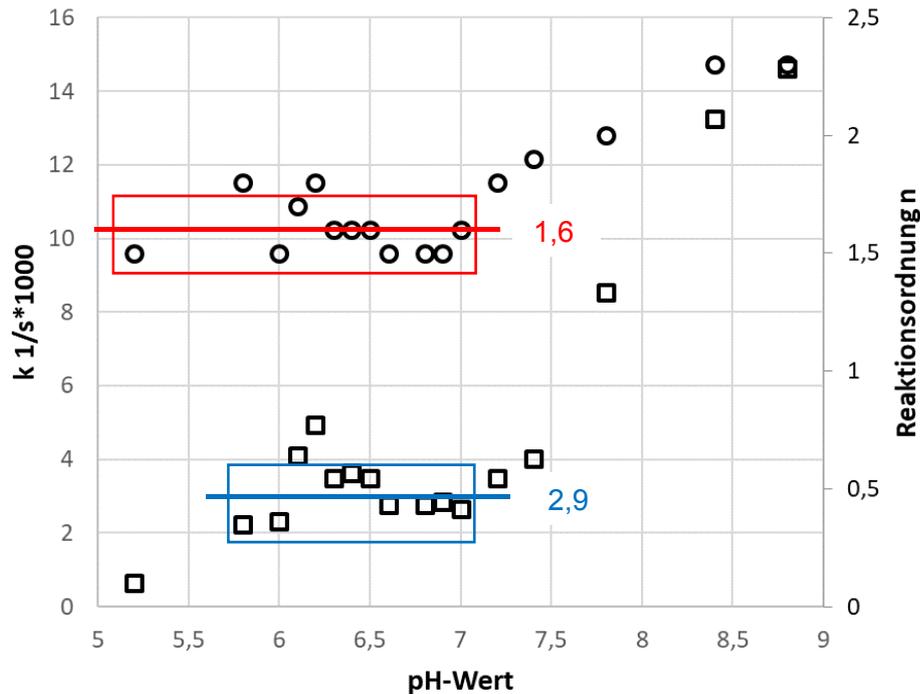


Abbildung 5-3 pH-Abhängigkeit der Reaktionsordnung ○ und der Geschwindigkeitskonstanten □ für β -Lactoglobulin in Magermilch bei 80°C (Law, et al., 2000)

Ähnliches findet sich für die Geschwindigkeitskonstante im Bereich von $5,8 < \text{pH} < 7$. Unter Vernachlässigung der beiden nicht ins Bild passenden Werte über 4 ergibt sich ein Mittelwert von $k = 2,9 [1/\text{s} \cdot 1000]$. Dieser Wert liegt nahe bei den von Dannenberg ermittelten Werten (Dannenberg, 1986). Das bedeutet nach (Law, et al., 2000) kann in diesem Bereich von einer nicht durch den pH-Wert beeinflussten Geschwindigkeitskonstante ausgegangen werden. Oberhalb von pH 7 steigt die Geschwindigkeitskonstante deutlich an (vgl. Abbildung 5-3).

Untersuchungen in einem größeren pH-Bereich finden sich bei Tolkach (Tolkach, et al., 2005). Allerdings ist das Untersuchungsmedium eine Lösung aus isoliertem β -Lactoglobulin mit einer Konzentration von 3,5 g/l, dies entspricht der Konzentration in Milch. Der pH-Wert variiert von 2 bis 8 bei Temperaturen von 80°C und 110°C. Bei 80°C dominiert die Kinetik der Auffaltung des Proteins als geschwindigkeitsbestimmender Schritt, bei 110°C überwiegt die Kinetik der Aggregation. Als Reaktionsordnung kommt jeweils ein Wert von 1,5 zur Anwendung.

Die Ergebnisse unterscheiden sich von denen von Law. So zeigt sich ein deutlicher Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeitskonstante. Zwischen pH 4 und 8 bei einer Temperatur von 80°C zeigt sich ein deutlicher linearer Anstieg. Für pH-Werte zwischen 2 und 4 kann für praktische Belange ein konstanter k -Wert Verwendung finden (vgl.

Abbildung 5-4).

Bei 110°C zeigt sich ein deutlich anderes Bild. Hier liegt für pH-Werte zwischen 5,5 und 8 keine nennenswerte Abhängigkeit für die Geschwindigkeitskonstante vor. Bei pH=4,5 weist sie jedoch einen deutlichen Anstieg auf. Dieser pH-Wert liegt sehr nahe am isoelektrischen Punkt von β -Lactoglobulin (im Bereich 4,6 (Harwalkar, et al., 1985)). Hier liegen die aufgefalteten Proteine ungeladen vor. Dadurch gibt es keine durch Ladung erzeugte Abstoßungskräfte welche zu einer Behinderung der Aggregation führen könnten, die Reaktionsgeschwindigkeit der Aggregation steigt somit an. Unterhalb von pH 4,5 verschwindet dieser Effekt wieder. Eine deutliche Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante in der Nähe des isoelektrischen Punktes findet auch Leeb (Leeb, et al., 2018).

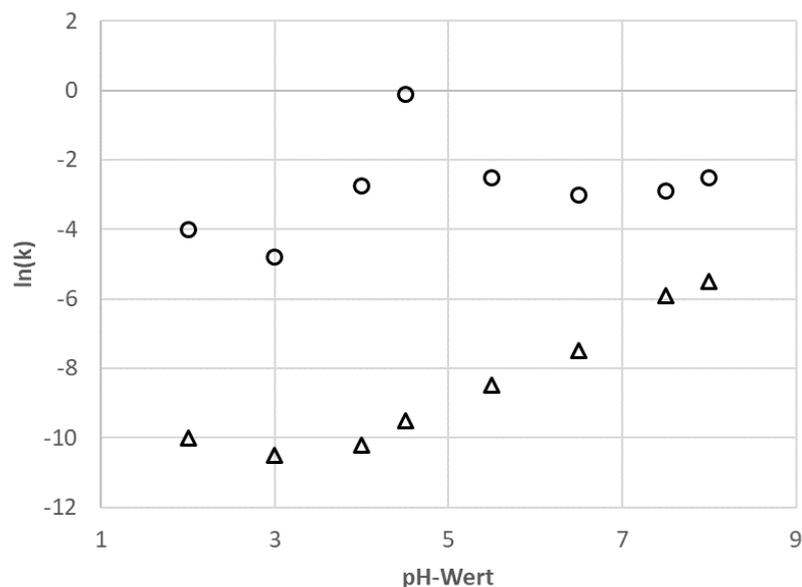


Abbildung 5-4 Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeitskonstante von β -Lactoglobulin bei ○ 110°C und △ 80°C (Tolkach, et al., 2005)

Aus Abbildung 5-5 ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten ersichtlich. Eindeutig zu sehen ist, dass der Knickpunkt der Kurven (Übergang von Auffaltung zu Aggregation als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt) sich mit steigendem pH-Wert zu niedrigeren Temperaturen hin verschiebt. Herausstechend ist der Verlauf bei pH 4,5 hier zeigen sich im oberen Temperaturbereich deutlich höhere k -Werte im Vergleich zu den andere pH-Werten. Ebenso fallen die deutlich anderen Steigungen der Teilbereiche im Vergleich zu denen anderer pH-Werte auf. Das unterstreicht das außergewöhnliche Verhalten bei pH 4,5.

Im unteren Temperaturbereich ist ein kontinuierlicher Anstieg der Werte für die Geschwindigkeitskonstante mit Anstieg des pH-Wertes zu verzeichnen. Dies belegt die Ergebnisse von 80°C auch für andere Temperaturen im unteren Bereich (vgl. Abbildung 5-4).

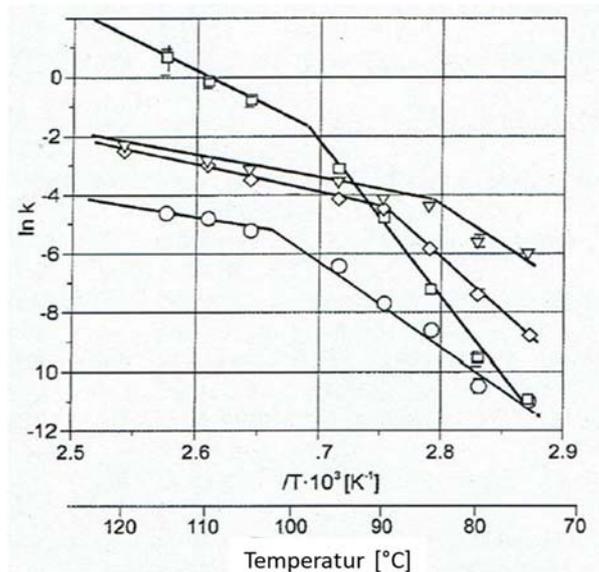


Abbildung 5-5 Einfluss des pH-Wertes auf die Temperaturabhängigkeit der Kinetik der β -Lactoglobulin-Denaturierung (o pH3 □ pH4,5 ◇ pH6,5 ▽ pH8) (Tolkach, et al., 2005)

Dissanayake (Dissanayake, et al., 2013) untersucht den pH-Einfluss in hohen Proteinkonzentrationen bei pH-Werten von 4, 5 und 6 bei 140°C. Hierbei ist ein Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten mit steigendem pH-Wert zu verzeichnen. Bei pH 5 zeigt sich eine Verdreifachung, allerdings nur bei einer Konzentration von 10Gew% Proteinen. Bei höheren Proteingehalten ist dies nicht zu finden. Dissanayake erklärt den starken Anstieg ebenfalls mit der Nähe zum isoelektrischen Punkt und führt die deutlich geringeren k-Werte bei höheren Konzentrationen auf die Bildung von Oligomeren zurück. Für die Auswirkungen auf die Kinetik lässt diese Arbeit allerdings keine eindeutigen Schlüsse zu. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Fazit

Aus den leider zahlreich nicht sehr umfangreichen Arbeiten lassen sich eher Vermutungen als Schlüsse ziehen.

Tolkach (Tolkach, et al., 2005) zeigt bei einer Temperatur von 110°C, dass die Geschwindigkeitskonstante in einem Bereich von $5,5 < \text{pH} < 8$ praktisch nicht vom pH-Wert abhängt (Aggregation ist hier maßgeblich für die Reaktionsgeschwindigkeit). Bei einer Temperatur von 80°C ist jedoch eine deutliche Abhängigkeit zu sehen, hier steigt der k-Wert mit dem pH-Wert an.

Diese Untersuchungen fanden jedoch in einer wässrigen Proteinlösung statt.

Law (Law, et al., 2000) untersucht dies in Magermilch, allerdings nur bei 80°C. Er findet keine Abhängigkeit des k-Wertes vom pH-Wert im Bereich von $5,8 < \text{pH} < 7$, ebenso kann hier die Reaktionsordnung als konstant angesehen werden. Es scheint, als ob die sonstigen

Komponenten in der Milch im Vergleich zu reiner β -Lactoglobulin Lösung eine kompensierende Wirkung besitzen.

Im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten als Folge eines variierenden pH-Wertes kann keine klare Aussage getroffen werden. Hierzu sind keine ausreichenden Untersuchungen vorhanden.

5.2 Denaturierungskinetiken von α -Lactalbumin

α -Lactalbumin stellt mit ca. 20%, nach β -Lactoglobulin mit 50%, die zweitgrößte Fraktion der Molkenproteine dar und ist damit ebenfalls ein wichtiger Baustein bei der Beurteilung von Proteinschädigungen.

In diesem Kapitel erfolgt die Auswertung von Arbeiten zur thermischen Denaturierung von α -Lactalbumin mit Blick auf die Reaktionsordnung sowie eine Analyse zur Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik, ebenso die Auswirkung variierender pH-Werte auf die Kinetik der Denaturierung.

Im Vergleich zu β -Lactoglobulin finden sich lediglich Arbeiten, die sich mit α -Lactalbumin in Milch oder auf Milchpulver basierend beschäftigen. Isoliertes α -Lactalbumin wurde nicht untersucht.

5.2.1 Analysen zur Reaktionsordnung

Bis auf eine Veröffentlichung weisen alle Untersuchungen eine Reaktionsordnung von $n = 1$ über alle untersuchten Temperaturbereiche auf (70 bis 150°C, vgl. Tabelle Tab. 5-1 und Tab. 5-2). Lediglich (Oldfield, et al., 1998) identifiziert Reaktionsordnungen von 0,9 zwischen 70 und 80°C sowie 1,1 zwischen 85 und 130°C.

Abbildung 5-6 zeigt den Vergleich einer Kinetik mit Reaktionsordnung 1 und einer mit Reaktionsordnung von 0,9 bzw. 1,1 bis zu einem Denaturierungsgrad von 80%. Die Basisurve ist die Denaturierung von α -Lactalbumin 80°C (Dannenber, et al., 1988a): Parameter k [1/s] berechnet über den Arrhenius-Ansatz nach Gleichung (Gl.4-15) mit einer Aktivierungsenergie von $E_A = 268560$ [J/mol] und einem Frequenzfaktor $\ln(k_0) = 84,92$, bei einer Reaktionsordnung von $n = 1$). Für die Vergleichskurven mit $n = 0,9$ und 1,1 erfolgte eine numerische Optimierung der Geschwindigkeitskonstanten k gegen die Kurve mit Daten von Dannenberg. Ein Vergleich der Kurvenwerte für $n = 0,9$ mit $k = 1,38 \cdot 10^{-3}$, im Vergleich zu $n = 1$ mit $k = 1,43 \cdot 10^{-3}$ ergibt eine Abweichung von maximal +0,8%/ -0,5%. Die Abweichungen bei einer Reaktionsordnung von $n = 1,1$ liegen bei einem optimierten k -Wert von $1,49 \cdot 10^{-3}$ bei +1,1%/ -1,5%.

Damit sind geringe Abweichungen in der Reaktionsordnung wie Oldfield sie findet (Oldfield, et al., 1998) für praktische Anwendungen nicht ausschlaggebend.

Das bedeutet, dass eine konstante Reaktionsordnung von $n = 1$ für praktische Berechnungen ausreichend ist um die Kinetik der Denaturierung von β -Lactoglobulin zu beschreiben.

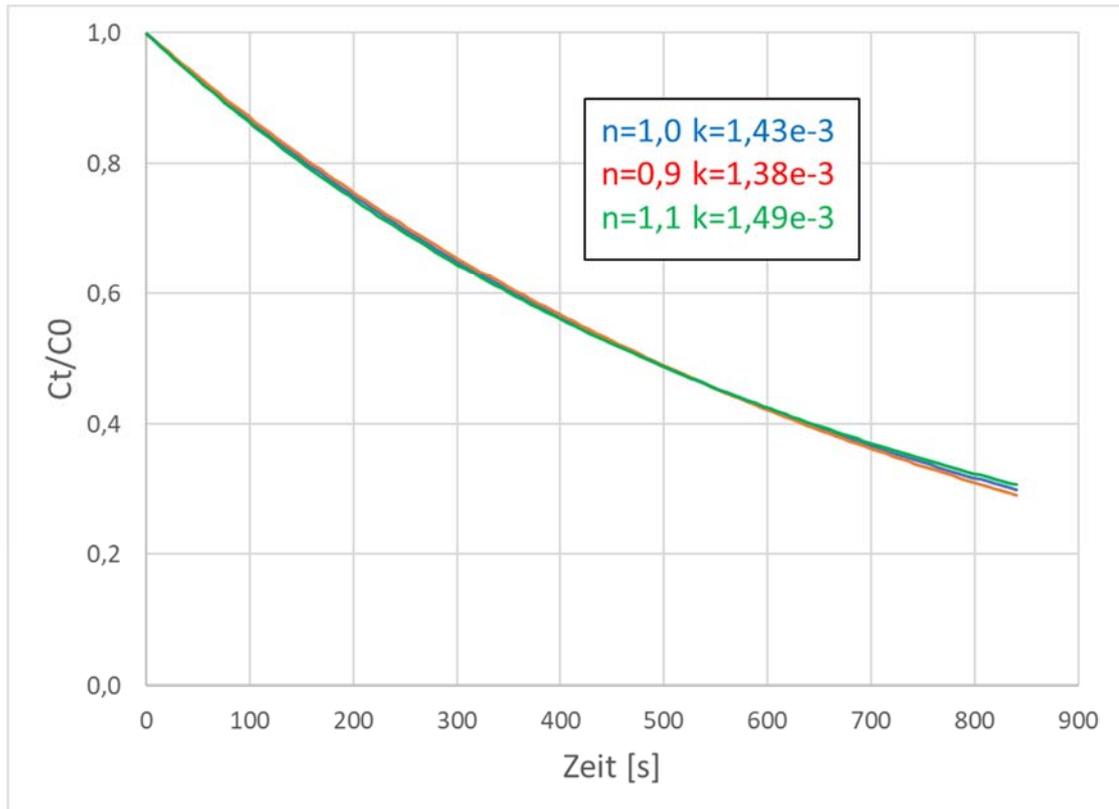


Abbildung 5-6 Zeitverlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch bei 80°C mit Kinetiken unterschiedlicher Reaktionsordnung (Dannenber 1988 $n=1$; $n=0,9$ mit angepasstem k ; $n=1,1$ mit angepasstem k)

Der zeitliche Verlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin berechnet sich damit nach Gleichung (Gl.4-6) zu

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t} \text{ für } n=1$$

mit einer von der Startkonzentration unabhängigen Geschwindigkeitskonstanten.

Dies ermöglicht den direkten Vergleich von in verschiedenen Arbeiten identifizierten Kinetikparametern.

Fazit

Die Denaturierungskinetik von α -Lactalbumin in Milch lässt sich durch eine Reaktion erster Ordnung in einem weiten Temperaturbereich von 70 bis 150°C sehr gut beschreiben.

5.2.2 Temperaturabhängigkeit der Kinetik

Wie bereits für die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für β -Lactoglobulin findet auch für die Kinetik der Denaturierung von α -Lactalbumin der Arrheniusansatz nach Gleichung (Gl.4-15) Verwendung. In Analogie zu β -Lactoglobulin ist auch hier kein einheitlicher Parametersatz über den gesamten Temperaturbereich zu finden.

Temperaturbereiche

Auch für α -Lactalbumin lässt sich die Temperaturabhängigkeit in zwei Bereiche aufteilen. Zugrunde gelegt ist hier ebenfalls die Formulierung des Arrheniusansatzes nach Gleichung (Gl.5-7)

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Abbildung 5-7 zeigt den temperaturabhängigen Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten k von α -Lactalbumin, basierend auf den Daten von Dannenberg (Dannenberg, 1986). Zur einfacheren Lesbarkeit sind die Werte der Abszisse mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Auffallend sind auch hier zwei Temperaturbereiche, in denen sich die Steigung deutlich unterscheidet. Die Temperatur am „Knickpunkt“ liegt im Vergleich zu β -Lactoglobulin mit 80°C niedriger. Auch andere Veröffentlichungen zeigen diesen Knick in der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten.

Für α -Lactalbumin kann nach Dannenberg (Dannenberg, et al., 1988a) die gleiche Begründung wie für β -Lactoglobulin herangezogen werden. Bis zu einer Temperatur von etwa 80°C ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Denaturierung. Oberhalb von 80°C ist die Aggregation der zeitbestimmende Schritt, der andere Parameterwerte benötigt als die reine Denaturierung. Ein Vergleich der Aktivierungsenthalpien und -entropien weist im Vergleich zu β -Lactoglobulin Parallelen auf. Oberhalb von 80°C liegen Aktivierungsenthalpien in einer Größenordnung vor, die eher einer chemischen Reaktion entsprechen, während sie unterhalb von 80°C etwa vier Mal so große Werte annehmen. Die Aktivierungsentropien zeigen unterhalb von 80°C positive Werte, d.h. die Entropie nimmt zu. Dies lässt sich als die Auffaltung der Proteine und

damit mit einer „Zunahme an Unordnung“ interpretieren. Über 80°C ist die Aktivierungsentropie negativ, wodurch eine „Abnahme der Unordnung“ erfolgt. Dies wiederum ist mit der Aggregation der Proteine interpretierbar.

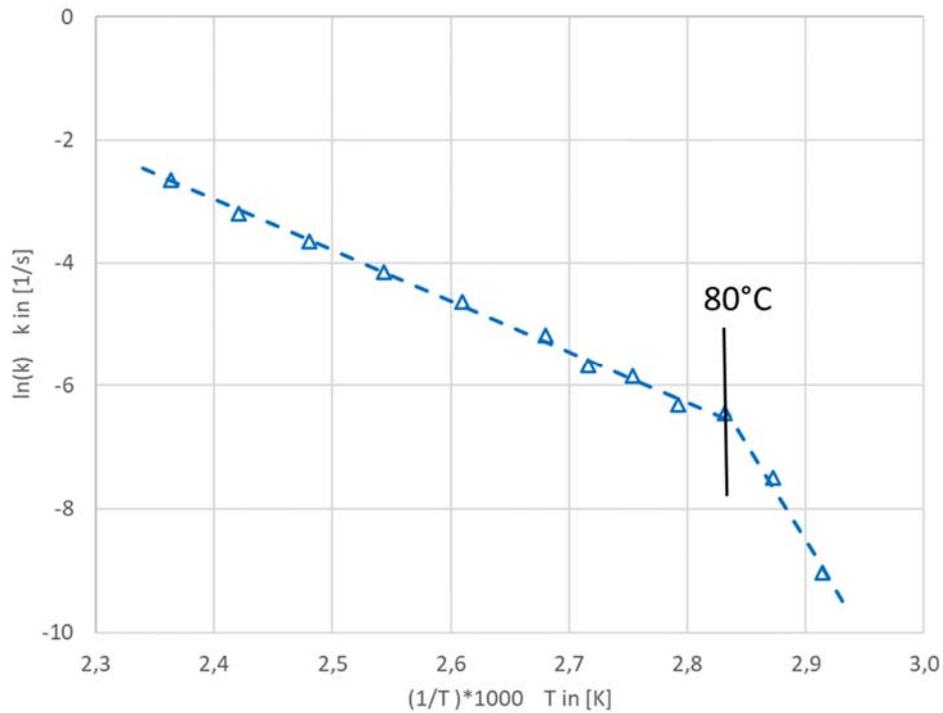


Abbildung 5-7 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k für die Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch nach Arrhenius (k in $(1/s)$) (Dannenberg, 1986)

Tab. 5-7 zeigt den Punkt des Steigungswechsels für die Geschwindigkeitskonstante $k(1/T)$ aus verschiedenen Arbeiten.

(Dannenberg, et al., 1988a)	80°C	Magermilch
(Anema, et al., 1996)	80°C	Vollmilch aus Milchpulver
(Anema, 2001)	80°C	Magermilch aus Milchpulver
(Anema, et al., 2006)	80°C	Magermilch aus Milchpulver
(Oldfield, et al., 1998)	80°C	Magermilch
(Manji, et al., 1986)	90°C	Magermilch
(Plock, et al., 1997)	80°C	Süßmolke aus Eindampfanlage

Tab. 5-7 Steigungswechsel der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstante für α -Lactalbumin

Mit einer Ausnahme zeigt sich der Wechsellpunkt bei 80°C. Manji (Manji, et al., 1986) identifiziert für die Kinetiken von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin dieselben Werte wie Lyster (Lyster, 1970), die sich in weiten Teilen in späteren Arbeiten anderer Autoren nicht mehr finden lassen. Daher kann die Wechseltemperatur bei 90°C nicht als repräsentativ gelten. Lyster untersucht zwar auch das Denaturierungsverhalten von α -Lactalbumin, allerdings nur oberhalb von 90°C und damit lediglich den durch Aggregation dominierten Temperaturbereich.

Damit kann zumindest für Magermilch ein zweiteiliger Temperaturbereich für die Geschwindigkeitskonstante mit einer Trennung bei 80°C als gesichert angesehen werden.

Temperaturabhängigkeit

Die Reaktionsordnung für α -Lactalbumin liegt nach den Analysen in Kapitel 0 bei $n = 1$.

Der zeitliche Verlauf von c_t/c_0 berechnet sich nach Gleichung (Gl.4-6) zu

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t} \text{ für } n=1$$

Der Vorteil gegenüber einer Reaktionsordnung $n \neq 1$ liegt darin, dass die Geschwindigkeitskonstante nicht von der Anfangskonzentration abhängt. Die Parameter für den Arrheniusansatz der Temperaturabhängigkeit sind bei gleicher Formulierung des Ansatzes direkt miteinander vergleichbar.

		ln(k0)[1/s]		Abweichung		EA [kJ/mol]		Abweichung	
		<=80°C	>80°C			<=80°C	>80°C		
Dannenberg 1986	Magermilch	84,92	16,95			269	69		
Lyster 1970	Magermilch		16,46		-2,9%		69		0,0%
Anema 1996	Vollmilch aus Pulver	60,2	13,46	-29,1%	-20,6%	195,1	57,51	-27,3%	-16,7%
Oldfield 1998	Magermilch n=0,9 bzw. 1,1	62,6	11,9	-26,3%	-29,8%	203,3	52,9	-24,3%	-23,3%
Anema 2001	Magermilch aus Pulver	56,7	28	-33,2%	65,2%	186,5	102,1	-30,6%	47,9%
Anema 2006	Magermilch aus Pulver	56,3	20,9	-33,7%	23,3%	185	81	-31,1%	17,4%
Plock 1997	Süßmolke aus Eindampfanlage	123,9	23,1	45,9%	36,3%	383	86	42,6%	24,6%

Tab. 5-8 Vergleich der Frequenzfaktoren und Aktivierungsenergien von Denaturierungskinetiken von α -Lactalbumin im Milch, Reaktionsordnung $n = 1$

Auffallend ist, dass Lyster und Dannenberg praktisch identische Werte sowohl für den Frequenzfaktor als auch für die Aktivierungsenergie im Temperaturbereich über 80°C messen. Im Vergleich zu den anderen Arbeiten weichen die Werte teilweise deutlich ab, vor allem bei den von Plock in Süßmolke ermittelten Parametern. Während die in Milch gemessenen Werte für

$\ln(k_0)$ und E_A im Vergleich zu Dannenberg alle niedriger liegen, weichen die Werte von Plock alle deutlich nach oben ab.

Weichen beide Werte im Vergleich zu Dannenberg (Dannenberg, 1986) nach unten ab, so bedeutet dies nicht, dass die Reaktionsgeschwindigkeit kleiner ist. Eine geringere Aktivierungsenergie vergrößert den temperaturabhängigen Teil $e^{\left(\frac{-E_A}{RT}\right)}$. Bei gleichzeitiger Verringerung des Frequenzfaktors k_0 führt dies zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit, wenn k_0 lediglich geringfügig kleiner gegenüber den Werten von Dannenberg liegt. Ist dagegen k_0 in stärkerem Maße verringert, so ergibt sich insgesamt eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit.

Abbildung 5-8 zeigt den zeitlichen Verlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin bei 80°C, gerechnet mit unterschiedlichen Parametern für den gleichen Kinetikansatz. Die Ergebnisse von Dannenberg (Dannenberg, 1986) liegen zwischen denen von Anema (Anema, et al., 1996) bzw. (Anema, et al., 2006). Vergleiche mit Zeitverläufen, basierend auf Ergebnissen anderer Untersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen, dass die von Dannenberg identifizierten Kinetiken meist dazwischen liegen.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Dannenberg praktisch identische Parameterwerte im oberen Temperaturbereich findet wie Lyster (Lyster, 1970), liegt der Schluss nahe, dass die von Dannenberg ermittelte Temperaturabhängigkeit der Kinetik für die thermische Denaturierung von α -Lactalbumin für die Praxis gut einsetzbar ist.

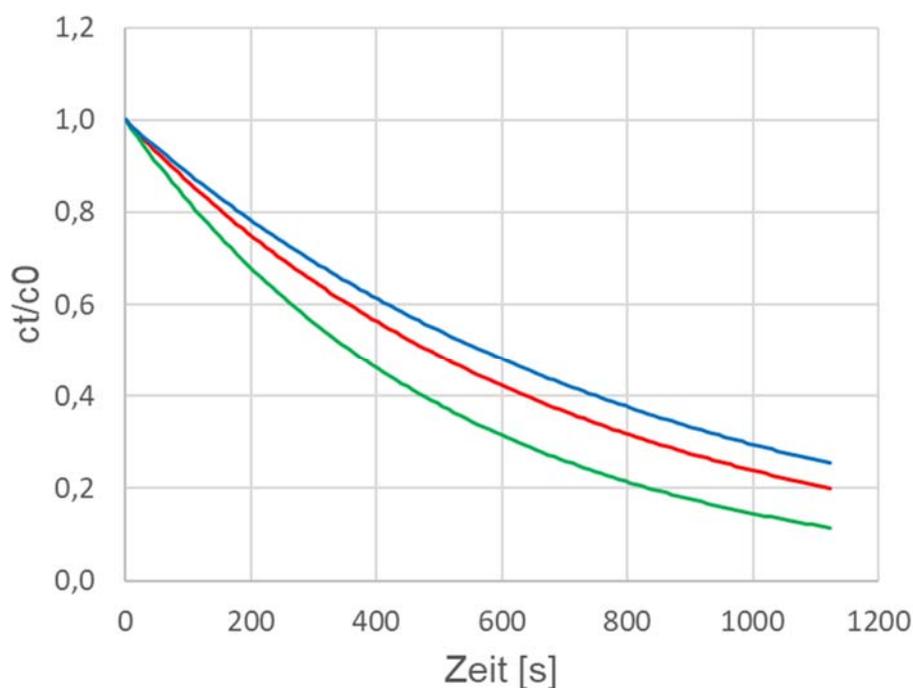


Abbildung 5-8 Zeitlicher Verlauf der Denaturierung von α -Lactalbumin in Magermilch bei 80°C, berechnet mit Kinetiken von (Dannenberg, 1986), (Anema, et al., 1996), (Anema, et al., 2006), Reaktionsordnung 1

Fazit

Die Geschwindigkeitskonstanten der temperaturabhängigen Kinetik von α -Lactalbumin weist einen, durch etliche Arbeiten nachgewiesenen, Knick bei 80°C auf. Dieser teilt die Kinetik in zwei plausible Temperaturbereiche. Die von Dannenberg ermittelte Kinetik (Dannenberg, 1986) bilden eine gute Grundlage für Berechnungen.

5.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik

Lediglich zwei Arbeiten haben den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Kinetik der thermischen Denaturierung von α -Lactalbumin zum Inhalt. Law (Law, et al., 1997) untersucht bei einer Temperatur von 80°C die Auswirkung unterschiedlicher Proteinkonzentration in Magermilch auf die Geschwindigkeitskonstante k .

Proteine	k [1/s]*1000 gemessen
50%	0,098
75%	0,439
100%	0,73
125%	0,78
150%	0,93
200%	1,37

Tab. 5-9 Werte für k für α -Lactalbumin bei 80°C in Magermilch (verdünnt mit UF Permeat bzw. aufkonzentriert mit Proteinkonzentrat, (Law, et al., 1997))

Tabelle Tab. 5-9 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten aus der Arbeit von Law (Law, et al., 1997). Bei einer Reaktionsordnung von $n = 1$ ergibt die Lösung der Differentialgleichung zur Beschreibung der thermischen Denaturierung im thermodynamisch geschlossenen System nach Gleichung (Gl.4-6)

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t}$$

das bedeutet, die Geschwindigkeitskonstante ist im Vergleich zu Reaktionen mit einer Reaktionsordnung von $n \neq 1$ formal nicht von der Konzentration abhängig. Die übliche Annahme geht davon aus, dass lediglich eine Temperaturabhängigkeit nach Arrhenius vorliegt. Dies ist hier offensichtlich nicht der Fall. Zu höheren Konzentrationen steigt die Geschwindigkeitskonstante an, in Richtung geringere Konzentration nimmt die Geschwindigkeitskonstante stark ab.

Eine mögliche Erklärung liegt in den Versuchsbedingungen. Die Aufkonzentrierung erfolgte bei Law mittels einer Ultrafiltrationsmembran, das Erzielen geringere Konzentrationen durch Verdünnen mit Permeat. Während sich die Proteinkonzentration auf der Retentatseite erhöht, bleiben die Konzentrationen von Salzen, Lactose usw. näherungsweise sowohl im Permeat als auch im Retentat konstant. Damit ändert sich das Verhältnis von Proteinen zu Salzen usw. zu höheren Werten. Im Gegenzug verringert sich das Verhältnis beim Verdünnen mit Permeat. Damit unterscheiden sich die Startbedingungen hinsichtlich der Verhältnisse der Komponenten. Eine schlüssige Erklärung der Auswirkungen auf die Geschwindigkeitskonstante konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Die Arbeit von Law (Law, et al., 1997) lässt daher keine belastbaren Schlussfolgerungen auf den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Kinetik der Denaturierung von α -Lactalbumin zu, zumal lediglich bei einer Temperatur gemessen wurde.

Die Untersuchungen von Anema (Anema, 2001) zeigen andere Ergebnisse. Anema variiert die Konzentration durch das Ansetzen von Magermilch aus Magermilchpulver. Die Konzentrationen variieren von 9,6% Trockensubstanz (entspricht Magermilch) bis zum vierfachen Wert. Die Konzentrationsverhältnisse aller Inhaltsstoffe bleiben damit für alle Versuche gleich.

Die Arbeiten wurden unter Laborbedingungen durchgeführt.

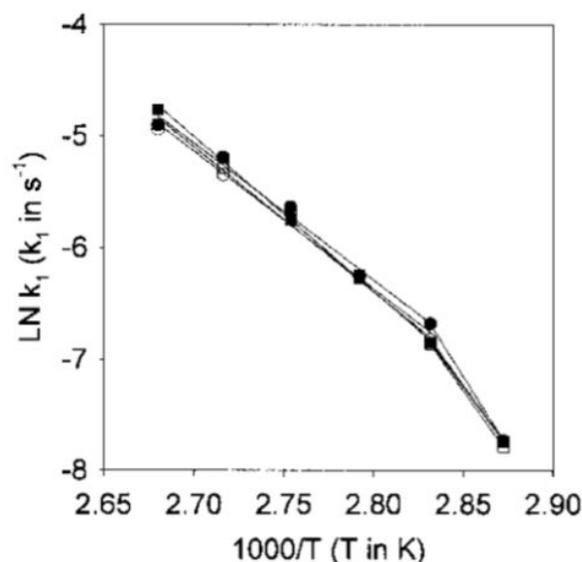


Abbildung 5-9 Arrhenius-Darstellung der α -Lactalbumin Denaturierung; ○ 9,6%TS, ● 19,2%TS, □ 28,8%TS, ■ 39,4%TS (Anema, 2001)

Abbildung 5-9 zeigt die Arrhenius-Darstellung der Untersuchungen von Anema (Anema, 2001). Offensichtlich unterscheiden sich die Geschwindigkeitskonstanten für die unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen nur sehr wenig. Unter Verwendung der Parameter von Anema über den Arrheniusansatz berechnete Geschwindigkeitskonstanten bei 80°C und 9,6%TS (\triangleq 100% bei Law) sowie 19,2%TS (\triangleq 200% bei Law) ergeben $1,092 \cdot 10^{-3}$ [1/s] (Law:

$0,73 \cdot 10^{-3}$ [1/s]) bzw. $1,206 \cdot 10^{-3}$ [1/s] (Law: $1,37 \cdot 10^{-3}$ [1/s]). Während Law bei der Verdopplung der Konzentration eine um 88% größere Geschwindigkeitskonstante bestimmt, unterscheiden sich die Werte von Anema gerade um 10%. Anema schlussfolgert, dass keine nennenswerte Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vorliegt.

Fazit

Da nur wenige Arbeiten zur Konzentrationsabhängigkeit der Denaturierung von α -Lactalbumin gefunden wurden, kann keine belastbare Schlussfolgerung gezogen werden. Während Law (Law, et al., 1997) eine deutliche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Proteinkonzentration ermittelt, findet Anema (Anema, 2001) das genaue Gegenteil, keine Abhängigkeit.

Da die grundlegenden Vorgänge bei der Denaturierung und Aggregation von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin einige Ähnlichkeiten aufweisen, liegt die unbestätigte Vermutung nahe, dass in Analogie zum Einfluss der Konzentrationen auf die Kinetik von β -Lactoglobulin auch hier lediglich geringe Abhängigkeiten vorliegen. Die Ergebnisse von Anema untermauern diese Annahme.

5.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik

Zum Thema der pH-Abhängigkeit der Denaturierungskinetik von α -Lactalbumin wurden keine Veröffentlichungen gefunden. Daher kann zu diesem Themenpunkt keine Aussage getroffen werden.

6 Modellierungsansatz der Eindampfung

Die Eindampfung von Milch führt unweigerlich zu thermisch bedingter Schädigung der Molkenproteine. Der Umfang der Schädigung hängt direkt mit der Eindampftemperatur und der Verweilzeit zusammen. Für die Eindampfung stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung. Einerseits kann die Eindampfung in einem Rührwerksverdampfer erfolgen, andererseits in einem Rohrbündelwärmeübertrager (Steigrohr- oder Fallfilmverdampfer). Das reaktionstechnische Verhalten eines Rührwerksverdampfers entspricht dem eines Rührkesselreaktors mit Brüdenabzug, das des Rohrbündelwärmeübertrager dem eines Rohrreaktors mit Brüdenabzug. Das Verweilzeitverhalten ist dabei deutlich unterschiedlich. Somit unterscheidet sich die Modellierung hier grundsätzlich.

Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der einfachen dynamischen Modellierung eines Rührwerkverdampfers als konzentriertes System. Auf die Erstellung eines detaillierteren Modells oder dem eines örtlich verteilten Systems für einen Rohrbündelwärmetauscher konnte im Rahmen der Arbeit nicht eingegangen werden.

6.1 Modellansatz für einen Rührwerksverdampfer

Ein Rührwerksverdampfer entspricht im Idealfall einem ideal durchmischten, beheizten Rührkesselreaktor. Abbildung 6-1 zeigt den einfachen Bilanzraum eines Rührwerksverdampfers als konzentriertes System.

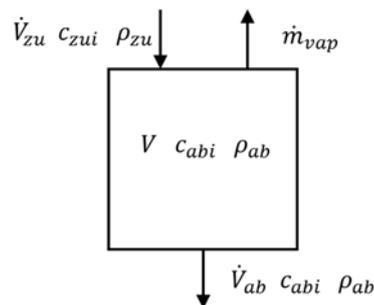


Abbildung 6-1 Bilanzraum für eine einfache modelltechnische Darstellung eines Rührwerksverdampfers für die Materiebilanzierung

Dabei ist

- $\dot{V}_{zu}, \dot{V}_{ab}$ [m^3/h] der flüssige Zu- bzw. Ablauf mit den Konzentrationen c_{zui}, c_i [g/l] sowie der Dichte ρ_{zu}, ρ_{ab} [kg/m^3]
- \dot{m}_{vap} [kg/h] der abgedampfte Mengenstrom an Wasser
- V [m^3] der Flüssiginhalt des Behälters

Die hierbei gemachten Annahmen und Vereinfachungen sind:

- ideale Durchmischung \rightarrow Eigenschaften des Ablaufes = Eigenschaften im Behälter
- Materieinhalt in der Brüdenphase ist deutlich kleiner als in der Flüssigphase \rightarrow Brüdenphase ist quasistationär, Bilanzierung der Flüssigphase ist ausreichend
- thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Flüssig- und Dampfphase
- automatische Temperaturhaltung der Flüssigphase
- der abgedampfte Brüden besteht nur aus Wasser
- direkte Vorgabe der abgedampften Brüdenmenge

Die Erstellung der dynamischen Gesamtmassenbilanz für die Flüssigphase ergibt

$$\frac{d(V \cdot \rho_{ab})}{dt} = \dot{V}_{zu} \cdot \rho_{zu} - \dot{V}_{ab} \cdot \rho_{ab} - \dot{m}_{vap} \quad (\text{Gl.6-1})$$

und damit

$$\frac{dV}{dt} \cdot \rho_{ab} + V \cdot \frac{d(\rho_{ab})}{dt} = \dot{V}_{zu} \cdot \rho_{zu} - \dot{V}_{ab} \cdot \rho_{ab} - \dot{m}_{vap} \quad (\text{Gl.6-2})$$

Madoumier (Madoumier, et al., 2015) berechnet die Dichte für unterschiedliche Ansätze und kommt zu dem Schluss, dass die Berechnungsgleichungen nach Choi (Choi, et al., 1986) gut geeignet sind um die Dichte auch bei hohen Trockensubstanzgehalten zu beschreiben (siehe Anhang). Für Magermilch rechnet sich damit z.B. bei 80°C eine Dichte von ca. 1050 kg/m³, mit Erreichen eines Trockensubstanzgehaltes von 50% ergibt sich ein Wert von ca. 1160 kg/m³. Dies entspricht einer Abweichung von etwa 10%. Für das hier aufgestellte einfache Modell wird diese Differenz vernachlässigt und die Dichte $\rho_{zu} = \rho_{ab} = \rho$ als konstant angenommen. Damit lautet die Gleichung zur Berechnung des dynamischen Flüssiginhaltes

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_{zu} - \dot{V}_{ab} - \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho} \quad (\text{Gl.6-3})$$

Unter der Annahme eines ideal automatisierten Füllstandes im kontinuierlichen Betrieb ist $V = const.$ Damit ergibt sich eine zusätzliche algebraische Gleichung zur Berechnung des flüssigen Ablaufstromes.

$$0 = \dot{V}_{zu} - \dot{V}_{ab} - \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho} \quad (\text{Gl.6-4})$$

Die dynamische Komponentenmengenbilanz für eine Komponente i lautet

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = \dot{V}_{zu} \cdot c_{zui} - \dot{V}_{ab} \cdot c_i - V \cdot \dot{r}_i \quad (\text{Gl.6-5})$$

mit der volumenspezifischen Reaktionsgeschwindigkeit \dot{r}_i für die bilanzierte Komponente i .

Aus Gleichung (Gl.6-5) wird

$$V \cdot \frac{dc_i}{dt} + \frac{dV}{dt} \cdot c_i = \dot{V}_{zu} \cdot c_{zui} - \dot{V}_{ab} \cdot c_i - V \cdot \dot{r}_i \quad (\text{Gl.6-6})$$

und mit Gleichung (Gl.6-3)

$$V \cdot \frac{dc_i}{dt} = \dot{V}_{zu} \cdot (c_{zui} - c_i) + \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho} \cdot c_i - V \cdot \dot{r}_i \quad (\text{Gl.6-7})$$

Der Gesamtumsatz U aller nc Komponenten über der Zeit, hier also die Summe der denaturierten Massen der betrachteten Molkenproteine, berechnet sich nach

$$\frac{dU}{dt} = V \cdot \sum_{i=1}^{nc} \dot{r}_i \quad (\text{Gl.6-8})$$

Auf die Energiebilanz kann unter obigen Annahmen bei diesem Modell verzichtet werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten (der Molkenproteine) liefern die entsprechenden Gleichungen aus Kapitel 5. Diese lassen sich direkt in die Gleichungen (Gl.6-7) und (Gl.6-8) einfügen oder als separate algebraische Gleichungen dem Gleichungssystem hinzufügen.

Das einfache Modell eines Rührwerksverdampfers besteht somit aus der dynamische Gleichung für den Flüssiginhalt sowie den dynamischen Komponentenmengenbilanzen der in der Milch enthaltenen Stoffe und die Differentialgleichung zur Berechnung des Gesamtproteinverlustes U . Für den Fall eines kontinuierlichen Betriebes mit konstantem Flüssigholdup ergänzt die stationäre Gesamtmassenbilanz das Gleichungssystem.

Die Modellgleichungen sind somit für nc Komponenten

Bilanz Flüssiginhalt	$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_{zu} - \dot{V}_{ab} - \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho}$	(Gl.6-9)
----------------------	--	----------

Komponentenbilanzen	$V \cdot \frac{dc_i}{dt} = \dot{V}_{zu} \cdot (c_{zui} - c_i) + \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho} \cdot c_i - V \cdot \dot{r}_i \quad (i = 1, \dots, nc)$	(Gl.6-10)
---------------------	--	-----------

Bilanz Gesamtproteinverlust	$\frac{dU}{dt} = V \cdot \sum_{i=1}^{nc} \dot{r}_i$	(Gl.6-11)
-----------------------------	---	-----------

zus. bei $V = const.$	$0 = \dot{V}_{zu} - \dot{V}_{ab} - \frac{\dot{m}_{vap}}{\rho}$	(Gl.6-12)
-----------------------	--	-----------

mit in den Gleichungen integrierten Beschreibungen der Kinetiken.

Als Vorgaben für das Modell werden benötigt:

- Zulaufstrom \dot{V}_{zu} sowie alle Zulaufkonzentrationen c_{zui}
- Abdampfbrüdenstrom \dot{m}_{vap}
- Dichte ρ

- Kinetik + Kinetikparameter (integriert in die Bilanzgleichungen)
- Startwerte für das Volumen V und die Anfangskonzentrationen c_i
- Reaktionstemperatur (für die Kinetik)

Modellvariationen

\dot{V}_{zu}	\dot{V}_{ab}	\dot{m}_{vap}	Betrieb
0	0	0	Batchsterilisation
0	0	> 0	Batcheindampfung
> 0	> 0	0	kontinuierliche Sterilisation
> 0	> 0	> 0	kontinuierliche-Eindampfung

6.2 Simulationsbeispiele

Für die folgenden Simulationsbeispiele wurden die Kinetiken von Dannenberg (Dannenberg, 1986) sowohl für β -Lactoglobulin A und B als auch für α -Lactalbumin verwendet. Durch Einsetzen der expliziten Kinetiken in die Differentialgleichungen ergibt sich ein Modell bestehend aus fünf Differentialgleichungen und einer algebraischen Gleichung.

Die Implementierung erfolgte in Microsoft® EXCEL unter Verwendung eines einfachen Integrationsverfahrens (Euler-Vorwärts).

Kinetik

Dannenberg berechnet seine Geschwindigkeitskonstante für β -Lactoglobulin in der Form $k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{0,5}$ (Reaktionsordnung $n = 1,5$), jeweils für die Proteinform A und B. Die Startkonzentrationen c_0 sind jedoch nicht angegeben. Daher wurde die folgende Annahme getroffen. Bei einer Gesamtkonzentration von β -Lactoglobulin A und B von 3,2 g/l liegt der Anteil von A bei etwa 60% (Durchschnittswerte aus (Ng-Kwai-Hang, et al., 1996)). Unter der Annahme, dass die Anfangskonzentrationen bei den Untersuchungen von Dannenberg in etwa dem entsprechen, ergeben sich die Startwerte für β -Lactoglobulin A von 1,9 g/l und für β -Lactoglobulin B von 1,3 g/l.

Für α -Lactalbumin ist keine Umrechnung erforderlich.

Tabelle Tab. 6-1 zeigt die Kinetikparameter nach Dannenberg für den Temperaturbereich bis 80°C.

		β-Lg A	β-Lg B	α-La
$\ln(k_0)$	$k_0 [1/s]$	84,16	89,43	84,92
E_A	$[kJ/mol]$	265210	279960	268560
c_0	$[g/l]$	1,9	1,3	1,2
Temperatur	$[°C]$	70-90	70-90	70-80

Tab. 6-1 Kinetikparameter nach (Dannenber, 1986)

Die volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit für β-Lactoglobulin A bzw. B ist damit bei einer Reaktionsordnung von $n = 1,5$

$$\dot{r} = \frac{e^{\ln(k_0)}}{(c_0)^{0,5}} \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \cdot c^{1,5} \quad (\text{Gl.6-13})$$

Die Kinetik für α-Lactalbumin mit einer Reaktionsordnung von $n = 1$ lautet

$$\dot{r} = e^{\ln(k_0)} \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \cdot c \quad (\text{Gl.6-14})$$

Beispiel 1:

- $\dot{V}_{zu} = \dot{V}_{ab} = 0 \text{ [m}^3/\text{h]}$, $\dot{m}_{vap} = 0 \text{ [kg/h]}$,
- $V = 1 \text{ [m}^3]$, Reaktortemperatur 80°C
- Startwerte: $c_{LgA} = 1,9 \text{ [g/l]}$, $c_{LgB} = 1,3 \text{ [g/l]}$, $c_{La} = 1,2 \text{ [g/l]}$
- $\rho = 1040 \text{ [kg/m}^3]$
- 1200 [s] , Integrationsschrittweite 4 [s]

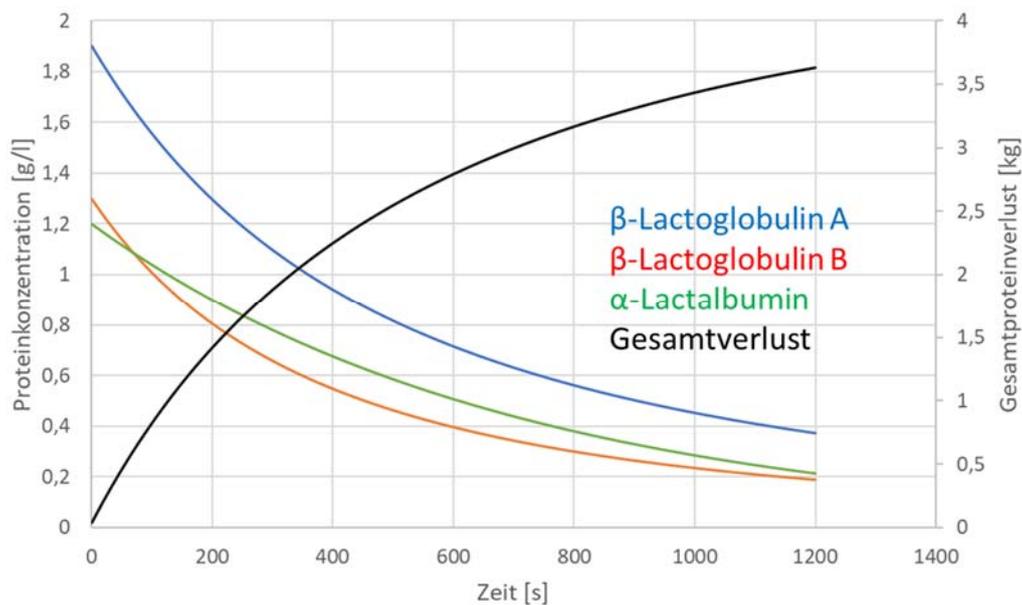


Abbildung 6-2 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 80°C , Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 1: Heißhaltung ohne Abdampfung im Batch-Betrieb

Dieser Vorgang entspricht einer Batchsterilisation mit sehr langer Haltezeit.

Hier zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der Konzentrationen. Durch die Denaturierung der Proteine kommt es zu einer Reduktion der Masse an nativen Proteinen. Da das Gesamtvolumen unverändert bleibt, verringern sich die Konzentrationen kontinuierlich.

Beispiel 2:

- $V = 1 [m^3]$, Reaktortemperatur $80^\circ C$
- $\dot{V}_{zu} = \dot{V}_{ab} = 0 [m^3/h]$, $\dot{m}_{vap} = 1560 [kg/h]$
- Startwerte: $c_{LgA} = 1,9 [g/l]$, $c_{LgB} = 1,3 [g/l]$, $c_{La} = 1,2 [g/l]$
- $\rho = 1040 [kg/m^3]$
- Simulationszeit 1200 [s], Integrationsschrittweite 4 [s]

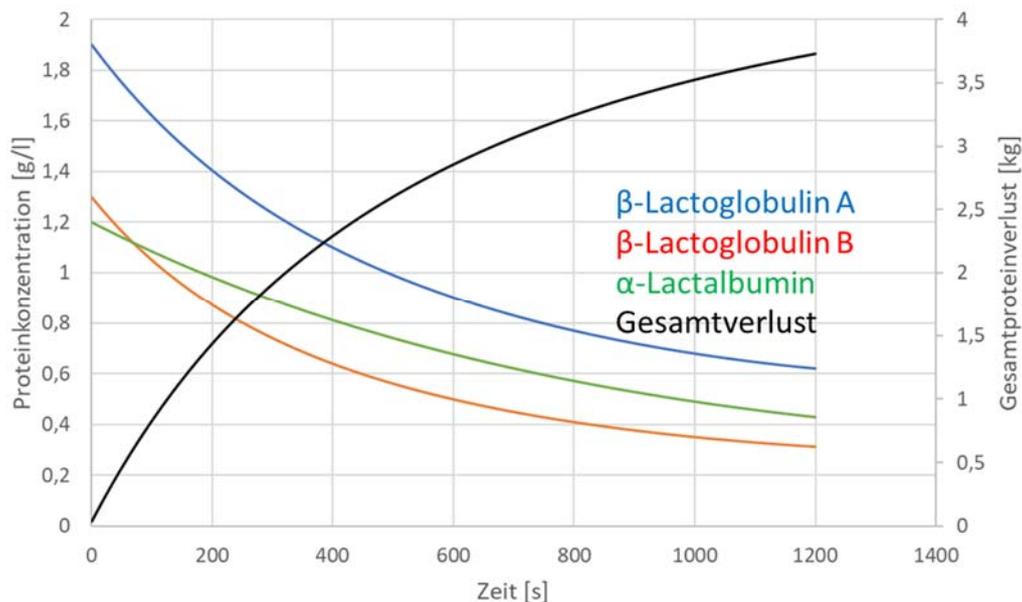


Abbildung 6-3 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei $80^\circ C$, Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 2: Eindampfung im Batchbetrieb

Dieses Simulationsbeispiel entspricht einer Batch-Eindampfung mit langer Haltezeit.

Die Bedingungen sind mit denen aus Beispiel 1 identisch, mit der Ausnahme, dass ein Abdampfstrom von 1560kg/h angesetzt wurde. Damit ergibt sich nach 1200 Sekunden Simulationszeit ein Restvolumen von $0,5 [m^3]$.

Die Abnahme der Konzentrationen über der Zeit ist im Vergleich zu Beispiel 1 geringer. Das Abdampfen bewirkt eine Verringerung des Volumens. Dies würde ohne Denaturierung zu einem Konzentrationsanstieg führen. Die Abnahme an nicht denaturierter Proteinmenge ist hier größer als die Konzentrationszunahmen durch die Volumenreduktion. Die Konzentrationen nimmt somit in Summe ab. Der Gesamtproteinverlust liegt bei etwa 3,81 kg. Bei einer Ausgangsmenge von 4,5 kg an Proteinen entspricht dies einem Denaturierungsgrad von 85%.

Beispiel 3:

- $\dot{V}_{zu} = \dot{V}_{ab} = 0 \text{ [m}^3/\text{h]}$, $\dot{m}_{vap} = 1560 \text{ [kg/h]}$
- $V = 1 \text{ [m}^3]$, Reaktortemperatur 70°C
- Startwerte: $c_{LgA} = 1,9 \text{ [g/l]}$, $c_{LgB} = 1,3 \text{ [g/l]}$, $c_{La} = 1,2 \text{ [g/l]}$
- $\rho = 1040 \text{ [kg/m}^3]$
- Simulationszeit 1200 [s] , Integrationschrittweite 4 [s]

Auch dieses Simulationsbeispiel entspricht einer Batch-Eindampfung mit langer Haltezeit.

Die Bedingungen sind mit denen aus Beispiel 2 identisch, mit dem Unterschied, dass eine Prozess Temperatur von $70 \text{ [}^\circ\text{C]}$ angesetzt wurde. Die Volumenverringerung nach 1200 Sekunden Simulationszeit ergibt auch hier ein Restvolumen von $0,5 \text{ [m}^3]$.

Wie in Beispiel 2 konkurrieren auch hier wieder der Effekt der Konzentrationszunahme durch Volumenreduktion mit dem der Denaturierung der Proteine. Bedingt durch die im Vergleich zu Beispiel 2 niedrigere Temperatur ist der Vorgang der Proteindenaturierung langsamer. Hier überwiegt der Effekt der Aufkonzentrierung durch das Abdampfen von Wasser. Die Konzentrationen der Proteine steigen an. Der Gesamtproteinverlust liegt bei etwa $0,74 \text{ kg}$. Bei einer Ausgangsmenge von $4,5 \text{ kg}$ an Proteinen entspricht dies einem Denaturierungsgrad von 16% . Alleine die Reduzierung der Eindampftemperatur von 80 auf 70°C bewirkt damit eine deutliche Verringerung des Denaturierungsgrades.

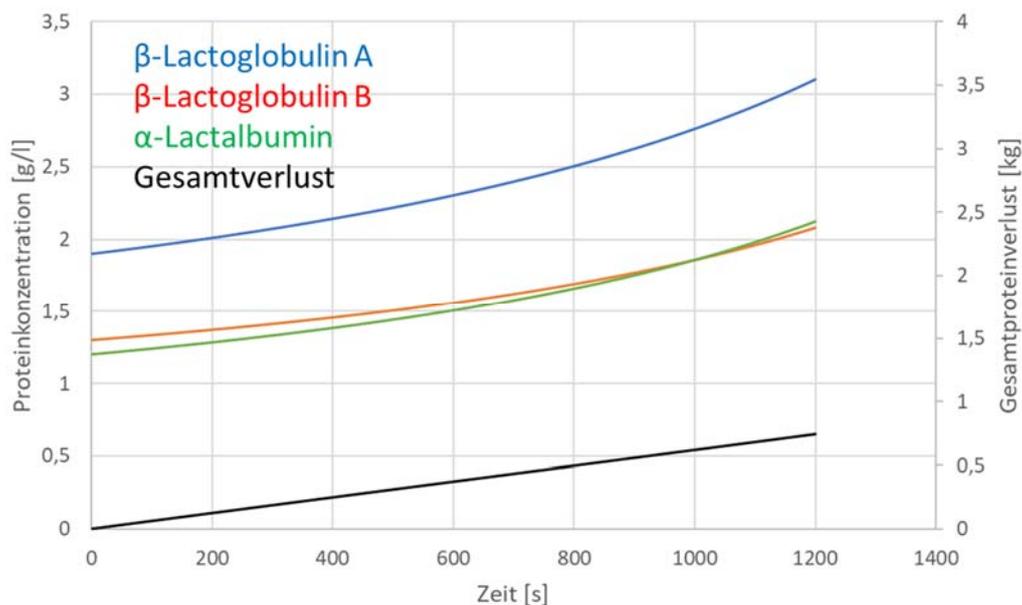


Abbildung 6-4 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 70°C , Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 3: Eindampfung im Batchbetrieb

Beispiel 4:

- $V = 0,168 \text{ [m}^3\text{]}$, Reaktortemperatur 70°C
- $\dot{V}_{zu} = 1 \text{ [m}^3\text{/h]}$, $\dot{m}_{vap} = 520 \text{ [kg/h]}$ $\rightarrow \dot{V}_{ab} = 0,5 \text{ [m}^3\text{/h]}$
entspricht einer Verweilzeit von 1200 [s]
- Startwerte: $c_{LgA} = 1,9 \text{ [g/l]}$, $c_{LgB} = 1,3 \text{ [g/l]}$, $c_{La} = 1,2 \text{ [g/l]}$
- $\rho = 1040 \text{ [kg/m}^3\text{]}$
- Simulationszeit 4800 [s] , Integrationsschrittweite 16 [s]

Dieses Simulationsbeispiel zeigt eine kontinuierliche Eindampfung im Rührwerksverdampfer. Das Volumen und die Ströme sind so gewählt, dass sich eine Eindampfung auf 50% des ursprünglichen Volumenstromes ergibt, bei einer Verweilzeit von 1200 [s] (entspricht der Haltezeit in Beispiel 3, bei entsprechendem Volumen und gleicher Eindampfrate).

Zunächst kommt es zu einem Anstieg der Konzentrationen, da die Startkonzentrationen niedriger als die nach der Eindampfung liegen und der Effekt durch die Aufkonzentrierung durch Eindampfung im Vergleich zur Denaturierungsrate größer ist. Nach etwa dreifacher Verweilzeit stellt sich ein nahezu stationärer Zustand für die Konzentrationen ein, d.h. es finden keine zeitlichen Änderungen mehr statt.

Im stationären Zustand errechnet sich aus den Reaktionsraten ein Denaturierungsgrad von 16%. Dieser liegt damit auf gleicher Höhe wie er sich bei der Batcheindampfung ergibt (Verweilzeit im kontinuierlichen Betrieb entspricht hierbei der Haltezeit im Batchbetrieb).

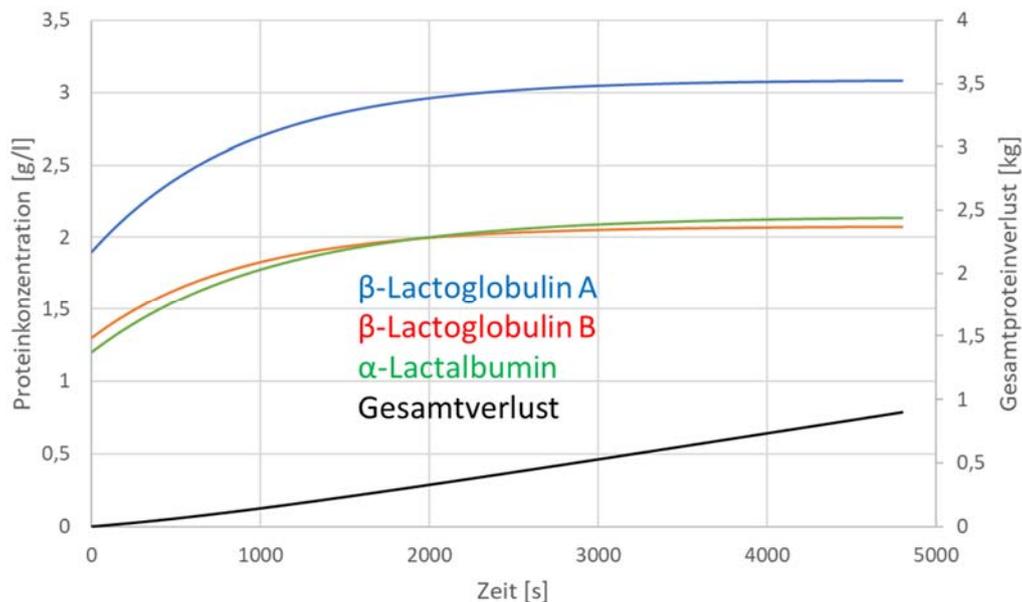


Abbildung 6-5 Zeitverläufe der Denaturierung von β -Lactoglobulin A+B sowie α -Lactalbumin und dem Gesamtproteinverlust bei 70°C , Kinetik nach Dannenberg (Dannenberg, 1986), Beispiel 4: Eindampfung im kontinuierlichen Betrieb

Fazit

Das einfache dynamische Modell eines Rührwerksverdampfers ohne Energiebilanz gibt plausible Zeitverläufe für Simulationsexperimente. Dies zeigt sich sowohl im Batchbetrieb als auch bei kontinuierlicher Fahrweise. Die dabei verwendeten Kinetiken basieren auf den Arbeiten von Dannenberg (Dannenberg, 1986).

Modellerweiterungen verbessern die Vorhersagemöglichkeiten und detaillieren die Ergebnisse. Erweiterungen wären z.B.

- die Einführung einer Konzentrations- und evtl. temperaturabhängiger Dichte,
- die Implementierung der Energiebilanz,
- die Modellerweiterung um den Beheizungsteil (z.B. dampfbeheizt) mit zustandsabhängigen Wärmedurchgangskoeffizienten,
- die Berücksichtigung der Siedepunkterhöhung durch die Eindampfung (Trockensubstanzgehalt steigt an),
- der Einbau von Gleichungen zur Berechnung von Produktablagerung auf den Heizflächen mit Auswirkung auf den Wärmedurchgang,
- die grundsätzliche Erweiterung auf ein örtlich verteiltes System zur Simulation beheizter Rohrleitungsstrecken (Heißhaltezone) oder von Rohrbündelwärmetauschern als Verdampfer.

Das aufgestellte Modell birgt noch sehr viel Potential durch Modellerweiterungen. Damit werden detailliertere Berechnungen sowohl dynamisch als auch stationär möglich.

Die Implementierung sollte in einer guten Simulationssoftware erfolgen.

7 Ergebnis und Diskussion

Zahlreiche Veröffentlichungen über die Denaturierung von Molkenproteinen, vor allem β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin, versuchen die Denaturierungskinetik zu beschreiben und zu vermessen, um eine möglichst gute Berechnung dieser Vorgänge sowohl temperatur- als auch konzentrationsabhängig zu ermöglichen. Weiterhin wird zumindest teilweise versucht, den Einfluss des pH-Wertes zumindest qualitativ zu bestimmen.

Nahezu jede Arbeit fand unter anderen Randbedingungen statt. Angefangen von unterschiedlichen Ausgangsstoffen (z.B. Magermilch, Milch aus Milchpulver, Süßmolke, Membranretentate, isolierte Proteine in Lösung u. ä.) über variierende Messmethoden, verschiedene Anlagen (beispielsweise Laboranlagen oder Pilotanlagen), verschiedene Aufheizmethoden wie Direktdampfeinspeisung oder temperierte Bäder usw.. Hier wird deutlich, dass die Ergebnisse nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar sind. Trotz dieser vielfältigen Differenzen ließen sich die Ergebnisse dieser Veröffentlichungen auswerten und daraus für die Beschreibung der Kinetiken Schlüsse ziehen.

β -Lactoglobulin

Während ein Teil der Arbeiten die beiden Varianten β -Lactoglobulin A und B getrennt betrachtet, erfolgen in anderen Veröffentlichungen die Untersuchungen an beiden Varianten gemeinsam, es findet also keine Unterscheidung zwischen diesen beiden statt. Durch eine einfache Umrechnung der Ergebnisse der Varianten A und B zusammenrechnen, falls das Verhältnis von A zu B bekannt ist. Damit ist ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Behandlungsweisen möglich.

Kinetikansatz

Obwohl es sich bei der Denaturierung von Proteinen um komplexe Vorgänge handelt, lassen sich diese mittels eines einfachen Kinetikansatzes beschreiben $\dot{r} = k_n \cdot c^n$. Vereinfacht finden zwei Vorgänge statt, die Entfaltung des Proteinmoleküls und eine anschließende Aggregation.

Reaktionsordnung

Zur Identifikation kamen unterschiedliche Methoden zur Anwendung (Integral-/Differentialmethode oder Nichtlineare Regressionsverfahren). Die Ergebnisse wichen dabei teilweise etwas voneinander ab. Bezüglich der Reaktionsordnung wurde meist ein Wert im Bereich von 1,5 identifiziert. Kleinere Abweichungen führen lediglich zu geringen Änderungen im Zeitverlauf der Reaktionen, wenn die jeweilig passende Geschwindigkeitskonstante gut angepasst werden konnte.

Die Untersuchungen in Milch bzw. Lösungen aus Milchpulver und Süßmolke lassen damit den Schluss zu, dass die Formulierung der Reaktionskinetik zur Denaturierung von β -Lactoglobulin in Milch mit einer Reaktionsordnung von $n=1,5$ gut beschreibbar ist. Die Reaktionsordnung gilt

für den gesamten Bereich der Entfaltung und Aggregation und dies für einen weiten Temperaturbereich von 70 bis 150°C. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass in weiten Konzentrationsbereichen das Arbeiten mit einer praktisch konstanten Reaktionsordnung möglich ist. Viele Identifikationen zur Kinetik basieren nicht auf direkten Konzentrationsmessungen, sondern lediglich auf Änderungen relativ zur Anfangskonzentration, die dann oft auch nicht gemessen oder angegeben wurde. Die Geschwindigkeitskonstante für eine Reaktionsordnung $n \neq 1$ findet sich häufig in der zusammengefassten Variante $k_{app} = k_n \cdot (c_0)^{(n-1)}$, identifiziert und angegeben ist dann k_{app} . Liegen nun andere Startkonzentrationen vor, so muss eine Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgen. Dazu ist allerdings die ursprüngliche Startkonzentration c_0 erforderlich.

Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion ist mittels des Ansatzes nach Arrhenius gut zu beschreiben. Hier weisen alle Arbeiten eine Zweiteilung im Temperaturbereich nach, deutlich zu sehen an einem geknickten Verlauf im $\ln(k)-1/T$ -Diagramm. Offensichtlich ist in einem Bereich der Vorgang der Entfaltung der Proteine bestimmend für die Reaktionsgeschwindigkeit, im anderen Teilbereich überwiegt die Kinetik der Aggregation. Dies lässt sich durch einen Vergleich der Entropieänderungen über die Theorie des aktivierten Übergangskomplexes (Eyring-Theorie) veranschaulichen. Die Temperatur der Bereichsübergänge liegt bei 90°C. Sie ist durch viele Arbeiten nachgewiesen und kann als gültig angesehen werden.

Vergleiche zeigen, dass die Arbeiten von Dannenberg (Dannenberg, 1986) eine gute Grundlage für Berechnungen der Denaturierung von β -Lactoglobulin bilden.

Konzentrationsabhängigkeit

Einige Arbeiten untersuchen zusätzlich den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen auf die Kinetik. Hier sind vor allem steigende Konzentrationen von Interesse, wie sie bei Eindampfvorgängen auftreten. Veröffentlichungen hierzu sind nicht sehr zahlreich. Sie zeigen jedoch, dass Konzentrationssteigerungen nur einen geringen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierungskinetik von β -Lactoglobulin haben. Somit kann mit guter Näherung eine Berechnung mit den Ansätzen und Parametern von normaler Milch erfolgen, auch beispielsweise bei der thermischen Behandlung von Konzentraten aus Membrananlagen.

Einfluss des pH-Wertes

Noch weniger Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik. Somit lassen sich eher Vermutungen als Schlüsse ziehen. So zeigt Tolkach (Tolkach, et al., 2005), dass die Geschwindigkeitskonstante bei einer Temperatur von 110°C in einem Bereich von

5,5 < pH < 8 praktisch nicht vom pH-Wert abhängt (Aggregation ist hier maßgeblich für die Reaktionsgeschwindigkeit). Bei einer Temperatur von 80°C ist jedoch eine deutliche Abhängigkeit zu sehen, hier steigen die Werte der Geschwindigkeitskonstanten mit dem pH-Wert an.

Diese Untersuchungen fanden jedoch in einer wässrigen Proteinlösung statt.

Law (Law, et al., 2000) untersucht dies in Magermilch, allerdings nur bei 80°C. Er findet keine Abhängigkeit des k-Wertes vom pH-Wert im Bereich von Bereich von 5,8 < pH < 7, ebenso kann hier die Reaktionsordnung als konstant angesehen werden. Es scheint, als ob die sonstigen Komponenten in der Milch im Vergleich zu einer Lösung aus isoliertem β -Lactoglobulin eine kompensierende Wirkung besitzen.

Im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten als Folge eines variierenden pH-Wertes kann keine klare Aussage getroffen werden. Hierzu sind keine ausreichenden Untersuchungen vorhanden. Diesbezüglich besteht noch Forschungsbedarf, vor allem dahingehend, dass nicht nur qualitative Aussagen möglich sind. Vielmehr muss eine Quantifizierung des Einflusses gefunden und implementiert werden. Falls dies nicht möglich ist, wäre die Alternative, für pH-Wert-Bereiche jeweils unterschiedliche Kinetiken zu identifizieren und entsprechend zu verwenden.

Fazit

Die Ergebnisse von Dannenberg (Dannenberg, 1986) sind eine gute Basis zur Berechnung der Denaturierung von β -Lactoglobulin. Sie gelten in einem Temperaturbereich von 70-150°C und können in weiten Konzentrationsgrenzen angewendet werden. Allerdings muss eine Umrechnung der Geschwindigkeitskonstanten für andere Konzentrationsbereiche mit der Anfangskonzentration der Untersuchungen von Dannenberg erfolgen.

Hinsichtlich der Abhängigkeit vom pH-Wert besteht noch Forschungsbedarf.

α -Lactalbumin

Die prinzipielle Vorgehensweise zur Ermittlung der Kinetik zur Denaturierung von α -Lactalbumin ist identisch mit der für β -Lactoglobulin. Die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch.

Kinetikansatz

Wie für β -Lactoglobulin ist auch hier der Ansatz für die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit $\dot{r} = k \cdot c^n$. Ebenso finden grob zwei Vorgänge statt, die Entfaltung des Proteins sowie die Aggregation. Für beide Vorgänge ist der Kinetikansatz gleich.

Reaktionsordnung

Die Denaturierungskinetik von α -Lactalbumin in Milch, lässt sich durch eine Reaktion erster Ordnung in einem weiten Temperaturbereich von 70 bis 150°C sehr gut beschreiben. Lediglich eine Veröffentlichung identifiziert eine Reaktionsordnung von 0,9 unterhalb sowie 1,1 oberhalb

von 80°C auf. Auch hier lässt sich zeigen, dass bei entsprechender Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten nur kleine, vernachlässigbare Abweichungen der Gesamtberechnung der Denaturierung die Folge sind.

Die Reaktionsordnung von 1 hat den Vorteil, dass die Geschwindigkeitskonstante immer unabhängig von der Anfangskonzentration der Versuche ist und somit ohne Umrechnung Verwendung finden kann.

Temperaturabhängigkeit

Die Geschwindigkeitskonstanten der temperaturabhängigen Kinetik von α -Lactalbumin weist ähnlich wie bei β -Lactoglobulin einen Knick auf. Dieser liegt nun allerdings bei 80°C, nachgewiesen durch etliche Arbeiten. Auch hier teilt dieser Knick die Kinetik in zwei plausible Temperaturbereiche, unterhalb mit der Dominanz der Konformationsänderungen auf die Kinetik, oberhalb mit der Aggregation als geschwindigkeitsbestimmendem Vorgang. Die von Dannenberg ermittelte Kinetik (Dannenberg, 1986) bildet eine gute Grundlage für Berechnungen. Sie ist auf Basis sehr umfangreicher Messungen und Versuche entstanden und liegt meist im Mittelfeld der Kinetiken anderer Autoren. Davon bilden einige die Reaktionen etwas schneller ab, andere etwas langsamer.

Konzentrationsabhängigkeit

Da nur wenige Arbeiten zur Konzentrationsabhängigkeit der Denaturierung von α -Lactalbumin gefunden wurden, kann keine belastbare Schlussfolgerung gezogen werden. Während Law (Law, et al., 1997) eine deutliche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Proteinkonzentration ermittelt, findet Anema (Anema, 2001) das genaue Gegenteil, keine Abhängigkeit. Es besteht somit in diesem Bereich noch Forschungsbedarf um die sich widersprechenden Ergebnisse abzuklären.

Die grundlegenden Vorgänge bei der Denaturierung und Aggregation von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin weisen starke Ähnlichkeiten auf. Unterstützt durch die Resultate von Anema, liegt die Vermutung nahe, dass in Analogie zum Einfluss der Konzentrationen auf die Kinetik von β -Lactoglobulin auch hier nur geringe Abhängigkeiten vorliegen. Diese Annahme müsste durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Abhängigkeit vom pH-Wert

Zum Thema der pH-Abhängigkeit der Denaturierungskinetik von α -Lactalbumin wurden keine Veröffentlichungen gefunden. Daher kann zu diesem Themenpunkt keine Aussage getroffen werden. Hier besteht noch intensiver Forschungsbedarf.

Modellierung

Zur Berechnung von Heißhaltezeiten und zur Eindampfung wurde ein einfaches dynamisches Modell eines Rührwerksverdampfers erstellt. Basierend auf einer Gesamtmassenbilanz sowie den Komponentenmengenbilanzen der betrachteten Molkenproteine, erfolgte die Implementierung der Kinetik von Dannenberg (Dannenberg, 1986). Damit lassen sich in unterschiedlichen Simulationsexperimenten plausible Zeitverläufe der Denaturierung und des Gesamtproteinverlustes berechnen. Abhängig von Temperatur und Verweilzeit ist dies sowohl im Batchbetrieb als auch bei kontinuierlicher Fahrweise möglich.

Das vorgestellte Modell erlaubt Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Denaturierung der betrachteten Proteine. Bedingt durch die einfache Struktur des Modelles sind dessen Einsatzmöglichkeiten jedoch noch begrenzt. Modellerweiterungen verbessern die Vorhersagemöglichkeiten und detaillieren die Ergebnisse. Erweiterungen wären z.B.

- die Einführung einer konzentrations- und temperaturabhängigen Dichte,
- die Implementierung der Energiebilanz,
- die Modellerweiterung um den Beheizungsteil (z.B. dampfbeheizt) mit zustandsabhängigen Wärmedurchgangskoeffizienten,
- die Berücksichtigung der Siedepunkterhöhung durch die Eindampfung (Trockensubstanzgehalt steigt an),
- der Einbau von Gleichungen zur Berechnung von Produktablagerung auf den Heizflächen mit Auswirkung auf den Wärmedurchgang,
- die grundsätzliche Erweiterung auf ein örtlich verteiltes System zur Simulation beheizter Rohrleitungsstrecken (Heißhaltezeiten) oder von Rohrbündelwärmetauschern als Verdampfer.

Zur Verifikation der Simulationsergebnisse und damit des Modells ist es notwendig experimentelle Untersuchungen durchzuführen. Mit der Annahme, dass das Modell die Realität bereits jetzt genügend genau abbildet, lässt es sich vorab zur Versuchsplanung einsetzen um beispielsweise den Behälterinhalt, Mengenströme, Verweilzeiten und Temperaturen festzulegen. Damit reduziert sich die Anzahl und der zeitliche Umfang der Versuche.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Molkenproteine zeigen unter thermischer Belastung Denaturierungsvorgänge, die bei genügend hoher Temperatur irreversibel sind und mit zunehmender Verweilzeit kontinuierlich ansteigen. Ziel der Arbeit war es, auf Basis einer Literaturrecherche zu analysieren, welche Möglichkeiten zur Berechnung der Proteinschädigung der Molkenproteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bestehen. Dies ist bei der Eindampfung von Milch von besonderer Wichtigkeit, da die irreversible Denaturierung die Eigenschaften der Proteine ändert.

Der komplexe und noch nicht vollständig geklärte Vorgang der Proteinschädigung lässt sich vereinfachend in einen zweistufigen Vorgang unterteilen. Zunächst finden Konformationsänderungen statt, das Protein faltet sich auf, der eigentliche Denaturierungsvorgang. Im Anschluss kommt es zur Aggregation der entfalteten Proteine. Diese beiden Vorgänge können formell als chemische Reaktionen betrachtet werden und sind in der Ablaufgeschwindigkeit in Form einer Reaktionskinetik abbildbar. Die betrachteten Reaktionsgeschwindigkeiten der Molkenproteine zeigen eine deutliche Änderung der Temperaturabhängigkeit ab einem bestimmten Punkt (β -Lactoglobulin bei 90°C , α -Lactalbumin bei 80°C). Bei dieser Temperatur ändert sich die Dominanz der jeweiligen Reaktion. Unterhalb der Temperatur bestimmt die Denaturierung die Geschwindigkeit, oberhalb der Aggregationsvorgang.

Die Reaktionsordnungen unterscheiden sich für die beiden Proteine. So weist β -Lactoglobulin eine Ordnung von 1,5 auf, während α -Lactalbumin bei 1 liegt.

Die Ergebnisse zur reaktionskinetischen Beschreibung der betrachteten Proteine zeigen, dass die Untersuchungen von Dannenberg (Dannenberg, 1986) die schlüssigsten Resultate zeigen. Zum einen sind Dannenbergs Arbeiten sehr umfangreich, andererseits liegen die Ergebnisse anderer Autoren meist über oder unter denen von Dannenberg. D.h. die Kinetiken beschreiben die Reaktionsverläufe nahezu vollständig langsamer oder schneller. Die häufig als Referenz angeführten Kinetiken von Dannenberg stellen somit eine Art Mittelweg einer guten Beschreibung dar.

Die Anwendbarkeit der Kinetiken ist in einer Temperaturspreizung von 70 - 150°C für beide Proteine möglich. Hinsichtlich des Einflusses der Konzentration lässt sich lediglich für β -Lactoglobulin die Aussage treffen, dass hier eine Gültigkeit der Kinetik in einem breiten Konzentrationsbereich gegeben ist. Aufkonzentrierungsvorgänge bei Eindampfungsprozessen und die damit einhergehende thermisch induzierte Proteinschädigung lassen sich gut abbilden. Da die grundlegenden Vorgänge bei der Denaturierung und Aggregation von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin einige Ähnlichkeiten aufweisen, liegt die unbestätigte Vermutung nahe, dass in Analogie zum Einfluss der Konzentrationen auf die Kinetik von β -Lactoglobulin, auch hier lediglich geringe Auswirkungen auf Form und Parameter der Kinetik vorliegen. Zur Bestätigung der Vermutung sind allerdings noch Untersuchungen erforderlich.

Im Hinblick auf den Einfluss des pH-Wertes auf die kinetische Beschreibung lassen sich keine schlüssigen Aussagen treffen. Hierzu liegen zu wenig Forschungsarbeiten vor, die teilweise konträre Ergebnisse liefern. Für beide Molkenproteine besteht hier noch Forschungsbedarf.

Für die thermische Behandlung von Milch in einem Rührwerksverdampfer konnte ein einfaches dynamisches Modell erstellt werden. Es basiert auf den dynamischen Bilanzen der Gesamtmasse und den Komponentenmengenbilanzen von β -Lactoglobulin A und B sowie α -Lactalbumin, ergänzt durch eine dynamische Bilanzgleichung zur Berechnung der Masse der gesamten denaturierten Proteine. Für die Beschreibung der Reaktionskinetiken kamen die Kinetiken von Dannenberg zur Anwendung.

Durch die Annahme einer konstanten Behältertemperatur konnte auf eine Energiebilanz verzichtet werden, der abgedampfte Massenstrom ist in diesem Modell eine Vorgabe durch den Benutzer.

Simulationsexperimente für reine Heißhaltung, Eindampfung im Batchbetrieb oder bei kontinuierlicher Fahrweise bei unterschiedlichen Temperaturen lieferten plausible Ergebnisse zu den zeitabhängigen Konzentrationsverläufen der betrachteten Molkenproteine und deren Gesamt-denaturierung. Zur Validierung des Modells ist es jedoch erforderlich experimentelle Untersuchungen durchzuführen um neben der Plausibilität der Simulationsergebnisse auch eine quantitative Beurteilung zu ermöglichen.

Das Modell stellt eine gute Grundlage für Erweiterungen dar, um reale Anlagen besser abbilden zu können oder gar für die Prozessauslegung und -optimierung herangezogen zu werden.

Erweiterungsmöglichkeiten sind beispielsweise die Ergänzung einer dynamischen Energiebilanz, Zustandsabhängige Stoffdaten wie die Dichte, die Erweiterung im den Heizbereich (z.B. dampfbeheizt), zusätzliche Bilanzen zur Berechnung thermisch induzierter Ablagerungen und deren Auswirkungen auf den Wärmedurchgang und ähnliches.

Während das vorgestellte Modell ein konzentriertes System eines Rührkessels darstellt, muss für die Berechnung von Heißhaltestrecken in Rohrleitungen und die Eindampfung in Rohrbündelwärmetauschern (z.B. Fallfilmverdampfer) eine örtlich verteilte Modellierung herangezogen werden. Oder es erfolgt in einem ersten Schritt die Reihenschaltung vieler Rührkessel als Ersatzmodell (das Verweilzeitverhalten von Rührkesseln in Reihe geschaltet nähert sich mit steigender Anzahl immer dem eines Rohrreaktors). Den Möglichkeiten zur Detaillierung des Modells sind kaum Grenzen gesetzt.

9 Anhang

9.1 Lösungen der Differentialgleichung (Gl.4-5)

Die Voraussetzungen für die Komponentenbilanz nach Gleichung (Gl.4-5) sind:

- ein thermodynamisch geschlossenes System
- keine Phasenwechsel
- ein konstantes Volumen der Phase in der die Reaktion abläuft
- Teilnahme der betrachteten Komponente formal an einer Reaktion mit konstanter Geschwindigkeitskonstante und beliebiger, konstanter Reaktionsordnung n nach Gleichung (Gl.4-4)

Ausgehend von

$$-\frac{dc}{dt} = k_n \cdot c^n$$

ergibt sich durch Umformung

$$\frac{1}{c^n} \cdot dt = -k_n \cdot dt$$

und damit

$$\int_{c_0}^{c_t} \frac{1}{c^n} dt = -k_n \cdot \int_{t_0=0}^t dt$$

a) für den Spezialfall $n = 1$ folgt

$$[\ln(c) + A]_{c_0}^{c_t} = -k \cdot [t + B]_0^t \text{ mit Konstanten A und B}$$

$$\Rightarrow \ln(c_t) - \ln(c_0) = -k \cdot t$$

$$\Leftrightarrow \ln\left(\frac{c_t}{c_0}\right) = -k \cdot t$$

$$\Leftrightarrow \frac{c_t}{c_0} = e^{-k \cdot t}$$

b) für $n \neq 1$ folgt

$$\left[\frac{1}{1-n} \cdot c^{1-n} + A\right]_{c_0}^{c_t} = -k_n \cdot [t + B]_0^t \text{ mit Konstanten A und B}$$

$$\Rightarrow c_t^{1-n} - c_0^{1-n} = (n-1) \cdot k_n \cdot t$$

$$\Leftrightarrow c_t^{1-n} = c_0^{1-n} + (n-1) \cdot k_n \cdot t$$

$$\Leftrightarrow \left(\frac{c_t}{c_0}\right)^{1-n} = 1 + (n-1) \cdot k_n \cdot c_0^{n-1} \cdot t$$

$$\Leftrightarrow \frac{c_t}{c_0} = [1 + (n - 1) \cdot k_n \cdot c_0^{n-1} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}}$$

9.2 Umrechnung k_{app1} in k_{app2} , (Gl.4-10)

Wird bei der Identifizierung der Kinetik auf der Grundlage von

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n - 1) \cdot k_n \cdot c_0^{n-1} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}}$$

die Geschwindigkeitskonstante

$$k_{app} = k_n \cdot c_0^{(n-1)}$$

verwendet, so ist die Geschwindigkeitskonstante k_{app} abhängig von der Startkonzentration c_0 .
und damit

$$\frac{c_t}{c_0} = [1 + (n - 1) \cdot k_{app} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}}$$

Soll nun die Kinetik für eine andere Startkonzentration zum Einsatz kommen, so ist die Geschwindigkeitskonstante anzupassen.

Es gilt

$$k_{app1} = k_n \cdot c_{01}^{(n-1)} \quad \text{und} \quad k_{app2} = k_n \cdot c_{02}^{(n-1)}$$

bei gleicher Geschwindigkeitskonstante k . Die Kombination ergibt

$$\frac{k_{app1}}{k_{app2}} = \left(\frac{c_{01}}{c_{02}}\right)^{(n-1)}$$

Für k_{app2} gilt daher

$$k_{app2} = k_{app1} \cdot \left(\frac{c_{02}}{c_{01}}\right)^{(n-1)}$$

Liegt keine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k von der Startkonzentration vor, so sind die Geschwindigkeitskonstanten k_{appi} aus einer Referenzkonstanten k_{app} berechenbar. Damit sind auch Umrechnungen möglich, wenn keine absoluten Konzentrationen sondern lediglich Faktoren bekannt sind, z.B. Verdopplung der Startkonzentration durch die doppelte Menge an Magermilchpulver.

9.3 Ermittlung der Denaturierungsrate von β -Lactoglobulin A+B

Dannenberg (Dannenberg, 1986) untersucht die Proteinvarianten A und B getrennt. Allerdings liegen keine Informationen über die Startkonzentrationen der beiden Varianten vor, die Identifikation beruht auf dem Verhältnis $\frac{c_{tA}}{c_{0A}}$ bzw. $\frac{c_{tB}}{c_{0B}}$. Um einen Vergleich der Aktivierungsenergien für A und B gesamt zu ermöglichen, wurde der Denaturierungsverlauf für β -Lactoglobulin A und B mit den Parametern

		T: 70-90°C	T: 95-150°C
β -Lactoglobulin A	$\ln(k_0 \cdot 1000), k_0 \text{ in } [s^{-1}]$	84,16	14,41
	$E_A \left[\frac{kJ}{mol} \right]$	265,21	54,07
β -Lactoglobulin B	$\ln(k_0 \cdot 1000), k_0 \text{ in } [s^{-1}]$	89,43	12,66
	$E_A \left[\frac{kJ}{mol} \right]$	279,96	47,75

bei einem angenommenen Verhältnis von A/B: $\alpha_{AB} = 1,46$ (entspricht 1,9 g/l A und 1,3 g/l B) bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Berechnung der Gesamtdenaturierung erfolgte nach Gleichung (Gl.5-3)

$$\frac{c_t}{c_0} = \frac{\frac{c_{tA}}{c_{0A}} \cdot \alpha_{AB} + \frac{c_{tB}}{c_{0B}}}{\alpha_{AB} + 1}$$

Ein Beispiel für eine resultierende Gesamtdenaturierung zeigt die folgende Abbildung

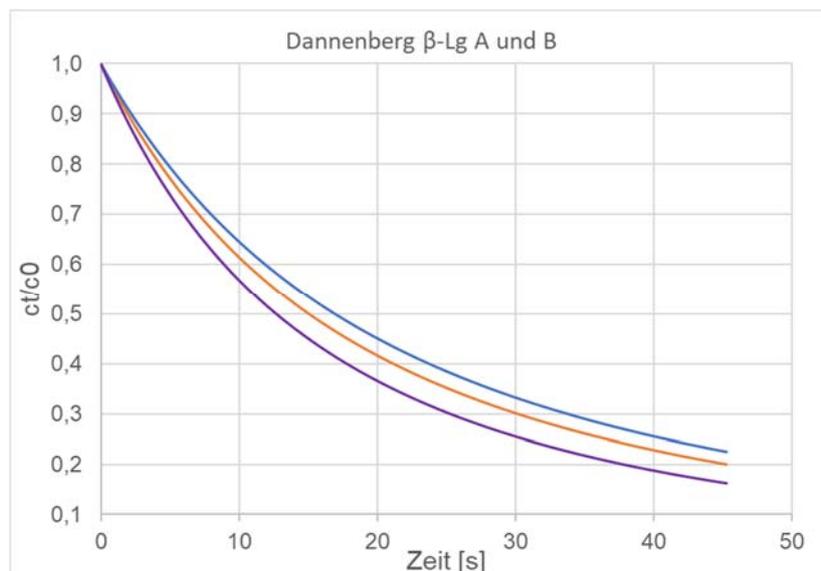


Abbildung: β -Lactoglobulin Denaturierung bei 100°C, Parameter für A und B nach (Dannenberg, 1986), für A+B nach Gleichung (Gl.5-3)

Mit einer Reaktionsordnung von $n = 1,5$ erfolgte die numerische Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} für die Gesamtdenaturierung A+B mittels nichtlinearer Regression, basierend auf dem Ansatz nach Gleichung (Gl.4-9) mit

$$\frac{c_{tAB}}{c_{0AB}} = [1 + 0,5 \cdot k_{app} \cdot t]^{-\frac{1}{0,5}}$$

Dabei errechneten sich die folgenden Geschwindigkeitskonstanten:

Temp [°C]	kapp [1/s]	Temp [°C]	kapp [1/s]
70	1,57E-04	95	4,36E-02
75	6,14E-04	100	5,46E-02
80	2,31E-03	110	8,45E-02
85	8,38E-03	120	1,28E-01
90	2,93E-02	130	1,89E-01
		140	2,74E-01

Für den jeweiligen Temperaturbereich berechnen sich (ebenfalls mit nichtlinearer Regression) für den klassischen Arrheniusansatz nach Gleichung (Gl.4-15)

$$k = k_0 \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{R \cdot T}\right)}$$

die Parameter für β -Lactoglobulin A+B zu

	70-90°C	95-140°C
$\ln(k_0 \cdot 1000) [s^{-1}]$	86,2	13,7
$E_A \left[\frac{kJ}{mol} \right]$	270,9	51,6

9.4 Dichte von Milch

Für die Gesamtmasse eines Gemisches aus n Komponenten gilt:

$$m_{ges} = \sum_{i=1}^n m_i$$

Unter der Voraussetzung, dass die Komponenten auf Molekülebene untereinander nicht mischbar sind, gilt für das Gesamtvolumen V

$$V_{ges} = \sum_{i=1}^n V_i$$

Damit berechnet sich die Mischungsdichte zu

$$\rho_{ges} = \frac{\sum_{i=1}^n m_i}{\sum_{i=1}^n V_i}$$

mit $\rho_i = m_i/V_i$ und Erweitern des Bruches mit $1/m_{ges}$ und $w_i = m_i/m_{ges}$ ergibt sich

$$\rho_{ges} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{w_i}{\rho_i}}$$

Nach Choi (Choi, et al., 1986) lässt sich die Dichte der Milchfraktionen als Funktion der Temperatur und Zusammensetzung wie folgt berechnen (T in [K])

$$\rho_{Fett} = 928,59 - 0,41757 \cdot T$$

$$\rho_{Proteine} = 1329,9 - 0,5184 \cdot T$$

$$\rho_{Kohlenhydrate} = 1599,1 - 0,31046 \cdot T$$

$$\rho_{Asche} = 2423,8 - 0,28063 \cdot T$$

Mit der Berechnung der temperaturabhängigen Wasserdichte

$$\rho_{Wasser} = 802,705 + 1,5882 \cdot T - 0,00314 \cdot T^2$$

ergibt sich damit für die Dichte von Milch als Funktion Temperatur und Zusammensetzung zu

$$\rho = \frac{1}{\sum_{i=1}^5 \frac{w_i}{\rho_i}}$$

mit i : 1=Fett, 2=Proteine, 3=Kohlenhydrate, 4=Asche, 5=Wasser.

Anmerkung: Die Anpassung der Parameter für Wasser erfolgte auf Basis von Tabellendaten für einen Temperaturbereich von 20-100°C (Wis18).

10 Literaturverzeichnis

- Anema S. G , Lee S. K. und Klostermeyer H.** Effect of Protein, Nonprotein-Soluble Components, and Lactose Concentrations on the Irreversible Thermal Denaturation of beta-Lactoglobulin and alpha-Lactalbumin in Skim-Milk [Artikel] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 19 2006. - 54. - S. 7339-7348.
- Anema S. G.** Effect of Milk Concentration on the Irreversible Thermal Denaturation and Disulfide Aggregation of beta-Lactoglobulin [Artikel] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 9 2000. - Bd. 48. - S. 4168-4175.
- Anema S. G. und McKenna A. B.** Reaction Kinetics of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Heated Reconstituted Milk [Artikel] // Journal of Agricultural Food Chemistry. - 2 1996. - Bd. 44. - S. 422-428.
- Anema S.G.** Kinetics of the Irreversible Thermal Denaturation and Disulfide Aggregation of alpha-Lactalbumin in Milk Samples of Various Conetrations [Artikel] // Journal of Food Sciencs. - 2001. - 66. - Bd. 1. - S. 2-9.
- Belitz H.-D. und Grosch W.** Lehrbuch der Lebensmittelchemie [Buch]. - [s.l.] : Springer-Verlag, 1985. - 2. Auflage.
- Chmiel H.** Bioprozesstechnik [Buch]. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2006. - 2.
- Choi Y und Okos M.** Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods [Artikel] // Food Eng. Process Appl.. - 1986. - 1. - S. 93-101.
- Croguennec T., O'Kennedy B. T. und Mehra R.** Heat-induced Denaturation/Aggregation of beta-Lactogloblin A and B: Kinetics of the First Intermediates Formed [Artikel] // International Dairy Journal. - 2004. - Bd. 14. - S. 399-409.
- Dannenberg F. und Kessler H.-G.** Application of reaction kinetics to the denaturation of whey proteins in heated milk [Artikel] // Milchwissenschaft. - 1988b. - Bd. 43. - S. 3-7.
- Dannenberg F. und Kessler H.-G.** Reaction Kinetics of the Denturation of Whey Proteins in Milk [Artikel] // Journal of Food Science. - 1 1988a. - Bd. 53. - S. 258-263.
- Dannenberg F.** Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung [Buch]. - TU München : Dissertation, 1986.
- De Wit J. N.** Thermal Behaviour of Bovine β -Lactoglobulin at Temperatures up to 150°C: A Review [Artikel] // Trends in Food Science and Technology. - 2009. - Bd. 20. - S. 27-34.
- De Wit J. N. und Swinkels G. A. M.** A Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermal Denaturation of Bovine beta-Lactoglobulin, Thermal Behaviour at Temperatures up to 100°C [Artikel] // Biochimica et Biophysica Acta. - 1980. - Bd. 624. - S. 40-50.
- Dissanayake M. [et al.]** Denaturation of Whey Proteins as a Function of Heat, pH an Protein Concentration [Artikel] // International Dairy Journal. - 2013. - Bd. 31. - S. 93-99.
- Dupont M-** Comparaison de la Thermodénaturation des beta-Lactoglobulines A et B a pH 6,85 [Artikel] // Biochim. Biophys.. - 1965. - 94. - S. 573-575.

- Dupont M. und Yon J.** Influence de Chlorure de Sodium sur la Vitesse de Thermodénaturation de la beta-Lactoglobuline Bovine a pH 6,85 [Artikel] // J. Chim. Phys.. - 1961. - 58. - S. 682-689.
- Emig G. und Klemm E.** Technische Chemie [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2005. - 5.
- Eyring H.** The Activated Complex in Chemical Reactions [Artikel] // Journal of Chemical Physics. - 1935. - Bd. 3. - S. 107ff.
- Fiedler J.** Ansatzbildung durch Milchsäure und Molkenproteine beim Eindampfen von Molke und Ultrafiltrations-Permeat in einem Fallfilmverdampfer [Buch]. - TU München : Dissertation, 1985.
- Galani D. und Apenten R. K. O.** The Comparative Heat Stability of Bovine β -Lactoglobulin in Buffer and Complex Media [Artikel] // Journal of Science of Food and Agriculture. - 1997. - 74. - S. 89-98.
- Galani D. und Owusu Apenten R. K.** Heat-induced Denaturation and aggregation of β -Lactoglobulin: Kinetics of Formation of Hydrophobic and Disulfid-linked Aggregates [Artikel]. - 1999. - Bd. 34. - S. 467-476.
- Gotham S. M., Fryer P. J. und Pritchard A. M.** β -Lactoglobulin Denaturation and Aggregation Reactions and Fouling Deposit Formation: A DSC Study [Artikel] // International Journal of Food Science and Technology. - 1992. - Bd. 27. - S. 313-327.
- Gough P. und Jenness R.** Heat Denaturation of β -Lactoglobulins A and B [Artikel] // Journal of Dairy Science. - 1962. - Bd. 45. - S. 1033-1039.
- Harland H. A. [et al.]** The Denaturation of Milk Serum Proteins at Temperatures Ranging from 180 to 290°F [Artikel] // Journal of Dairy Science. - 1953. - Bd. 36. - S. 568-569.
- Harwalkar V.R. und Kalab M.** Thermal Denaturation and Aggregation of beta-Lactoglobulin in Solution. Electron Microscopic Study [Artikel] // Milchwissenschaft. - 1985. - 40. - Bd. 11. - S. 65-68.
- Kessler H.G.** Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie [Buch]. - [s.l.] : Verlag A. Kessler, 2006. - 1. Nachdruck.
- Kessler H.-G. und Beyer H. J.** Thermal Denaturation of Whey Proteins and its Effect in Dairy Technology [Artikel] // International Journal of Biological Macromolecules. - 1991. - 13. - S. 165-173.
- Larson L. und Jennes R.** Characterization of the Sulfhydryl Groups and the Kinetics of the Heat Denaturation of Crystalline β -Lactoglobuline [Artikel] // Journal of the American Chemical Society. - 1952. - Bd. 74. - S. 3090-3093.
- Law A. J. R. und Leaver J.** Effect of Protein Concentration on Rates of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk [Artikel] // Journal of Agricultural Food Chemistry. - 1997. - Bd. 45. - S. 4255-4261.

- Law A.J.R. und Leaver J.** Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk [Artikel] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 3 2000. - 48. - S. 672-679.
- Leeb E., Haller N. und Kulozik U.** Effect of pH on the Reaction Mechanism of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine β -Lactoglobulin [Artikel] // International Dairy Journal. - 2018. - Bd. 78. - S. 103-111.
- Loveday S. M.** β -Lactoglobulin Heat Denaturation: A Critical Assessment of Kinetic Modelling [Artikel] // International Dairy Journal. - 2016. - Bd. 52. - S. 92-100.
- Lyster R. L. J.** The Denaturation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Heated Milk [Artikel] // Journal of Dairy Research. - 2 1970. - Bd. 37. - S. 233-243.
- Madoumier M. [et al.]** Modelling the properties of liquid foods for use of process flowsheeting: Application to milk concentration [Artikel] // Journal of Food Engineering. - 2015. - 164. - S. 70-89.
- Manji B. und Kakuda Y.** Thermal Denaturation of Whey Protein in Skim Milk [Artikel] // Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. - 1986. - Bd. 19. - S. 163-166.
- Mazri C. [et al.]** Effect of High-Pressure Treatment on Denaturation of Bovine β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin [Artikel] // European Food Research and Technology. - 2012. - Bd. 234. - S. 813-819.
- Ng-Kwai-Hang K. F. und Kim S.** Different Amounts of beta-Lactoglobulin A and B in Milk [Artikel] // Int. Dairy Journal. - 1996. - 6. - S. 689-695.
- Oldfield D. J. [et al.]** Kinetics of Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Skim Milk Heated in an Ultrahigh Temperature (UHT) Pilot-Plant [Artikel] // International Dairy Journal. - 1998. - S. 311-318.
- Oldfield D. J.** Heat Induced Whey Protein Reactions in Milk: Kinetics of Denaturation and Aggregation as Related to Milk Powder Manufacture [Buch]. - PhD-Thesis, Massey University, New Zealand : [s.n.], 1996.
- Oldfield D. J., Singh H. und Taylor M. W.** Kinetics of Heat-Induced Whey Protein Denaturation and Aggregation in Skim Milk 2005s with Adjusted Whey Protein Concentration [Artikel] // Journal of Dairy Research. - 2005. - Bd. 72. - S. 369-378.
- Pantaloni M. D.** Étude de la Transition R \rightarrow S de la β -Lactoglobuline par Spectropolarimétrie de Différence [Artikel] // Compt. Rend. Acad. Sc.. - Paris : [s.n.], 1964. - S. 5753-5756.
- Park K. H. und Lund D. B.** Calorimetric Study of Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin [Artikel]. - Journal of Dairy Science : [s.n.], 1984. - Bd. 67. - S. 1699-1706.
- Plock J., Spiegel T. und Kessler H.-G.** Reaction Kinetics of the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Sweet Whey Concentrated by Evaporation [Artikel] // Milchwissenschaft. - 1997. - Bd. 12. - S. 678-681.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg [Online] // Kompatklexikon der Biologie. - 29. 04 2018. - www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/proteine/9423.

Tolkach A. und Kulozik U. Effect of pH and Temperature on the Reaction Kinetic Parameters of the Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin [Artikel] // Milchwissenschaft. - 2005. - Bd. 60. - S. 249-252.

Tolkach A. und Kulozik U. Reaction Kinetic Pathway of Reversible and Irreversible Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin [Artikel] // Le Lait, INRA Editions. - 2007. - Bd. 87. - S. 301-315.

van Boekel M. A. J. S. Statistical Aspects of Kinetic Modeling for Food Science Problems [Artikel] // Journal of Food Science. - 1996. - Bd. 61. - S. 477-486.

Verheul M., Roefs S. P. F. M. und de Kruif K. G. Kinetics of Heat-Induces Aggregation of β -Lactoglobulin [Artikel] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 1998. - Bd. 46. - S. 896-903.

WD Statistiken zur Milcherzeugung [Bericht] = WD 5 - 3000 - 028/16 : Sachstandsbericht / WD 5: Wirtschaft und Technologie; Ernährung, Landwirtschaft und ; Wissenschaftliche Dienste Deutscher Bundestag. - 2016.

Westphal G., Buhr H. und Otto H. Reaktionskinetik in Lebensmitteln [Buch]. - [s.l.] : Springer-Verlag, 1996. - 1. Auflage.

Wissenschaft-Technik-Ethik [Online]. - 20. 04 2018. - http://www.wissenschaft-technik-ethik.de/wasser_dichte.html#kap02.

Wolz M. und Kulozik U. Thermal Denaturation Kinetics of Whey Proteins at High Protein Concentrations [Artikel] // International Dairy Journal. - 2015. - Bd. 49. - S. 95-101.

www.spektrum.de [Online]. - 7. 3 2018. - www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteine/4137.