

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie

Untersuchungen zum hochdruckausgelösten Zerfall der Caseinmizelle

Martin Heinrich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik
2. Univ.-Prof. Dr. A. Wierschem

(Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg)

Die Dissertation wurde am 21.12.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.03.2012 angenommen.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-8439-0494-0

© Verlag Dr. Hut, München 2012
Sternstr. 18, 80538 München
Tel.: 089/66060798
www.dr.hut-verlag.de

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Autor vor.

1. Auflage 2012

Für meine Familie

*Auf der Familie ruht die Kunst, die Wissenschaft,
der menschliche Fortschritt und der Staat.*

Adalbert Stifter

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von September 2006 bis September 2011 während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der TU München unter der Leitung von Herrn Professor Dr.-Ing. Ulrich Kulozik. An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit besonders unterstützt haben:

Dies ist allen voran Herr Professor Dr.-Ing. Ulrich Kulozik, der die Anfertigung der vorliegenden Arbeit angeregt, ermöglicht und dafür ein Institut mit hervorragender technischer und analytischer Ausstattung zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich dem Team aus dem HPLC-Labor, Brigitte Härter, Anne Keller und Ilona Hager. Mit Ihrer Geduld aber auch Ihrer Unterstützung bei der Methodenentwicklung und Auswertung haben sie wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Annette Brümmer-Rolf für die Unterstützung beim Erstellen und Auswerten der SDS-Pages sowie für die sehr hilfreichen und produktiven morgendlichen Diskussionen der Ergebnisse. Karin Karasch möchte ich für die Unterstützung bei den zahlreichen Routine-Analysen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Studenten, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. Dies ist zu aller erst Valentin Rauh, der mich in seiner hartnäckigen Art beim Knacken so mancher harten Nuss unterstützt hat. Darüber hinaus sind dies unter anderem Isabel Osterroth, Silvia Zurawski, Tatiana Nikolaeva, Thomas Strixner und Katrin Pankofer.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen ehemaligen Bürokollegen Chalat Santivarangkna, Bettina Higl, Katharina Pruß, Cornelia Glashauser und Janina Brand für die stets angenehme Büroatmosphäre und die produktiven und hilfreichen Diskussionen bedanken. Dem Team aus der Werkstatt, Christian Ederer, Erich Schneider und Franz Fraunhofer, danke ich für die technische und persönliche Unterstützung beim Betrieb der Hochdruckanlage und für die Anfertigung zahlreicher mehr oder weniger komplizierter Auf- und Einbauten. Ein besonderer Dank geht auch an Sabine Becker und Friederike Schöpflin, die mich bei organisatorischen Angelegenheiten unterstützt haben. Außerdem danke ich allen Kollegen und Studenten des Lehrstuhls für die angenehme, freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Last but not least möchte an dieser Stelle ganz herzlich meiner Familie und meiner Freundin Sandra für die liebevolle Unterstützung in schweren Zeiten und auch sonst in allen Lebenslagen danken. Bei ihnen finde ich stets ein offenes Ohr, den nötigen Rückhalt und den Zuspruch, der mich immer ermutigt und anspricht, weiter nach vorne zu schauen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | VII |
| Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis | XI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Grundlagen..... | 3 |
| 2.1 Methoden zur Erzeugung hohen hydrostatischen Druckes | 3 |
| 2.2 Thermodynamische Grundlagen für die Druckwirkung auf biologische Systeme | 5 |
| 2.2.1 Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie..... | 6 |
| 2.2.2 Druckabhängigkeit der freien Enthalpie..... | 7 |
| 2.2.3 Chemische Reaktionen und Gleichgewichte | 8 |
| 2.2.4 Kinetische Aspekte | 12 |
| 2.3 Druckwirkung auf Bindungen und intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen in biologischen Systemen | 14 |
| 2.4 Milch und ihre Bestandteile | 18 |
| 2.4.1 Gelöste Salzbestandteile der Milch..... | 19 |
| 2.4.2 Proteine in Milch | 20 |
| 2.5 Chymosin | 26 |
| 2.5.1 Grundlegendes und Aufbau | 27 |
| 2.5.2 Wirkungsweise | 27 |
| 3 Stand des Wissens..... | 29 |
| 3.1 Das Assoziations- bzw. Aggregationsverhalten isolierter Caseinmonomere | 29 |
| 3.2 Caseinmizellen..... | 31 |
| 3.2.1 Generelle Eigenschaften von Caseinmizellen..... | 31 |
| 3.2.2 Die Oberfläche der Caseinmizelle | 33 |
| 3.2.3 Modellvorstellungen zur inneren Struktur der Caseinmizelle | 35 |
| 3.3 Einflüsse auf die Struktur und die Stabilität der Caseinmizelle..... | 38 |
| 3.3.1 Ionen..... | 38 |
| 3.3.2 pH | 39 |
| 3.3.3 Temperatur..... | 40 |
| 3.3.4 Druck | 41 |
| 4 Zielsetzung..... | 45 |
| 5 Material und Methoden | 47 |
| 5.1 Caseingewinnung | 47 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.1.1 | Gewinnung von UF-Permeat | 47 |
| 5.1.2 | Caseingewinnung im Großmaßstab für die Inaktivierungsversuche von Chymosin, sowie zur Bestimmung der Enzymkinetik von Chymosin unter hohem hydrostatischen Druck..... | 47 |
| 5.1.3 | Zentrifugale Caseingewinnung aus Magermilch | 48 |
| 5.1.4 | Zentrifugale Größenfraktionierung von Caseinmizellen | 49 |
| 5.1.5 | Gewinnung von Caseinmizellen mit reduzierter Verteilungsbreite | 50 |
| 5.2 | Probenbehandlung..... | 50 |
| 5.2.1 | Untersuchungen zum druckbedingten Dissoziationsverhalten von Caseinmizellen..... | 52 |
| 5.2.2 | Enzymatische Modifikation von Caseinmizellen unter Druck | 54 |
| 5.3 | Analysen | 58 |
| 5.3.1 | Methode zur Analytik der einzelnen Caseinfraktionen mittels RP-HPLC..... | 58 |
| 5.3.2 | CMP-Analytik mittels RP-HPLC | 63 |
| 5.4 | SDS-Page..... | 64 |
| 5.5 | Bestimmung des Proteingehaltes..... | 65 |
| 5.6 | Bestimmung der Partikelgröße in den Versuchslösungen | 65 |
| 5.7 | Bestimmung des Zeta-Potentials..... | 66 |
| 5.8 | Analyse der Mineralienkomposition | 66 |
| 6 | Ergebnisse und Diskussion..... | 67 |
| 6.1 | Untersuchungen zur druckabhängigen Dissoziation von Caseinmizellen..... | 67 |
| 6.1.1 | Mathematische Beschreibung des diffusiven Durchtritts einer Substanz durch eine mikroporöse Membran | 67 |
| 6.1.2 | Diffusionsversuche unter hohem hydrostatischen Druck..... | 70 |
| 6.1.3 | Diffusionsversuche mit keramischen Membranen bei Normal- und unter Hochdruck | 71 |
| 6.1.4 | Untersuchung der Membranintegrität nach einer Druckbehandlung | 73 |
| 6.1.5 | Untersuchung auf unspezifische Caseinadsorption an und in der Membran..... | 74 |
| 6.1.6 | Validierung des Versuchsaufbaus..... | 74 |
| 6.1.7 | Zeit- und druckabhängiges Permeationsverhalten der Caseine | 75 |
| 6.1.8 | Betrachtung der zeit- und druckabhängigen Konzentrationsveränderung der Einzelcaseinfraktionen bei 20 °C | 76 |
| 6.1.9 | Temperaturabhängigkeit der Permeation..... | 80 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.1.10 | Zusammenfassung der Ergebnisse der membranbasierten Dissoziationsversuche im Hinblick auf die Mizellstabilität | 89 |
| 6.2 | Enzymatische Modifikation von κ -Casein unter Hochdruck..... | 91 |
| 6.2.1 | Beschreibung der Chymosin-katalysierten Hydrolysereaktion | 91 |
| 6.2.2 | Die Inaktivierung von Chymosin durch hohen hydrostatischen Druck..... | 94 |
| 6.2.3 | Bestimmung der Reaktionskinetik von Chymosin unter Druck..... | 103 |
| 6.2.4 | Auswirkungen einer partiellen Hydrolyse von κ -Casein auf das Reassoziationsverhalten druckdissozierter Caseinmizellen | 110 |
| 7 | Schlussfolgerung und Ausblick..... | 127 |
| 8 | Zusammenfassung / Summary..... | 129 |
| 9 | Literatur | 133 |
| 10 | Anhang | 141 |

Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| AS | Aminosäure |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| HCl | Chlorwasserstoff / Salzsäure |
| CCP | Colloidales Calciumphosphat |
| M | Molarität / molar |
| Da | Dalton |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| Phe | Phenylalanin |
| Met | Methionin |
| Cys | Cystein |
| MW | molecular weight / Molekulargewicht |
| MWCO | molecular weight cut-off / molekulare Trenngrenze |
| CMP | Caseinomakropeptid |
| TEM | transmission electron microscopy / Transmissionselektronenmikroskopie |
| AFM | atomic force microscopy / Rasterkraftmikroskopie |
| SANS | small angle neutron scattering / Neutronenkleinwinkelstreuung |
| SAXS | small angle x-ray scattering / Röntgenkleinwinkelstreuung |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| UF | Ultrafiltration |
| MF | Mikrofiltration |
| SPS | Speicherprogrammierbare Steuerung |
| LDPE | low density polyethylene |
| HDPE | high density polyethylene |
| RP-HPLC | reversed phase high performance liquid chromatography / Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie |

| | |
|--------|--------------------------------------|
| TFA | Trifluoressigsäure |
| GdnHCl | Guanidiniumhydrochlorid |
| DH | Degree of Hydrolysis / Hydrolysegrad |

Formelzeichen

| | | |
|-------------------------------|------------------------|--|
| p | [Pa] | Druck |
| A | [m ²] | Fläche |
| F | [N] | Newton |
| d _i | [m] | Innendurchmesser (bei Hochdruckautoklaven) |
| S | [J/K] | Entropie |
| H | [J/mol] | molare Enthalpie |
| U | [J/mol] | innere Energie |
| G | [J/mol] | freie Enthalpie |
| T | [K] | Temperatur |
| V | [m ³] | Volumen |
| n | [mol] | Stoffmenge |
| μ | [J/mol] | chemisches Potential |
| Q | [-] | Aktivitätskoeffizient |
| a | [-] | Aktivität |
| K | [-] | Gleichgewichtskonstante |
| R | [J/mol·K] | allgemeine Gaskonstante: 8,314 J/mol·K |
| Δ _R H ^θ | [J/mol] | molare Standardreaktionsenthalpie |
| Δ _R G ^θ | [J/mol] | freie molare Standardreaktionsenthalpie |
| Δ _R V ^θ | [cm ³ /mol] | Standardreaktionsvolumen |
| C | [g/m ³] | Konzentration |
| t | [s] | Zeit |

| | | |
|-------|-----------------------|---|
| k | [1/h], [1/min], [1/s] | Reaktionsgeschwindigkeitskonstante |
| n | [-] | Reaktionsordnung |
| I | [M] | Ionenstärke |
| z_i | [-] | Ladung |
| k_B | [J/K] | Boltzmannkonstante = $1,3806504 \cdot 10^{-23}$ J/K |
| g_a | [m/s ²] | Gravitationsbeschleunigung = 9,81 m/s ² |

Indices und griechische Symbole

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| i | innen |
| A | Anfang |
| E | Ende |
| m | molar |
| p | bezogen auf einen Druck |
| T | bezogen auf eine Temperatur |
| intr. | Intramolekular |
| solv. | Bezogen auf das Lösungsmittel |
| R | „-Reaktion“ |
| θ | Standardbedingung (0,1 MPa; 298,13 K) |
| Δ | Delta / Differenz / Veränderung |
| ξ | Reaktionslaufzahl |
| ν_i | stöchiometrischer Koeffizient |
| γ_i | Aktivitätskoeffizient |
| ϵ_r | relative Permittivität |
| π | Kreiszahl = 3,14159 |
| ϵ | molarer Extinktionskoeffizient |
| σ | Standardabweichung |

Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis

ini initial-

p druck-

1 Einleitung

In Milch stellt Casein mit 80 % die Hauptprotein­komponente dar. Bei Casein handelt es sich jedoch nicht um ein singuläres Protein, sondern vielmehr um eine Sammelbezeichnung für eine ganze Gruppe von Phosphoproteinen, bestehend aus α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein. Diese Proteine liegen in Milch nur zu etwa 5 % in freier Form vor, während der Großteil zu sphärischen Dispersionskolloiden, den Caseinmizellen, organisiert ist. Diese Caseinpartikel sind an einer Vielzahl von milchtechnologischen Prozessen maßgeblich beteiligt, beispielsweise bei der Käse- und Joghurtherstellung. Aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung, aber auch wegen der besonderen Eigenschaften der Caseinmizellen als Nähr- und Mineralstoffträger, sind die Funktion und das Verhalten von Caseinen, insbesondere das der Caseinmizellen, seit langem Gegenstand der Forschung. Eine endgültige Aussage bezüglich des Aufbaus und der Struktur dieser Caseinmizellen konnte trotz intensiver Bemühungen zum bisherigen Zeitpunkt jedoch noch nicht getroffen werden. Es existieren allerdings zahlreiche Modelle, die versuchen, die bisherigen Erkenntnisse in sich zu vereinigen.

Eine Möglichkeit, tieferen Einblick in die Bildung und Organisation der Mizellen zu erhalten, stellt die Hochdrucktechnologie dar. Neben der schonenden Abtötung von Mikroorganismen bei moderaten Temperaturen und gleichzeitigem Erhalt wichtiger Inhaltsstoffe ist vor allem die strukturelle Modifikation von Proteinen bzw. proteinbasierter Texturen ein interessantes Anwendungsfeld.

Mit der Applikation hoher Drücke lassen sich strukturelevante, nicht-kovalente Wechselwirkungen beeinflussen, d.h. lösen oder neu knüpfen. So können in Proteinen und Proteinaggregaten wie Caseinmizellen Zustände erzeugt werden, wie sie unter atmosphärischen Bedingungen beispielsweise nur durch den Einsatz strukturbrechender Chemikalien wie Harnstoff realisiert werden können. Für Caseinmizellen bedeutet das, dass durch die Wahl geeigneter Druck- und Temperatur-Parameter ohne den Einsatz solcher Chemikalien eine reversible oder irreversible Dissoziation, also ein Aufbruch der Mizellstruktur, erreicht werden kann. Wie beispielsweise Gebhardt et al. (2006) zeigen konnten, dissoziiert die Caseinmizelle ab einem Druck von etwa 50 MPa. Bis zu einem Druck von 250 MPa ist dies ein reversibler Prozess, die Mizellen kehren nach der Hochdruckbehandlung wieder in einen Zustand ähnlicher Größenordnung zurück. Bei Drücken über 250 MPa ist die Mizelldissoziation irreversibel. Doch vor allem die Ermittlung der Zusammensetzung der Zerfallsprodukte, das Verhalten einzelner Caseinfraktionen bei der Dissoziation oder aber auch die Erfassung der Vorgänge und Mechanismen bei der Reassozi­ation und deren Beschreibung im Bezug auf entsprechende Mizellmodelle gestalten sich mitunter schwierig.

In einem neuen Ansatz werden in dieser Arbeit einerseits die Vorgänge bei der Mizelldissoziation aber auch die Rolle von κ -Casein bei der Mizellrückbildung näher untersucht. Durch die Kombination

einer Hochdruckbehandlung mit unter Druck diffusiv betriebenen Keramikmembranen sollen im ersten Teil zunächst die Vorgänge und das Verhalten der einzelnen Caseinfraktionen während der Kompression und der anschließenden Druckhaltezeit ermittelt und dargelegt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird dann der Fokus auf die Vorgänge bei der Mizellreassoziaton gelegt. Vor allem die Rolle des κ -Caseins soll in diesem Zusammenhang näher beleuchtet werden. Dazu wird die Hochdruckbehandlung bei bis zu 200 MPa und damit in dem Bereich, der zu einer reversiblen Mizelldissoziaton führt, mit einer enzymatischen Spaltung des Zielproteins durch Chymosin kombiniert und die Auswirkung auf die Partikelreassoziaton untersucht. Die detaillierte Erläuterung der Zielsetzung mit den zugrunde gelegten Hypothesen erfolgt abgeleitet aus dem Stand des Wissens an späterer Stelle (Abschnitt 4). Zuvor werden die allgemeinen Grundlagen sowie der aktuelle Stand des Wissens näher ausgeführt.

2 Grundlagen

2.1 Methoden zur Erzeugung hohen hydrostatischen Druckes

Bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln kommen hydrostatische Drücke zwischen 100 und 1000 MPa zur Anwendung. Generell können zwei Arten zur Erzeugung derartiger Behandlungsdrücke unterschieden werden:

Bei der thermischen Druckerzeugung wird die Druckerhöhung durch die Erwärmung eines isochoren Systems realisiert: bei konstanter Masse und Volumen sowie bei gleich bleibendem komprimiertem Medium bewirkt die Erwärmung den entsprechenden Druckanstieg. Aufgrund der mitunter gravierenden negativen Auswirkungen der benötigten hohen Temperaturen findet diese Art der Druckerzeugung im Lebensmittelsektor allerdings keine Anwendung und ist eher in der chemischen Industrie anzusiedeln (Hinrichs, 2000).

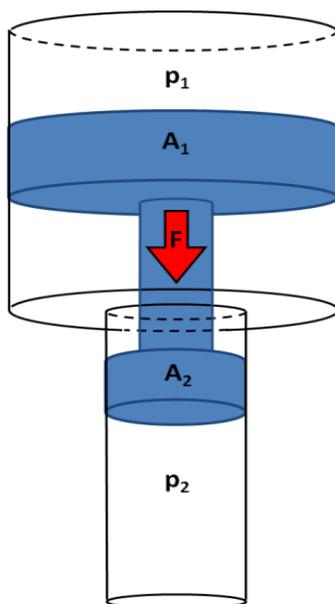


Abb 2.1: Aufbau und Funktion eines Druckübersetzers

Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, den Druck mechanisch zu erzeugen. Dabei wird das spezifische Volumen einer entsprechenden Drucküberträgerflüssigkeit, im Normalfall Wasser, in einem druckfesten Behälter reduziert (Werner, 2007). Dies ist im Bezug auf den Probenraum intern (unmittelbar) oder extern (mittelbar) möglich. Bei beiden Verfahren wird die Druckübersetzung angewendet. Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Aufbau eines Druckübersetzers. Bei der Druckübersetzung wird ein niedriger Druck p_1 auf einer großen Fläche A_1 in Hochdruck p_2 auf kleiner Übersetzerfläche A_2 transformiert: Entlang der Verbindung zwischen den beiden Flächen am Hubkolben herrscht eine konstante Kraft F . Diese Kraft ergibt sich aus dem Produkt von Druck p und druckbeaufschlagter Fläche A . Somit kann der Niederdruck gemäß dem Zusammenhang $p_2 = p_1 \cdot \frac{A_1}{A_2}$ transfor-

miert werden. Der erreichbare Druck ist demnach vom Druck p_1 auf der Niederdruckseite, vom Übersetzungsverhältnis $\frac{A_1}{A_2}$ im Druckübersetzer und letztendlich auch vom Volumen auf der Hochdruckseite abhängig (Fischer, 2005).

Bei der internen Druckerzeugung ist der Druckübersetzer in den Autoklaven integriert. Bei der Kompression wird der Kolben in den Probenraum geschoben und so das Volumen reduziert. So gestaltete Hochdruckanlagen benötigen weniger Platz und weisen ein im Verhältnis geringeres zu verdichten-

des Volumen auf. Somit sind sehr hohe Kompressionsraten realisierbar und es werden im Hochdruckbereich keine Verbindungsstellen oder Rohrleitungen benötigt. Die Schwächen dieser Art von Druckerzeugung liegen in erster Linie in den gleitenden Dichtungen zwischen Hubkolben und Behälterwand und der eingeschränkten Kompensationsfähigkeit kleinerer Undichtigkeiten während der Produktbehandlung. Zusätzlich reduziert sich bei der Kompression das verfügbare Behältervolumen, was bei der Beladung der Anlage beachtet werden muss.

Bei der externen Druckerzeugung sind Druckübersetzer und Autoklav baulich voneinander getrennt und über Hochdruckrohrleitungen miteinander verbunden. Der Probenraum und die beweglichen Teile des Druckübersetzers sind so voneinander entkoppelt. Der Druck wird durch das Einpressen zusätzlicher Drucküberträgerflüssigkeit vom Druckübersetzer in das konstant bleibende Behältervolumen erreicht. Die Verschlüsse am Autoklaven sind statisch, was deren Dichtigkeit erhöht. Zwar ist das zu verdichtende Volumen verhältnismäßig groß, es erlaubt aber eine bessere Kompensation kleinerer Undichtigkeiten. Auch die Möglichkeit der räumlichen Trennung des Niederdruckbereichs mit den Hydraulikaggregaten vom produktbehafteten Hochdruckbereich, der besonderen hygienischen Anforderungen genügen muss, macht diese Art der Anlagengestaltung besonders interessant für industrielle Applikationen. Allerdings sind so nur flachere Druckrampen realisierbar, da die druckbedingte Viskositätserhöhung in der Überträgerflüssigkeit deren Pumpfähigkeit durch die Hochdruckrohrleitungen beeinträchtigen kann.

Industrielle Hochdruckanlagen weisen heutzutage Druckbehältervolumina zwischen 35 und 420 L auf, wobei die Druckerzeugung extern in zwei bis acht dafür ausgelegten hydraulischen Hochdruckpumpen erfolgt. Die maximalen Arbeitsdrücke liegen je nach Behälterbauart zwischen 600 und

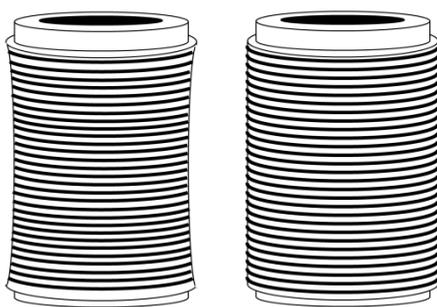


Abb 2.2: Druckbehälter unter Eigenzugspannung im drucklosen Zustand (links) und unter Innendruck (rechts) nach Torres & Velazquez (2005)

700 MPa. Mit zunehmenden Behältervolumina und steigenden Prozessdrücken ergeben sich allerdings Probleme hinsichtlich der Belastbarkeit der verwendeten Stähle: Bei einem Betriebsdruck 100 MPa werden die Behälter einer entsprechenden mechanischen Beanspruchung von 1 t/cm^2 ausgesetzt. Die Spannungen in der unvermeidlich dicken Behälterwand nehmen bei gleichem Innendruck mit zunehmendem Behälterinnenradius überproportional zu (Läpple, 2006), weshalb die Druckbehälter für große Innenvolumina eher lang und dünn

($d_i \approx 500 \text{ mm}$) gestaltet werden. Zudem werden sie unter einer Eigenzugspannung gefertigt (siehe Abb. 2.2), die der durch den Druck entstehenden Tangentialspannung entgegen wirkt und so die

Festigkeit des Behälters erhöht. Beim so genannten „Wire-Winding“ wird beispielsweise ein nahtlos geschmiedeter Mantel mit einem Draht von hoher Zugfestigkeit umwickelt.

Bei kleinen Anlagenvolumina, wie beispielsweise bei Pilot- oder Laboranlagen können die Druckbehälter aufgrund der kostengünstigeren Fertigung noch in der Monoblockbauweise gestaltet werden. Um hier eine Eigenzugspannung in der Behälterwand aufzubauen und so die Dauerfestigkeit bei häufigen Lastwechseln zu gewährleisten, wird oft das Verfahren der Autofrettage angewendet. Dabei wird der Druckbehälter innen mit hohem Druck beaufschlagt. So wird die Fließgrenze des verarbeiteten Stahls überschritten. In den inneren Schichten der Druckbehälterwandung kommt es auf diesem Weg zu einer plastischen Deformation, was wiederum Eigenspannungen im Material induziert und so die Dauerfestigkeit erhöht (Greuling et al., 2006).

2.2 Thermodynamische Grundlagen für die Druckwirkung auf biologische Systeme

Im Folgenden werden in einer kurzen Einführung die thermodynamischen Zusammenhänge erläutert, die für ein grundlegendes Verständnis der Wirkung von Druck und Temperatur auf ein System notwendig sind. Die Thermodynamik befasst sich mit der quantitativen Erfassung chemischer Gleichgewichte und von Energieflüssen in Form von Wärme und Arbeit. Die Kenntnis thermodynamischer Größen, wie Entropie S , Enthalpie H oder innerer Energie U , erlaubt eine Aussage über die Lage der beobachteten Gleichgewichte und ob bestimmte chemische Reaktionen spontan bzw. freiwillig ablaufen oder nicht. Aus den thermodynamischen Gesetzen allein können jedoch keine Aussagen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Reaktion erhalten werden. Die hier zusammengestellten Gleichungen und Beziehungen sind hauptsächlich aus zwei Lehrbüchern (Atkins et al., 2001; Wedler, 2004) entnommen. Nur die von diesen Quellen abweichenden Zitate sind zusätzlich gekennzeichnet.

Um beurteilen zu können, ob ein Prozess freiwillig und spontan abläuft, wird meist die freie Enthalpie G , auch mit Gibbs-Energie bezeichnet, herangezogen. Sie ist über die Enthalpie H , die Temperatur T und die Entropie S innerhalb des betrachteten Systems definiert Gl. (1).

$$G = H - T \cdot S \quad (1)$$

Die Enthalpie gibt dabei Aufschluss über den energetischen Zustand des Systems, während die Entropie eine Maßzahl für die im System befindliche Ordnung darstellt. Erfolgt die Änderung der freien Enthalpie bei konstanter Temperatur, lässt sich Gl. (1) auch darstellen als:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2)$$

In differentieller Form, also für sehr kleine Änderungen der freien Enthalpie, lässt sich Gl. (2) auch schreiben als:

$$dG = dH - T \cdot dS - S \cdot dT \quad (3)$$

Die Enthalpie H in einem System lässt sich ebenfalls in differentieller Form darstellen:

$$dH = dU + p \cdot dV + V \cdot dp \quad (4)$$

Ferner gilt für die innere Energie in einem abgeschlossenen System unter Berücksichtigung der Entropie:

$$dU = T \cdot dS - p \cdot dV \quad (5)$$

Durch das Zusammenführen von Gl. (3), Gl. (4) und Gl. (5) ergibt sich ein differentieller Ausdruck für die Änderung der freien Enthalpie als Funktion des Druckes und der Temperatur:

$$dG = V \cdot dp - S \cdot dT \quad (6)$$

Für eine konstante Temperatur bzw. für einen konstanten Druck ergeben sich demnach folgende Beziehungen:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p = -S \quad (7)$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T = V \quad (8)$$

2.2.1 Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie

Gemäß des 2. Hauptsatzes der Thermodynamik sind spontan ablaufende Reaktionen durch einen Anstieg der Entropie gekennzeichnet. In Verbindung mit Gl. (7) wird ersichtlich, dass G mit steigender Temperatur (bei konstantem Druck) abnimmt. Diese Abnahme der freien Enthalpie ist umso ausgeprägter, je größer die Entropie im betrachteten System ist. Somit ist die freie Enthalpie von Gasen wesentlich stärker temperaturabhängig als beispielsweise die von Festkörpern oder Flüssigkeiten.

Das Zusammenführen von Gl. (1) und Gl. (7) liefert für eine isobare Reaktion den Ausdruck:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p = \frac{G-H}{T} \text{ oder } \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p - \frac{G}{T} = -\frac{H}{T} \quad (9)$$

$$\left[\left(\frac{\partial G}{\partial T} \right)_p - \frac{G}{T} \right] \text{ kann ersetzt werden durch } \left[\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{G}{T} \right) \right)_p \cdot T \right] \quad (10)$$

Damit lässt sich Gl. (9) darstellen als:

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{G}{T} \right) \right)_p = - \frac{H}{T^2} \quad (11)$$

Gl. (11) wird Gibbs-Helmholtz-Gleichung genannt. Mit diesem formellen Zusammenhang ist also bei gegebener Systementhalpie die Temperaturabhängigkeit von $\frac{G}{T}$ bekannt. Damit wird deutlich, dass die Änderung der Enthalpie $\Delta H = H_E - H_A$ eines Systems zwischen den Anfangszustand A und dem Endzustand E einer Reaktion direkten Einfluss auf die freie Enthalpie hat:

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{\Delta G}{T} \right) \right)_p = - \frac{\Delta H}{T^2} \quad (12)$$

2.2.2 Druckabhängigkeit der freien Enthalpie

Soll die freie Enthalpie ausgehend von einem Referenzdruck p_A bei einem bestimmten Druck p_E berechnet werden (die Temperatur soll konstant bleiben, also $\Delta T = 0$), muss Gl. (6) entsprechend integriert werden:

$$G(p_E) = G(p_A) + \int_{p_A}^{p_E} V dp \quad (13)$$

Bei sehr kleinen Druckänderungen ist die Freie Enthalpie von Flüssigkeiten oder Festkörpern nahezu druckunabhängig, sodass in guter Näherung gilt: $G(p_E) = G(p_A)$. Für Gase oder bei der Betrachtung chemischer Reaktion unter hohem hydrostatischem Druck kann nicht mit dieser Vereinfachung gearbeitet werden, da sich das Volumen mit dem Druck ändert.

Für ein ideales Gas kann in Verbindung mit der idealen Gasgleichung Gl. (13) umgeformt werden zu:

$$G(p_E) = G(p_A) + n \cdot R \cdot T \int_{p_A}^{p_E} \left(\frac{1}{p} \right) dp = G(p_A) + n \cdot R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{p_E}{p_A} \right) \quad (14)$$

Dabei ist n die Stoffmenge und R die universelle Gaskonstante. Wird jetzt die freie Enthalpie bei einem beliebigen Druck p auf den Standardzustand bei 0,1 MPa und 25 °C (Index θ) bezogen, folgt daraus für ein Mol ($n = 1$) eines Stoffes:

$$G_m(p) = G_m^\theta + R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{p}{p^\theta} \right) \quad (15)$$

Eng mit der Größe der freien Enthalpie verknüpft ist das chemische Potential eines Stoffes. Es ist definiert über Gl. (16):

$$\mu = \left(\frac{\partial G}{\partial n} \right)_{p,T} \quad (16)$$

Das chemische Potential gibt demnach an, „wie sich die freie Enthalpie eines Systems bei Änderung seiner Zusammensetzung verhält“. Ein chemisches Potential $\mu > 0$ bedeutet also, dass die freie Enthalpie mit steigender Stoffmenge zunimmt. Bei der Betrachtung von Reinstoffen gilt $G = n \cdot G_m$. Damit gilt für das chemische Potential auch:

$$\mu = \left(\frac{\partial(nG_m)}{\partial n} \right)_{p,T} = G_m \quad (17)$$

Führt man nun Gl. (15) und Gl. (17) zusammen kann zur Druckabhängigkeit des chemischen Potentials bei einem idealen Gas analog geschrieben werden:

$$\mu(p) = \mu^\theta + R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{p}{p^\theta}\right) \quad (18)$$

2.2.3 Chemische Reaktionen und Gleichgewichte

Bei konstanter Temperatur und konstantem Druck laufen Prozesse freiwillig immer in Richtung kleinerer Werte der freien Enthalpie G des Systems ab. Betrachtet man nun beispielhaft den einfachen Fall einer chemischen Umsetzung des Stoffes A in den Stoff B ($A \rightleftharpoons B$), dann entspricht die Abnahme des Stoffes A (dn_A) der Zunahme des Stoffes B (dn_B). Führt man die Reaktionslaufzahl ξ ein, so dass für den Reinstoff A $\xi = 0$ bzw. bei der vollständigen Umsetzung von A in den Stoff B $\xi = 1$ gilt, kann für die Änderung der Stoffmengen $dn_A = -d\xi$ und $dn_B = d\xi$ geschrieben werden. In Verbindung mit der Definition der freien Enthalpie sowie des chemischen Potentials erhält man für konstante Temperaturen und Drücke den Ausdruck in Gl. (19).

$$dG = \mu_A \cdot dn_A + \mu_B \cdot dn_B = -\mu_A \cdot d\xi + \mu_B \cdot d\xi \quad (19)$$

Durch entsprechende Umformung erhält man einen Ausdruck für die Steigung der freien Enthalpie in Abhängigkeit der Reaktionslaufzahl (Gl. (20)).

$$\left(\frac{dG}{d\xi} \right)_{p,T} = \mu_B - \mu_A \quad (20)$$

Ob und in welche Richtung die Reaktion abläuft, hängt also von der Lage des Gleichgewichtes bezüglich der Reaktionslaufzahl sowie von der entsprechenden Differenz der chemischen Potentiale ab. Grafisch ist dieser Zusammenhang in Abb. 2.3 dargestellt.

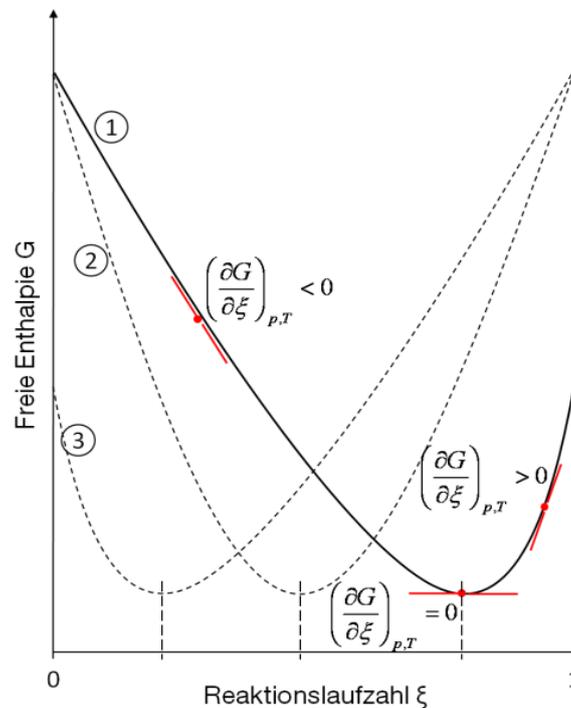


Abb. 2.3: Einfluss der chemischen Potentialdifferenz und der Gleichgewichtslage auf den Ablauf einer chemischen Reaktion (Darstellung nach Atkins et al., 2001, S. 256/257)

Im Fall (1) liegt das Gleichgewicht nahe der vollständigen Umsetzung von Edukt A in Produkt B (ξ für das Gleichgewicht ist fast 1). Solange also gilt $\left(\frac{dG}{d\xi}\right)_{p,T} < 0$ läuft die Reaktion $A \rightarrow B$ bis zum Erreichen des chemischen Gleichgewichts freiwillig ab. Liegt dagegen die reine Komponente B vor ($\xi = 1$), wird deutlich, dass nun $\left(\frac{dG}{d\xi}\right)_{p,T} > 0$ gilt. In diesem Fall läuft die „Rückreaktion“ $B \rightarrow A$ ab, und zwar wiederum solange, bis im System die Gleichgewichtszusammensetzung zwischen Komponente A und Komponente B erreicht ist, so dass $\left(\frac{dG}{d\xi}\right)_{p,T} = 0$ gilt. Für den Fall (2) liegt die Gleichgewichtszusammensetzung bei annähernd gleichen Konzentrationen der Stoffe A und B. Im Fall (3) ist aufgrund der Gleichgewichtslage nahe $\xi = 0$ kaum eine nennenswerte Umsetzung von $A \rightarrow B$ zu erwarten.

Die freie Reaktionsenthalpie $\Delta_R G$ der Reaktion $A \rightarrow B$ ist definiert als die Änderung der freien Enthalpie, die auftritt, wenn unter Verbrauch von 1 Mol des Stoffes A dieselbe Menge des Stoffes B gebildet wird, wobei die Zusammensetzung des Systems konstant bleibt. Mathematisch kann diese Definition Gl. (21) als Steigung der Funktion $G(\xi)$ gesehen werden.

$$\Delta_R G = \left(\frac{dG}{d\xi} \right)_{p,T} \quad (21)$$

Zum besseren Verständnis kann Gl. (21) auch vereinfacht als Differenz der freien Enthalpien zwischen Edukten und Produkten gedeutet werden. Chemische Reaktionen mit $\Delta_R G < 0$ werden auch als exergonisch oder „Arbeit abgebend“ bezeichnet. Im Fall von $\Delta_R G > 0$ spricht man von endergonischen oder „Arbeit verbrauchenden“ Reaktionen, also von Reaktionen die nicht freiwillig in eine entsprechende Richtung ablaufen. Befindet sich eine Reaktion im Gleichgewicht, wird sie in keine Richtung spontan weiterlaufen. Sie ist dann weder exer- noch endergonisch.

Bei der Reaktion zweier idealer Gase A und B ergibt sich die freie Reaktionsenthalpie nach den o.g. Definitionen zu Gl. (22), wobei p_A und p_B für die Partialdrücke der reinen Gaskomponenten stehen.

$$\Delta_R G = \Delta_R G^\theta + R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{p_B}{p_A} \right) \quad (22)$$

Dieser Zusammenhang lässt sich auch auf Flüssigkeiten übertragen, wenn statt der Partialdrücke die Aktivitäten der vorliegenden Konzentrationen eingesetzt werden:

$$\Delta_R G = \Delta_R G^\theta + R \cdot T \cdot \ln(Q) \quad \text{mit} \quad Q = \left(\frac{a_B}{a_A} \right) \quad (23)$$

Im Fall des chemischen Gleichgewichts ist $\Delta_R G = 0$. In diesem Zusammenhang wird der Aktivitätenquotient Q als thermodynamische Gleichgewichtskonstante der Reaktion bezeichnet. Für eine kompliziertere Reaktionsabfolge der Form $\nu_A \cdot A + \nu_B \cdot B + \dots \rightleftharpoons \nu_C \cdot C + \nu_D \cdot D + \dots$ lässt sich K allgemein formulieren zu:

$$\Delta_R G^\theta = -R \cdot T \cdot \ln K \quad \text{mit} \quad K = \frac{a_C^{\nu_C} \cdot a_D^{\nu_D}}{a_A^{\nu_A} \cdot a_B^{\nu_B}} = \prod a_i^{\nu_i} \quad (24)$$

Mit ν_i wird der stöchiometrische Koeffizient der jeweiligen Komponente i bezeichnet. Die Aktivitäten der einzelnen Komponenten sind über den sogenannten Aktivitätskoeffizienten γ_i direkt proportional zu den jeweiligen Konzentrationen der Edukte bzw. Produkte. Für praktische Anwendungen ist es deshalb möglich, die vereinfachende Annahme $\gamma_i = 1$ zu treffen und die Gleichgewichtskonstante anhand der Konzentrationen zu berechnen.

Der Temperatureinfluss auf chemische Gleichgewichte

Schreibt man Gl. (24) als vollständiges Differential, so erhält man den Ausdruck von Gl. (25), der unmittelbar zur Formel für die Temperatur- und Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K führt:

$$R \cdot d \ln K = - \left(\frac{\partial \left(\frac{\Delta_R G^\theta}{T} \right)}{\partial T} \right)_p dT - \frac{1}{T} \cdot \left(\frac{\partial \Delta_R G^\theta}{\partial p} \right)_T dp \quad (25)$$

In Verbindung mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. (11)) kann Gl.25 für konstante Drücke bei der Reaktion zur Reaktionsisobare nach Van't Hoff (Gl. (26)) umgeformt werden.

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta_R H^\theta}{R \cdot T^2} \quad (26)$$

$\Delta_R H^\theta$ bezeichnet die *molare Standardreaktionsenthalpie*, nicht zu verwechseln mit der *freien molaren Standardreaktionsenthalpie* $\Delta_R G^\theta$. Da für endotherme Reaktionen $\Delta_R H^\theta > 0$ ist, folgt aus Gl. (26), dass eine isobare Temperaturerhöhung bei endothermen Reaktionen zu größeren Werten von K führt. Das Gleichgewicht verschiebt sich also in Richtung der Reaktionsprodukte.

Der Druckeinfluss auf chemische Gleichgewichte

Geht man nun von isothermen Reaktionsbedingungen aus, so lässt sich aus Gl. (25) in Verbindung mit Gl. (8) die Van't Hoff'sche Reaktionsisotherme (Gl. (27)), ein formeller Zusammenhang zur Ermittlung des Druckeinflusses auf chemische Gleichgewichte, ableiten:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta_R V^\theta}{R \cdot T} \quad (27)$$

$\Delta_R V^\theta$ beschreibt dabei das molare Standardreaktionsvolumen. Es setzt sich additiv zusammen aus intramolekularen Volumenveränderungen ($\Delta_R V_{intr}$) und Volumenfluktuationen bedingt durch veränderte Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel ($\Delta_R V_{solv}$). Unter der Annahme eines konstanten Reaktionsvolumens für den gesamten betrachteten Druckbereich kann Gl. (27) auch geschrieben werden als:

$$\Delta \ln K = - \frac{\Delta_R V^\theta}{R \cdot T} \cdot \Delta p \quad (28)$$

Wird durch eine chemische Reaktion das Volumen im Reaktionsgemisch reduziert, folgt, dass durch eine Druckerhöhung auch hier das Gleichgewicht zugunsten der Reaktionsprodukte verschoben wird. Beide Betrachtungen verdeutlichen anschaulich das von Braun und LeChatelier formulierte chemische Grundprinzip des kleinsten Zwangs:

„Übt man auf ein System im Gleichgewicht [beispielsweise durch Veränderung der Zustandsvariablen p oder T] eine Störung aus, reagiert das System so, dass die Wirkung dieser Störung möglichst gering ist.“

Oder, spezifisch für die molekulare Wirkung des Druckes formuliert: Unter Druck werden Reaktionen, die mit einer Volumenreduktion oder der Reduktion der Molzahl verbunden sind, bevorzugt ablaufen, während volumenvergrößernde Reaktionen gehemmt werden.

2.2.4 Kinetische Aspekte

Die treibende Kraft einer chemischen Reaktion ist also die freie Enthalpie G bzw. deren Änderung ΔG . Bei Reaktionen unter Druck ist aber nicht nur die Frage von Bedeutung ob eine Reaktion abläuft oder nicht. Vielmehr interessiert auch die Frage wie schnell eine Reaktion abläuft bzw. wie schnell sich entsprechend ein neues Gleichgewicht im betrachteten System einstellt.

Die Kinetik beschreibt die Geschwindigkeit einer Reaktion unter Beobachtung der zeitlichen Konzentrationsänderungen der beteiligten Reaktionspartner. Eine Abbaureaktion kann demnach in der Form von Gl. (29) formuliert werden. Die Formulierung einer Bildungsreaktion erfolgt analog mit umgekehrtem Vorzeichen.

$$v = \frac{dC}{dt} = -k_{p,T} \cdot C^n \quad (29)$$

Dabei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit, C die Konzentration des abgebauten Stoffes, t die Reaktionszeit und $k_{p,T}$ die druck- und temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Der Exponent n oder die Ordnung der Reaktion beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktanden bei der Umsetzung. Bei $n = 0$ ist die Reaktionsgeschwindigkeit konzentrationsunabhängig, bei $n = 1$ ist proportional zur Konzentration der Reaktionspartner. Für komplexe Reaktionen kann n aber auch negative oder gebrochene Werte annehmen (Kessler, 1996). Durch Integration kann Gl. (29) allgemein umgeformt werden zu:

$$\frac{C_t}{C_0} = [1 + (n - 1) \cdot k_{p,T} \cdot t]^{\frac{1}{1-n}} \quad (30)$$

Für den Fall einer Reaktion 1. Ordnung ($n = 1$) ist Gl. (30) nicht definiert. Für diesen Sonderfall gilt für den Abbau Gl. (31) bzw. für eine Bildung oder Freisetzung Gl. (32):

$$\frac{C_t}{C_0} = e^{(-k_{p,T} \cdot t)} \quad (31)$$

$$1 - \frac{c_t}{c_0} = e^{(-k_{p,T} \cdot t)} \quad (32)$$

Das Zusammenführen der thermodynamischen Gleichgewichtsbetrachtungen und der kinetischen Grundlagen kann über die Theorie des aktivierten Komplexes (Eyring, 1935) erfolgen. Dabei wird davon ausgegangen, dass bei einer einfachen Umsetzung des Stoffes A in das Produkt B die Reaktion über einen Zwischenzustand, dem aktivierten Komplex $A^\#$ abläuft (Gl. (33)).



A und $A^\#$ stehen über die Gleichgewichtskonstante $K^\# = \frac{[A^\#]}{[A]}$ im Gleichgewicht. Für die Gleichgewichtskonstante $K^\#$ ergibt sich im Zusammenhang mit der freien Reaktionsenthalpie $\Delta_R G$ nach Gl. (24) die Beziehung in Gl. (34).

$$K^\# = e^{\left(\frac{-\Delta_R G^\#}{R \cdot T}\right)} \quad (34)$$

Hier ist $\Delta_R G^\#$ die freie Reaktionsenthalpie bei der Bildung des aktivierten Komplexes. Darüber hinaus wird angenommen, dass die druck- und temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_{p,T}$ direkt proportional zur Konzentration des aktivierten Komplexes $[A^\#]$ ist und damit auch mit $K^\#$ zusammenhängt. Aus diesem Zusammenhang ergeben sich dann die von Arrhenius und Eyring formulierten Zusammenhänge für die reine Temperatur- (Gl. (35)) bzw. reine Druckabhängigkeit (Gl. (36)) von $k_{p,T}$ jeweils zu:

$$k_{p,T} = k_0 \cdot e^{\left(\frac{-E_A}{R \cdot T}\right)} \quad (35)$$

$$k_{p,T} = k_{0,T} \cdot e^{\left(\frac{-\Delta V^\#}{R \cdot T} \cdot p\right)} \quad (36)$$

Dabei sind k_0 und $k_{0,T}$ Faktoren, die für jede Reaktion zu bestimmen sind. E_A bezeichnet die Aktivierungsenergie und $\Delta V^\#$ analog dazu das Aktivierungsvolumen. Aus diesen Zusammenhängen wird ersichtlich, dass sich im Falle thermisch beeinflusster Reaktionen hohe Aktivierungsenergien oder bei druckbeeinflussten Reaktionen positive Reaktionsvolumina verlangsamernd auswirken, indem sie $k_{p,T}$ verkleinern. Katalysatoren oder Enzyme, die die Aktivierungsenergie dagegen herabsetzen, wirken ebenso wie negative Reaktionsvolumina beschleunigend auf eine Reaktion.

2.3 Druckwirkung auf Bindungen und intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen in biologischen Systemen

Wie bereits beschrieben, wirkt sich Druck auf ein System dahingehend aus, dass volumenreduzierende Reaktionen gefördert werden (Siehe Gl. (27) und Gl. (28)). In wieweit strukturelle Veränderungen in Proteinen oder Proteinkomplexen das Systemvolumen beeinflussen und damit druckabhängig sind, hängt von spezifischen molekularen Wechselwirkungen ab (Mozhaev et al., 1996; Boonyaratanakornkit et al., 2002; Balny, 2004). Abb. 2.4 gibt schematisch einen Überblick über mögliche strukturbestimmende intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise an der spezifischen Faltung von Proteinen oder bei der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt sind.

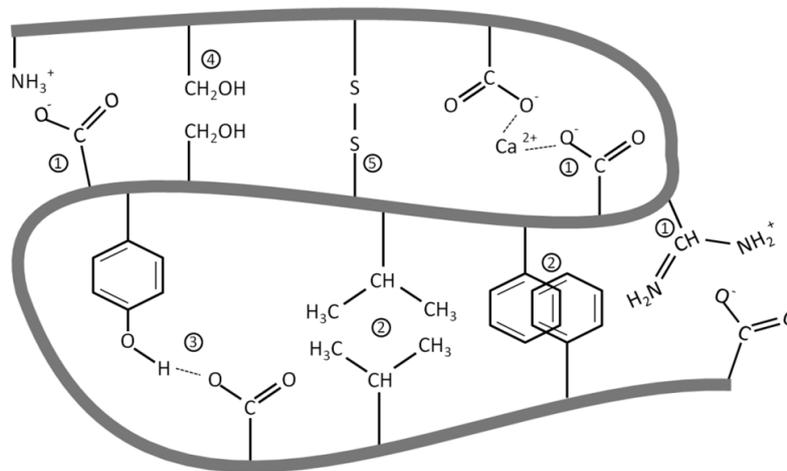


Abb. 2.4: Schematische Zusammenstellung möglicher Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins: (1) ionische Wechselwirkungen, (2) hydrophobe Wechselwirkungen, (3) Wasserstoffbrücken, (4) Van-der-Waals-Wechselwirkungen, (5) Disulfidbrücken (Darstellung nach Visser, 1992)

Die Struktur oder Konformation eines Proteins ist in unterschiedlichen Ebenen organisiert. Als Primärstruktur wird die Aminosäuresequenz des Polypeptids bezeichnet. Durch eine Kondensationsreaktion der Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer Anderen werden die Moleküle unter der Abspaltung eines Wassermoleküls kovalent miteinander verknüpft. Diese kovalenten Bindungen, sind äußerst druckstabil. Sie weisen Bindungsenergien von etwa 300 bis 400 kJ/mol auf (Belitz et al., 2008; Nelson, 2009) und sind bis zu Drücken von 1000 bis 1500 MPa inkompressibel (Mozhaev et al., 1996; Balny, 2004). Disulfidbrücken zählen ebenso zu den kovalenten Bindungen, weisen aber mit etwa 200 kJ/mol deutlich niedrigere Bindungsenergien auf (Messens et al., 1997). Sie entstehen durch oxidative Verknüpfung zweier Thiolgruppen. Bei der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion kann eine bestehende Disulfidbrücke unter Reaktion mit einer weiteren freien Thiolgruppe umgelagert werden, was auch unter Druck ablaufen kann (Masson, 1992 in Balny et al.,

1992; Jegouic et al., 1996) und beispielsweise bei der Stabilisierung druckinduzierter Molkenproteingele eine große Rolle spielt (Keim & Hinrichs, 2004). Die Disulfidbrücke ist demnach die einzige kovalente Bindung, die auch bei Drücken unter 1000 MPa gelöst bzw. dann neu geknüpft werden kann.

Die Sekundärstruktur beschreibt die lokale Konformation eines Teils eines Polypeptids. Die wichtigsten in fast allen Proteinen zu findenden sekundärstrukturellen Konformationen sind die α -Helix und das β -Faltblatt (Nelson, 2009). Bei der Stabilisierung dieser Strukturmerkmale sind in erster Linie intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten der AS beteiligt.

Wasserstoffbrücken werden zwischen elektronegativen Atomen mit mindestens einem freien Elektronenpaar und einem Wasserstoffatom ausgebildet, das kovalent an ein weiteres elektronegatives Atom gebunden ist (Desiraju, 2011). Die Bindungsenergien liegen zwischen 8 und 40 kJ/mol, während die Reaktionsvolumina bei der Bindungsknüpfung zwischen +1 und -3 ml/mol liegen (Messens et al., 1997). Diese meist kleine Volumenreduktion liegt in einer Abstandsverkleinerung zwischen den an der Bindung beteiligten Molekülen begründet und zeigt, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken unter Druck je nach Molekül gefördert wird. Dadurch entstehende Fluktuationen in der Proteinkonformation sowie eine verstärkte Anlagerungsneigung von Wassermolekülen an geeignete AS-Seitenketten ermöglichen das Eindringen von Wasser in gefaltete Proteine, was die erste Stufe der druckbedingten Proteindenaturierung darstellen kann (Heremans, 1982; Boonyaratanakornkit et al., 2002).

Mit Tertiärstruktur wird die gesamte räumliche Anordnung aller Atome innerhalb des Proteins bezeichnet. Während die Sekundärstruktur nur die räumliche Anordnung von AS erfasst, die aufgrund ihrer Sequenzabfolge in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander stehen, finden in der Tertiärstruktur Interaktionen Berücksichtigung, die über weite Abschnitte des Polypeptidrückgrates erfolgen. Besteht ein Protein aus mehreren separaten Polypeptidketten, so wird die räumliche Anordnung dieser Untereinheiten zueinander mit Quartärstruktur bezeichnet (Nelson, 2009). Neben Wasserstoff- und Disulfidbrücken sind an der Stabilisierung der höheren Strukturebenen eines Proteins v.a. die nicht kovalenten ionischen oder elektrostatischen Wechselwirkungen, hydrophobe Interaktionen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beteiligt.

Gegensätzlich geladene Ionen ziehen sich aufgrund ionischer oder elektrostatischer Wechselwirkungen an. Mit einer Bindungsenergie von etwa 40 bis 80 kJ/mol besitzen diese nicht kovalenten Wechselwirkungen eine vergleichsweise hohe Bindungsenergie. Neben der Ladung der beteiligten Bindungspartner wird die anziehende Kraft zwischen den Ladungsträgern von deren Entfernung und von der relativen Permittivität (ϵ_r) der Umgebung beeinflusst. Im Vergleich zu Wasser ($\epsilon_r = 78$) ist die Anziehung zwischen zwei Ionen oder ionischen Gruppen innerhalb eines Proteins ($\epsilon_r = 1$ bis 5)

deutlich erhöht (Visser, 1992; Gebhardt, 2005). Dissoziiert ein Ionenpaar in wässriger Lösung führt dies zur so genannten Elektrostriktion. Dabei werden die Wasserdipole in unmittelbarer Nähe zu den Ionen aufgrund des Coulomb'schen Feldes ausgerichtet und verursachen so eine Volumenkontraktion. Insgesamt bewegen sich die beobachteten Reaktionsvolumina im Bereich von -20 bis -30 ml/mol (Gross & Jaenicke, 1994; Mozhaev et al., 1996; Boonyaratanakornkit et al., 2002). Dieses Phänomen ist eng mit dem Problem der Aufrechterhaltung konstanter pH-Bedingungen unter Druck verknüpft, da Wasser und viele biologische Puffersubstanzen, wie Phosphat, hohe Ionisierungsvolumina aufweisen. Niedrige Ionisierungsvolumina und damit eine erhöhte Druckstabilität werden dagegen bei Tris-HCl- oder Tris-Imidazol-Puffern beobachtet (Lown et al., 1968; Gross & Jaenicke, 1994; Quinlan & Reinhart, 2005).

Hydrophobe Wechselwirkungen resultieren weniger aus einer direkten Anziehung zwischen apolaren Molekülen als vielmehr aus einer Entropieabnahme bei der Hydratisierung eines hydrophoben Moleküls. Die Wassermoleküle nehmen dabei hoch geordnete Strukturen (Clathrate) an (Nelson, 2009). Für ein System ist es deshalb thermodynamisch günstiger die an die Wasserphase exponierten hydrophoben Molekülbereiche zu minimieren. Hydrophobe Moleküle tendieren also dazu, sich zusammen zu lagern, um die effektive wasserberührte Oberfläche und damit die Größe der geordneten Wasserkäfige zu verkleinern (Mozhaev et al., 1996). Die Wechselwirkungsenergie beträgt in diesem Fall 4 bis 12 kJ/mol, bei Reaktionsvolumina zwischen 1 und 20 ml/mol, abhängig vom betrachteten System (Balny, 2004). Eine Sonderstellung nehmen die Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringsystemen ein. Hier wurden negative Reaktionsvolumina bei der Zusammenlagerung hydrophober Moleküle beobachtet, was eine Druckstabilisierung dieser besonderen Art hydrophober Wechselwirkungen bedingt (Sawamura et al., 1989).

Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind schwache, interatomare Anziehungskräfte. Die Bindungsenergie liegt zwischen 1 und 9 kJ/mol (Messens et al., 1997; Nelson, 2009). Die Anziehungskräfte resultieren aus fluktuierenden Dipolen, die in der Elektronenbewegung um einen Atomkern begründet sind (Visser, 1992): Nähern sich zwei ungeladene Moleküle einander an, beeinflussen sich die benachbarten Elektronenwolken. Das momentane Dipolmoment eines Moleküls bewirkt eine Verschiebung der Elektronenwolke im anderen Molekül und induziert somit dort ebenfalls ein Dipolmoment (Nelson, 2009). Erst bei sehr geringen Molekülabständen stoßen sich die Moleküle aufgrund der Überlappung der Elektronenwolken ab. Einerseits wird durch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen die Packungsdichte im hydrophoben Kern eines Proteins erhöht (Gross & Jaenicke, 1994), was darauf hindeutet, dass diese Bindungen volumenreduzierend wirken und somit unter Druck eher stabilisiert werden sollten.

Andererseits können Van-der-Waals-Kräfte auch zur Proteinstabilisierung unter Druck beitragen: Druck unter 300 MPa kann die Dissoziation von Oligomeren fördern, indem die schwächsten, nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen den AS-Seitenketten zugunsten von Wasser-AS-Wechselwirkungen aufgebrochen werden, weil diese Art der Wechselwirkung eine stärkere Volumenkontraktion nach sich ziehen (Mozhaev et al., 1996; Boonyaratanakornkit et al., 2002).

Eine zusammenfassende Darstellung möglicher Mechanismen bei der Druckdissoziation und Druckdenaturierung komplexer Proteine in Lösung gibt Abb. 2.5 (nach Boonyaratanakornkit et al., 2002).

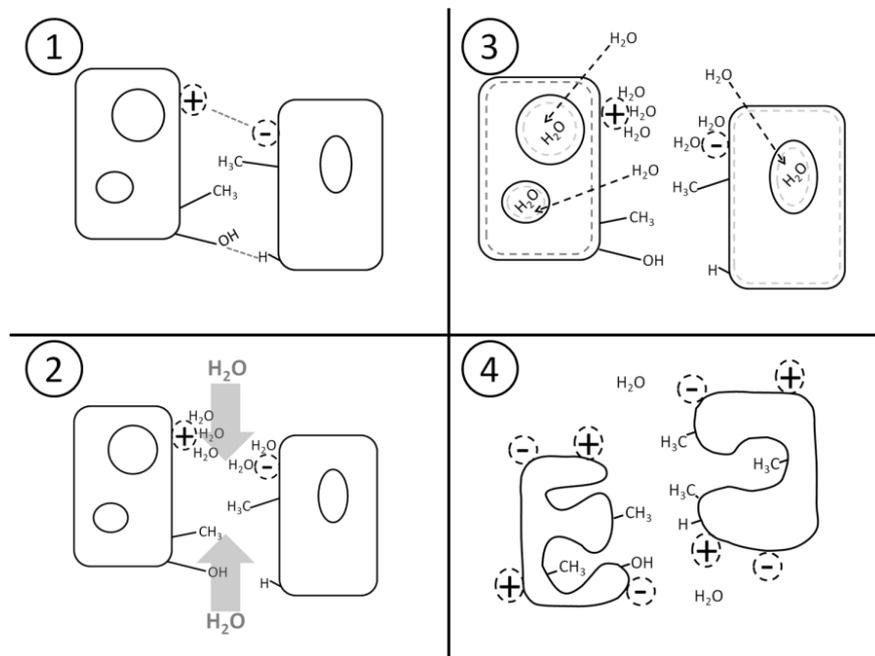


Abb. 2.5: Grafische Darstellung der Effekte bei der druckinduzierten Denaturierung eines oligomeren Proteins nach Boonyaratanakornkit et al., (2002), bei (1) 0,1 MPa, (2) 50 bis 200 MPa, (3) 500 MPa und (4) 500 bis 1000 MPa

Vereinfacht dargestellt ist ein Protein, das aus zwei nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten aufgebaut ist. In (1) ist der Ausgangszustand des nativen Proteins in Lösung vor der Druckbeaufschlagung zu sehen. Bereits bei für die Lebensmittelbehandlung moderaten Drücken zwischen 50 und etwa 200 MPa (2) kommt es zu einer Dissoziation der nicht kovalent verknüpften Untereinheiten: Aufgrund der Elektrostriktion werden Salzbrücken gelockert und hydrophobe Wechselwirkungen werden, sofern sie nicht zwischen aromatischen Ringsystemen vorliegen, aufgebrochen. Bei Drücken von rund 500 MPa (3) kommt es zu deutlichen Fluktuationen in der Konformation der dissoziierten Untereinheiten. Beispielsweise könnten verstärkt Wasserstoffbrücken zwischen AS-Seitenketten und Wassermolekülen aus dem Lösungsmittel ausgebildet werden.

Auf diese Weise kann Wasser verstärkt in den hydrophoben Kern des Proteins eindringen, was zu einer Schwellung des Proteins führt. Im Druckbereich zwischen 500 und 1000 MPa (4) ist ein deutlicher Verlust an tertiärstrukturellen Merkmalen zu erkennen und das Protein geht unter dem Aufbrechen interner Kavitäten in den „Molten-Globule“-Zustand über.

2.4 Milch und ihre Bestandteile

Per Definition versteht man unter Milch das flüssige Sekret der Milchdrüsen von Säugetieren (Farrell et al., 2004). Als Milch wird im allgemeinen Sprachgebrauch Kuhmilch bezeichnet. Stammt die Milch von einem anderen Säugetier, so wird die jeweilige Tierart mit genannt. Die Zusammensetzung von Kuhmilch (im Folgenden nur noch mit Milch bezeichnet) ist in Tabelle 2.1 angegeben.

Tab. 2.1: Zusammensetzung von 1 kg Milch nach Töpel (2004)

| Bestandteile | Masse pro kg Milch |
|--|---------------------------|
| Anorganische Bestandteile | |
| Wasser | 860 – 880 g |
| <i>Kationen:</i> | |
| Calcium Ca ²⁺ | 1,25 g |
| Magnesium Mg ²⁺ | 0,10 g |
| Natrium Na ⁺ | 0,50 g |
| Kalium K ⁺ | 1,50 g |
| <i>Anionen:</i> | |
| Chlorid Cl ⁻ | 1,10 g |
| Sulfat SO ₄ ²⁻ | 0,10 g |
| Hydrogencarbonat HCO ₃ ⁻ | 0,20 g |
| Phosphat PO ₄ ³⁻ (einschl. H ₂ PO ₄ ⁻ und HPO ₄ ²⁻) | 2,10 g |
| Organische Bestandteile | |
| Lipide | 30 – 45 g |
| Proteine | 30 – 35 g |
| Kohlenhydrate | 47 – 48 g |

Aus der Aufstellung wird deutlich, dass Milch ein korpuskular polydisperses System ist:

- Sie enthält Fett, das in Form von Fettkügelchen emulgiert ist. Die Größe der Fettkugeln variiert zwischen etwa 10 nm und 10 µm. Der mittlere Durchmesser liegt bei etwa 3 bis 6 µm.

Das Milchfett ist ein komplexes Gemisch aus mehreren Lipidkomponenten, von denen Triglyceride 97 bis 98 % ausmachen. Daneben finden sich in dieser Fraktion Lipoide, also fettähnliche Stoffe wie Phospholipide, Glycolipide oder Wachse, Isoprenoidlipide, wie Steroide und Carotinoide und Fettbegleitstoffe, wie freie Fettsäuren, fettlösliche Vitamine, Lipoproteine oder fettlösliche Aromen.

- Des Weiteren ist Milch eine echte wässrige Lösung mineralischer Komponenten, wie Calcium oder Phosphat, und Kohlenhydraten, wie Lactose, Galactose oder Sialinsäure.
- Die Proteinkomponenten der Milch, also Caseine und Serumproteine, liegen als kolloidal dispergierte Komplexe im wässrigen Milieu der Milch (Serum) vor.

2.4.1 Gelöste Salzbestandteile der Milch

Die Salzbestandteile in Milch liegen in unterschiedlichen Löslichkeitsformen und Bindungsverhältnissen vor. Anhand von Calcium lassen sich die vielfältigen Erscheinungsformen sehr anschaulich verdeutlichen. So kann es als freies Ion (Ca^{2+}), als gelöster Ionenverband ($\text{Ca}^{2+}\text{HPO}_4^{2-}$), als gelöster Salzkomplex (Ca-Citrat), als kolloidal gelöster Komplex ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x$), an ein Makromolekül gebunden (Ca-Caseinat) oder als bindender Bestandteil der Caseinmizelle ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ oder colloidales Calciumphosphat, CCP) vorliegen (Töpel, 2004). Die unterschiedlichen Erscheinungsformen eines Salzbestandteils stehen dabei in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander, weshalb oft auch von einem Salzsystem der Milch die Rede ist. Calcium nimmt im Bezug auf kolloidale Stabilität der Milch aufgrund seiner starken Interaktion mit den Caseinen und seiner zentralen Rolle am Struktur- aufbau der Caseinmizelle in Verbindung mit Phosphat eine herausragende Stellung unter den Milchs- salzen ein (siehe Kapitel 3.2).

Anhand der echt gelösten Salzbestandteile lässt sich die Ionenstärke in Milch bzw. im Milchserum anhand von Gl.37 näherungsweise berechnen. Dabei beschreiben c_i die Konzentration und z_i die Ladung des betrachteten Ions.

$$I_c = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i z_i^2 \quad (\text{Gl.37})$$

Unter der vereinfachenden Annahme, dass alles lösliche Phosphat als Dihydrogenphosphationen sowie dass Citrat als einwertiges Ion vorliegt, ergibt sich die Ionenstärke in Milch bzw. im Milchserum zu 0,086 M (Töpel, 2004).

2.4.2 Proteine in Milch

Eine detailliertere Aufstellung über die Proteinzusammensetzung in Kuhmilch ist in Abb. 2.6 zu sehen. Casein stellt mit einem Anteil von etwa 80 % am Gesamtprotein den majoren Teil der Milchproteine. Die Molkenproteine sind die zweitgrößte Proteinfraktion in Milch. Zu ihnen zählen neben β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin auch Serumalbumin und Immunoglobuline. Daneben sind auch noch zahlreiche milcheigene Enzyme, wie Plasmin oder Lactoperoxidase sowie andere minore Proteinkomponenten in Milch zu finden.

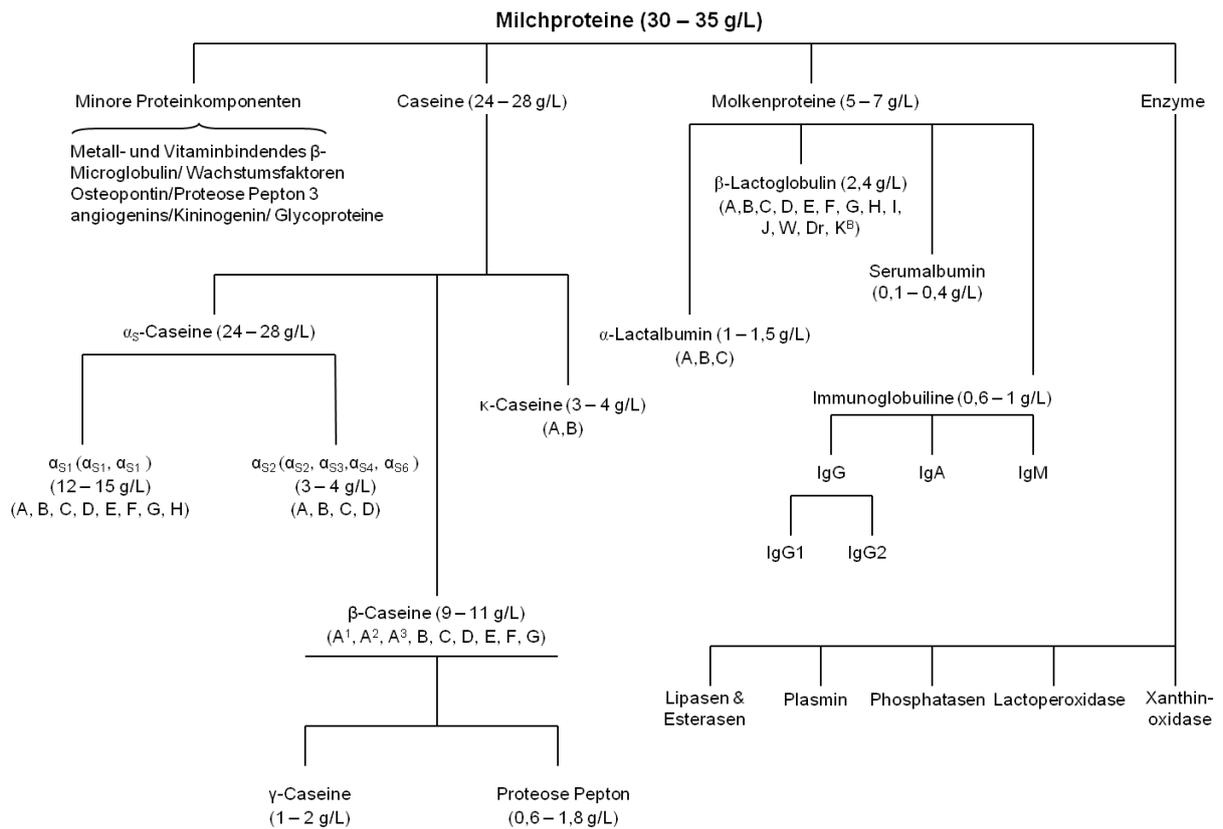


Abb. 2.6: Milchproteine im Überblick nach Swaisgood (2006)

Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf den Caseinen bzw. den von ihnen gebildeten Caseinmizellen, weshalb im Folgenden nicht weiter auf die Proteine der Molkenfraktion oder andere minore Proteinbestandteile sowie auf die Lipidfraktion der Milch eingegangen werden soll.

Klassisch wird mit Casein der Proteinanteil der Milch bezeichnet, der bei 20 °C durch Ansäuerung auf pH 4,6 ausgefällt wird (Fox & Brodkorb, 2008). Wie in Abb. 2.6 zu sehen, ergaben spätere elektrophoretische Untersuchungen, beispielsweise von Mellander im Jahr 1939 (Fox & Brodkorb, 2008), dass es sich bei Casein nicht um ein singuläres Protein handelt. Vielmehr umfasst der Begriff Casein eine ganze Familie von Phosphoproteinen.

Unterschieden werden können die Phosphoproteine α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein mit einer jeweils unterschiedlich hohen Anzahl genetischer Varianten. Die einzelnen Proteine der Caseinfraktionen werden im Folgenden eingehender beschrieben. Die Informationen stammen aus den Arbeiten und Büchern von Töpel (2004), Farrell et al. (2004) und Belitz et al. (2008). Caseine können nicht kristallisiert werden, was ihre Untersuchungen mit gängigen strukturanalytischen Techniken wie die Röntgenkristallographie erschwert. Man greift deshalb auf molekulardynamische Simulationsmethoden zurück, um bestimmte strukturelle Merkmale vorherzusagen oder auszuschließen. Diese Methoden beruhen auf der Kenntnis der AS-Sequenz sowie der Interaktionsmöglichkeiten über die freien Seitenketten. Weiterhin fließen geometrische Kenntnisse und energetische Barrieren aufgrund begrenzter Rotations- und Torsionsfähigkeit entlang des Polypeptidrückgrates mit in die Simulation ein. Die im Folgenden dargestellten Proteinstrukturen der einzelnen Caseine wurden vom „United States Department of Agriculture / Agricultural Research Center“ unter www.arserrc.gov/CaseinModels zum Download zur Verfügung gestellt und unter Verwendung der DeepView® Software grafisch aufgearbeitet.

α_{s1} -Casein

Bis zu 40 % der Proteine des Gesamtcaseins gehören zur Familie der α_{s1} -Caseine. Sie unterteilen sich in eine Major- und eine Minorfraktion, die beide die gleiche AS-Sequenz aufweisen und sich nur durch ihren Phosphorylierungsgrad unterscheiden: Die Minorkomponente enthält an Position 41 zusätzlich zur Phosphorylierung an den AS-Positionen 46, 48, 64, 66, 67, 68, 75, 115 einen Phosphatrest. Das Referenzprotein für diese Gruppe, z.B. zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten, ist das α_{s1} -CN B-8P. Mit einer Länge von 199 AS besitzt es ein Molekulargewicht von 23615 Da. Zusätzlich sind acht genetische Varianten von diesem Casein bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Identifikation mit den Buchstaben A bis H gekennzeichnet werden.

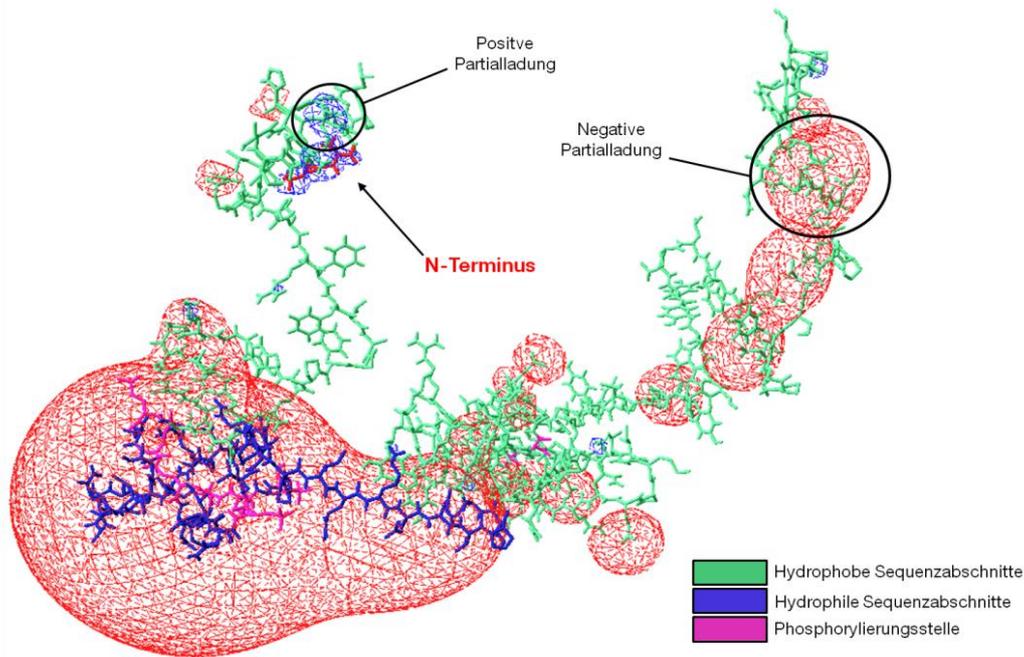


Abb. 2.7: Molekular-dynamisches Modell von α_{s1} -Casein. Die Equipotentialflächen sind auf $\pm \frac{3,3 \cdot k_B T}{e}$ skaliert

In der Primärstruktur können zwei, in Abb. 2.7 grün dargestellte, eher hydrophobe Domänen (AS 1 bis 44 und AS 90 bis 199) identifiziert werden. Diese sind durch eine polare Region (AS 45 bis 89, blau) getrennt, wo fast alle Phosphoserinreste (Magenta) lokalisiert sind. Diese Phosphoserinreste sind stark negativ geladen, was als ausgedehnte rote Equipotentialfläche zu sehen ist. In den hydrophoben Regionen des Proteins dagegen befinden sich alle Prolinreste. α_{s1} -Casein ist sehr Ca-sensitiv und präzipitiert schon bei einem Ca-Gehalt von 7 mM. Der theoretische Isoelektrische Punkt (pI) des α_{s1} -Caseins liegt nach ProtScale[®] bei pH 4,91. Töpel (2004) gibt ebenfalls Werte zwischen 4,4 und 4,8 für den pI dieser Caseinfraktion an.

Wird der molekulare Aufbau dieses Caseins unter dem Gesichtspunkt seiner Interaktionsmöglichkeiten z.B. mit anderen Caseinen betrachtet, kann festgehalten werden, dass α_{s1} -Casein aufgrund der blockweise alternierenden Abfolge aus hydrophoben, eher ungeladenen Domänen und stark geladenen Sequenzabschnitten als bifunktional beschrieben werden kann. Einerseits besteht die Möglichkeit der elektrostatischen Interaktion des stark geladenen Sequenzabschnittes (vgl. rote Equipotentialfläche) mit gegensätzlich geladenen Ionen und Proteinen. Andererseits stellen die ungeladenen, hydrophoben Molekülbereiche sehr gute Verknüpfungspunkte für hydrophobe Wechselwirkungen dar. Insgesamt besitzt α_{s1} -Casein demnach drei Verknüpfungsstellen: zwei Bereiche, die eine hydrophobe Verknüpfung erlauben und die von einer stark geladenen Proteindomäne unterbrochen sind.

α_{S2} -Casein

α_{S2} -Casein weist von allen Caseinen den hydrophilsten Charakter auf. Bis zu 10 % des gesamten Caseins in Kuhmilch fallen unter die Untergruppe der α_{S2} -Caseine. Sie unterteilen sich in zwei Major- und mehrere Minorkomponenten, die die gleiche AS-Sequenz aufweisen und sich wie die α_{S1} -Caseine nur durch ihre posttranslationelle Phosphorylierung und dem Grad der intramolekularen Disulfidverknüpfung voneinander unterscheiden. Das Referenzprotein dieser Gruppe ist das α_{S2} -CN A-11P dar. Es ist 207 AS lang, weist eine intramolekulare Disulfidbrücke auf und hat ein Molekulargewicht von 25226 Da. Sein theoretischer pI nach ProtScale[®] liegt bei pH 8,31, während Töpel (2004) für dieses Caseine einen pI von 5,1 angibt. Vier genetische Varianten (A – D) sind für diese Caseinfraktion bekannt.

Abb. 2.8 zeigt die simulierte Molekularstruktur von α_{S2} -Casein. In der Primärstruktur des Proteins können vier Bereiche oder Domänen unterschieden werden. Den Anfang macht eine 68 AS-Reste lange, N-terminale hydrophile Domäne (blau) mit zwei anionischen Clustern, der ein zentraler hydrophober Sequenzbereich (grün) folgt. Im Anschluss weist das Protein wieder einen hydrophilen Sequenzabschnitt auf, in dem sieben der acht Phosphoserilycluster (magenta) lokalisiert sind. Auch hier ist deutlich deren Beitrag zur lokal negativen Partialladung am Molekül in Form der roten Equipotentialfläche zu erkennen. Den Abschluss bildet ein C-Terminaler Abschnitt aus 47 AS, der trotz seiner Hydrophobizität eine Nettoladung von +9,5 bei physiologischem Milch-pH aufweist. Mit einer Präzipitation bei einer Ca-Konzentration von 2 mM ist α_{S2} -Casein wesentlich Ca-sensitiver als α_{S1} -Casein.

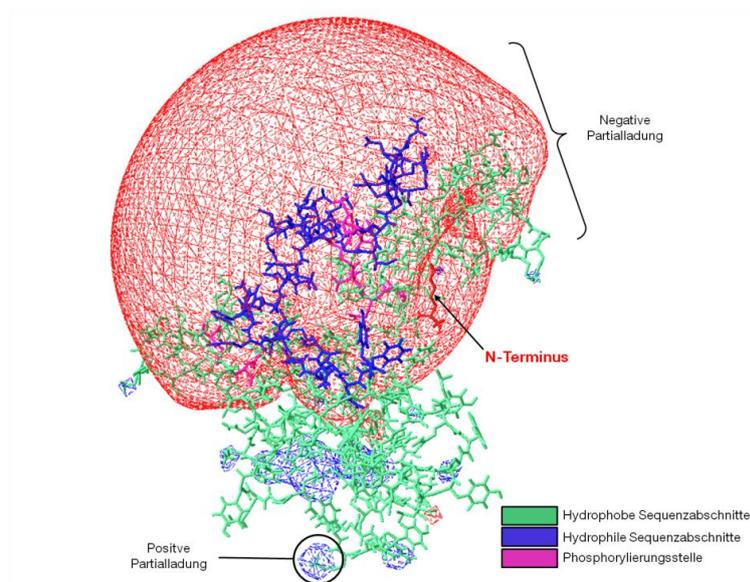


Abb. 2.8: Molekular-dynamisches Modell von α_{S2} -Casein. Die Equipotentialflächen sind auf $\pm \frac{3,3 \cdot k_B \cdot T}{e}$ skaliert

Wie beim α_{s1} -Casein sind auch beim α_{s2} -Casein die geladenen und die hydrophoben Molekülbereiche in voneinander getrennten Blöcken angeordnet. Dementsprechend kann auch dieses Casein hinsichtlich seiner Verknüpfungsmöglichkeiten als bifunktional beschrieben werden. Aus der Sequenzabfolge ergeben sich sogar vier, alternierend aufeinander abfolgende Verknüpfungspunkte.

β -Casein

Von allen Caseinen weisen die β -Caseine den hydrophobsten Charakter auf. Der Anteil am Gesamtcasein liegt bei bis zu 45 %. Somit stellen sie die größte Gruppe unter den Caseinen dar. Die Plasmin-Spaltprodukte des β -Caseins, γ -Casein oder Proteose-Pepton, zählen ebenfalls zu dieser Gruppe.

Als entsprechendes Referenzprotein ist das β -CN A²-5P in zahlreichen Proteindatenbanken gelistet. Es ist 209 AS lang und besitzt ein Molekulargewicht von 23983 Da. Sein theoretischer pI nach ProtScale® liegt bei pH 5,13 und 12 genetische Varianten (siehe Abb 2.9) sind bis jetzt bekannt. Töpel (2004) gibt für die β -Caseinfraction einen isoelektrischen pH-Bereich von 4,8 bis 5,1 an.

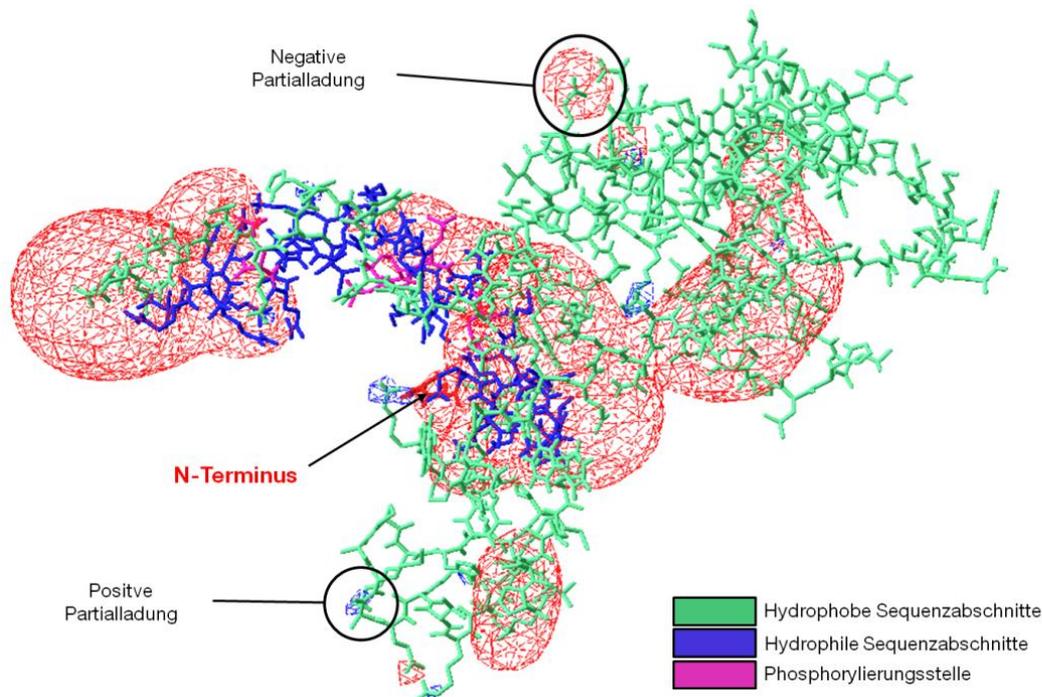


Abb. 2.9: Molekular-dynamisches Modell von β -Casein. Die Equipotentialflächen sind auf $\pm \frac{3,3 \cdot k_B \cdot T}{e}$ skaliert

In seiner Primärstruktur, Grundlage für die in Abb. 2.9 dargestellte Molekularstruktur, können zwei Domänen unterschieden werden: Am N-Terminus befindet sich ein geladener, polarer und hier blau eingefärbter Proteinbereich (1/10 der N-terminalen AS steuern 1/3 der Nettogesamtladung des Proteins bei). Das restliche, in der Abbildung grün eingefärbte Molekül ist reich an neutralen und v.a. hydrophoben AS.

Bei β -Casein sind die hydrophoben und die geladenen Sequenzabschnitte wie bei α_{S1} - und α_{S2} -Casein ebenfalls blockweise angeordnet. Allerdings sind hier nur zwei Blöcke zu unterscheiden, was in der Summe nur zwei Ankerpunkte für eine weitere Verknüpfung durch elektrostatische oder hydrophobe Interaktionen bedeutet. Dementsprechend sind seine Interaktionsmöglichkeiten im Vergleich zu den vorangegangenen Caseinen reduziert.

κ -Casein

Der Anteil der κ -Caseine – 11 genetische Varianten sind bekannt. – liegt bei etwa 10 bis 14 %. Eine majore und mindestens sechs minore Komponenten können innerhalb dieser Proteingruppe unterschieden werden. Das Referenzprotein ist das in Abb. 2.9 zu sehende κ -CN A-1P, die majore, kohlenhydratfreie Variante des κ -Caseins. Sie ist 169 AS lang, weist ein Molekulargewicht von 19037 Da auf und besitzt nach ProtScale® seinen theoretischen pI bei pH 5,93. Auch Töpel (2004) gibt Werte dieser Größenordnung (pH 5,4 – pH5,6) für den Punkt einer neutralen Nettoladung an.

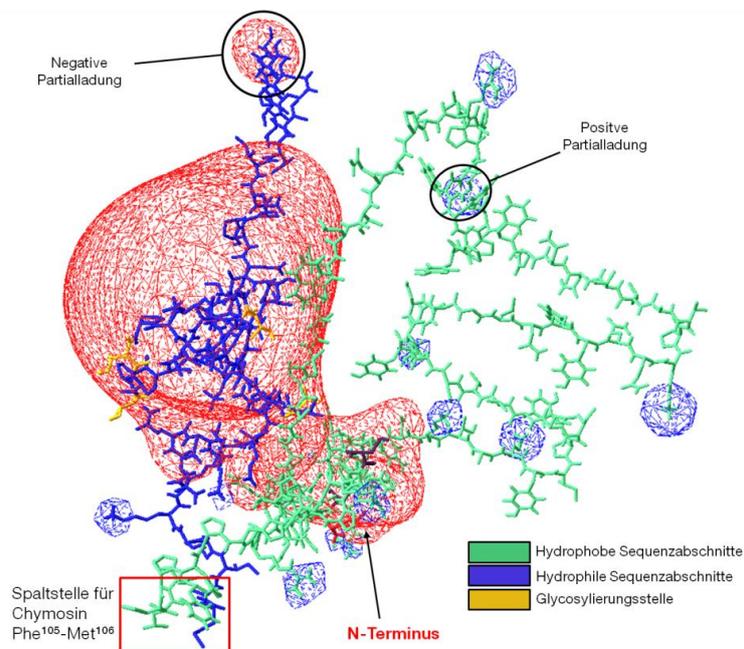


Abb. 2.10: Molekular-dynamisches Modell von κ -Casein. Die Equipotentialflächen sind auf $\pm \frac{3,3 \cdot k_B \cdot T}{e}$ skaliert

Die minoren κ -Caseine unterscheiden durch ihre Glycosylierungsmuster. Die posttranslationelle Glycosylierung erfolgt über eine O-glycosidische Anbindung von Galactose, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin, N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) oder von diversen Polymeren dieser Glycoverbindungen an Threonin oder Serin im Polypeptidrückgrat (AS-Position 135, 141, 142 und 313, in der Grafik gelb eingefärbt).

Die Primärstruktur des κ -Caseins ist geprägt von einem stark amphiphilen Charakter. Ein verhältnismäßig hydrophober N-Terminus (AS 1 bis 105, grün) steht einem hydrophilen, stark geladenen C-Terminus (AS 106 bis 169, blau) gegenüber. Letzterer wird auch mit Caseinomakropeptid, kurz CMP, bezeichnet. Ähnlich wie beim β -Casein bedeutet dies nur zwei mögliche Interaktionspunkte bei der Wechselwirkung beispielsweise mit anderen Caseinen.

Eine Glycosylierung der C-terminalen Serin- und Threoninreste erhöht dort die Ladung zusätzlich. Aufgrund fehlender Bindestellen für Calcium ist κ -Casein das einzige der Caseine, das unempfindlich gegenüber einer Ca-induzierten Präzipitation ist. Im Gegenteil: Aufgrund seiner Molekülstruktur ist es in der Lage, sogar andere Caseine vor einer Ca-Fällung zu schützen. Dabei kann es die zehnfache Menge an α - und β -Casein binden und bei höheren Ca-Konzentrationen in Lösung halten.

Casein in Milch

Aufgrund Ihrer molekularen Struktur und ihres amphiphilen Charakters neigen die Caseine, wie bereits angeklungen, untereinander zur Aggregation. Sie liegen in Milch zu weniger als 5 % als freie Monomere oder so genanntes Serumcasein vor (Waugh, 1958, Lopez-Fandino et al., 1998). Der weit größere Teil der Caseine bildet in Milch sphärische Dispersionskolloide, die Caseinmizellen. Auf ihre detaillierten Eigenschaften, auf Modellvorstellungen bezüglich der inneren Struktur bzw. der Vorgänge bei der Mizellbildung wird in gesonderten Kapiteln (Abschnitt 3.1 und 3.2) näher eingegangen.

2.5 Chymosin

Die Aspartatprotease Chymosin (EC 3.4.23.4) wird zur Dicklegung der Milch bei der Käseherstellung verwendet und stammt aus dem Labmagen von Kälbern. Aufgrund der steigenden Käseproduktion und wegen sinkender Kälberschlachtungen wird Chymosin vermehrt auch biotechnologisch hergestellt.

2.5.1 Grundlegendes und Aufbau

Chymosin ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Es besitzt zwei Asparaginsäurereste im aktiven Zentrum (Walstra et al., 1984; Fox & McSweeney, 1998). Das Enzym besteht aus zwei Hauptbereichen und hat eine nierenähnliche Form. Die Hauptbereiche sind symmetrisch angeordnet wobei β -Faltblattstrukturen den Hauptanteil der Sekundärstruktur bilden, während α -Helices nur in wenigen Bereichen vorkommen. Drei Disulfidbrücken und mehrere Ionenpaare wurden bei der Beschreibung der Proteintertiärstruktur nachgewiesen. Das aktive Zentrum befindet sich in einem tiefen Spalt zwischen den N- und C-terminalen Hauptbereichen, wobei die katalytischen Asparaginsäurereste ebenfalls doppelt symmetrisch angeordnet sind. Neben dem aktiven Zentrum befinden sich auch die Substratbindetaschen in diesem Spalt. Beide sind für die hohe Spezifität von Chymosin verantwortlich (Gilliland et al., 1990; Chitpinyol & Crabbe, 1998).

2.5.2 Wirkungsweise

Chymosin spaltet zwischen hydrophoben und aromatischen Aminosäuren und hydrolysiert vor allem die Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ Bindung des κ -Caseins. κ -Casein wird durch Chymosin in Para- κ -Casein und CMP gespalten. Als Cofaktoren sind Calciumionen beteiligt. In Milch können mindestens 95 % des κ -Caseins gespalten werden. Die Umsatzrate beträgt in Milch bei pH 6,7 und 30 °C 100 s⁻¹. Bei kleinen Peptiden mit Phe-Met Bindung ist die Umsatzrate deutlich geringer als bei κ -Casein. Je mehr diese Peptide dem κ -Casein ähneln, desto schneller verläuft die Reaktion. Walstra et al. (1984) folgern daraus, dass die Phe-Met Bindung ungeschützt ist. Das Enzym kann durch seine negative Ladung bei pH 6,7 schnell und einfach an die positiv geladene Peptidkette binden. Das pH-Optimum der Hydrolyse von κ -Casein liegt bei pH 6,0, die Unterschiede zwischen pH 5,6 und 6,4 sind jedoch sehr gering. Da bei pH 6,0 das Mizellvolumen minimal ist, wird vermutet, dass die Phe-Met Bindung des κ -Caseins besonders leicht zugänglich ist (van Hooydonk et al., 1986). Zwischen pH 2,8 und 4,0 ist die Aktivität aufgrund von starker Autokatalyse sehr gering. Bei höheren pH Werten findet eine Inaktivierung von Chymosin statt, was Walstra et al. (1984) auf eine Denaturierung zurückführen. Die Inaktivierung von Chymosin in Milch ist stark temperaturabhängig. Über 40 °C kann das Enzym bereits vor der Gerinnung der Milch inaktiviert worden sein. Der Q_{10} -Wert der Inaktivierung beträgt ca. 2,5. Die Hydrolysereaktion am κ -Casein kann, abhängig von Substrat- und Enzymkonzentration, formalkinetisch als eine Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden.

3 Stand des Wissens

Nach einer kurzen Darstellung des Assoziationsverhaltens der einzelnen Caseinmonomere in isolierter Form sollen in diesem Abschnitt die aktuellen Ansätze und Modelle zur inneren Struktur von Caseinmizellen vorgestellt werden. Die Einflüsse äußerer Millieubedingungen auf das mizellare System, vor allem die Auswirkungen hoher hydrostatischer Drücke werden erläutert und Ansatzpunkte zum Einsatz dieser Technologie für ein besseres Verständnis des mizellaren Systems herausgearbeitet.

3.1 Das Assoziations- bzw. Aggregationsverhalten isolierter Caseinmonomere

Wie bereits beschrieben, können die vier Hauptgruppen der Caseine α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein unterschieden werden. Vereinzelt wird γ -Casein als fünfte Caseingruppe angeführt, was allerdings irreführend ist, da es sich bei den γ -Caseinen nicht um originär sekretierte Proteine sondern vielmehr um Hydrolyseprodukte von Caseinen, insbesondere von β -Casein handelt (Fox & McSweeney, 1998; Farrell et al., 2001; Holland, 2008). Neben der erwähnten Calciumempfindlichkeit weisen alle Caseine eine geringe Sekundärstruktur auf, weshalb sie oft als „rheomorphe“ (Holt & Sawyer, 1993) oder „nativ ungeordnete“ (Gaspar et al., 2008) Proteine beschreiben werden. Dies ist auf einen hohen Prolinanteil innerhalb des Polypeptidrückgrates zurückzuführen, da Prolin die Ausbildung von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen verhindert (Horne, 2008).

Aufgrund der geringen Sekundärstruktur und dem amphiphilen Aufbau können Caseine auf verschiedene Art und Weise miteinander reagieren. Adsorptionsversuche mit reinen Caseinfraktionen an hydrophoben Oberflächen zeigten, dass Caseine über ihre hydrophoben Sequenzabschnitte starke hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können, die allerdings durch die negativ geladenen Phosphatreste geschwächt werden. Abb. 3.1 zeigt die Konformation von α_{s1} -Casein und β -Casein an einer hydrophoben Oberfläche. Aufgrund der Abstoßung stehen die hydrophilen Bereiche, die als Linien dargestellt sind von der Oberfläche ab. Deutlich ist zu erkennen, dass α_{s1} -Casein hier über zwei, β -Casein nur über einen Ankerpunkt an die hydrophobe Oberfläche bindet (siehe auch Abschnitt 2.4).



Abb. 3.1: Assoziationsverhalten von α_{s1} -Casein (a) und β -Casein (b) an einer hydrophoben Oberfläche aus (Horne, 1998)

α_{s1} -Casein in Lösung aggregiert zu einer fadenähnlichen Struktur, die durch Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Randbereichen entsteht. β -Casein aggregiert zu Mizellen, wie in Abb. 3.2 deutlich wird (Horne, 1998).

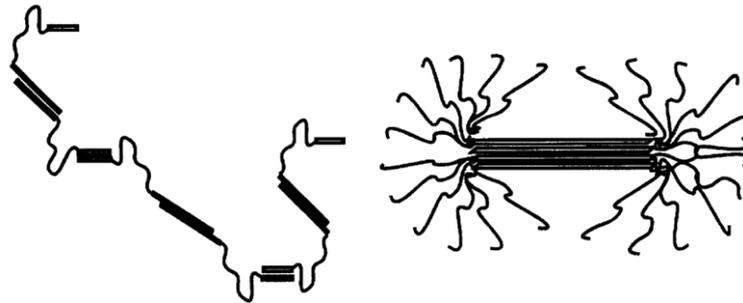


Abb. 3.2: Mögliche Assoziationsformen für α_{s1} -Casein (links) und β -Casein (rechts) aus (Horne, 1998)

Die Ausbildung von β -Caseinmizellen ist stark temperaturabhängig. β -Casein liegt bei Temperaturen unterhalb von 10-15 °C als Monomer vor. Bei höheren Temperaturen assoziieren β -Casein-Monomere sequenziell zu Mizellen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 12 nm (O'Connell et al., 2003). Die Übergangstemperatur liegt je nach β -Casein-Konzentration zwischen 15 und 30 °C (de Kruif & Grinberg, 2002). Dieses Phänomen ist zum Einen mit der Abschwächung von hydrophoben Wechselwirkungen bei niedrigen Temperaturen erklärbar. Zum Anderen geht der Übergang vom monomeren in den mizellaren Zustand mit einer Konformationsänderung der Sekundärstruktur von β -Casein einher. Bei hoch verdünnten β -Caseinlösungen konnte eine reversible kalte Denaturierung bei niedrigen Temperaturen festgestellt werden. Die Konformationsänderung bedingt auch, dass β -Casein in seiner polymeren Form eine kompaktere Struktur aufweist als im monomeren Zustand. Mit steigender Temperatur verstärkt sich dieser Effekt im Monomer bevor eine auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Aggregation zu mizellaren Strukturen erfolgt (Farrell et al., 2001).

Für α_{s2} -Casein wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit α_{s1} -Casein ein vergleichbares Assoziationsverhalten vermutet (Horne, 1998). Ältere Studien von Snoeren et al. (1980) lassen jedoch vermuten, dass monomeres α_{s2} -Casein auch ringförmig vorliegen kann, da es ein überwiegend negativ geladenes N-terminales Ende und ein weitgehend positiv geladenes C-terminales Ende besitzt (siehe Abb. 3.3). Die gegensätzlich geladenen Abschnitte des α_{s2} -Caseinmoleküls ziehen sich an, wodurch eine Ringstruktur entstehen könnte. Begründet wird diese Theorie über eine unveränderte intrinsische Viskosität einer α_{s2} -Caseinlösung über einen weiten Konzentrationsbereich.

Darüber hinaus scheint der Ringschluss stark von der Ionenstärke beeinflusst zu sein, was ebenfalls ein Indiz für elektrostatische Anziehungskräfte ist. Bei hohen Ionenstärken ($I > 1,2 \text{ M}$) ist die Abschirmung der unterschiedlichen Ladungen hoch. Die Aggregationsneigung bzw. die Ringbildung wird dadurch reduziert (Snoeren et al., 1980).

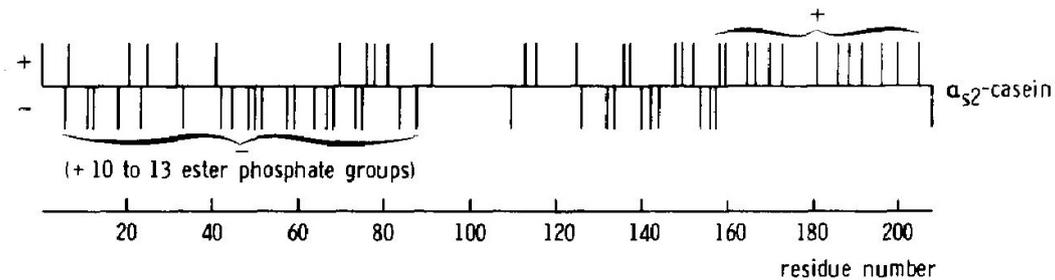


Abb. 3.3: Ladungsverteilung eines α_{s2} -Casein Moleküls bei pH 6,7 aus (Snoeren et al., 1980)

κ -Casein verfügt über zwei Cysteinreste Cys³² und Cys¹⁰⁹ und kann intra- und intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke führt zu einer schleifenartigen Struktur des N-Terminales Endes. Durch intermolekulare Disulfidbrücken können κ -Casein Dimere, Trimere und Tetramere entstehen. Es wird vermutet, dass diese stabiler an die Caseinmizelle gebunden sind (Horne, 2008).

3.2 Caseinmizellen

In Milch bilden die monomeren Caseine große Proteinaggregate, die Caseinmizellen. Der Terminus „Caseinmizelle“ ist eher historischer Natur und hat nur wenig mit einer typischen Mizelle, eine colloidchemische Bezeichnung für ein Supraaggregat amphiphiler Moleküle, gemein (Fox & Brodkorb, 2008; Dalgleish, 2011).

3.2.1 Generelle Eigenschaften von Caseinmizellen

Caseinmizellen in Milch weisen Partikeldurchmesser bis zu 600 nm auf, wobei der mittlere Durchmesser bei etwa 150 nm liegt (Fox & Brodkorb, 2008). Sie werden in Vesikeln innerhalb der sekretorischen Zellen der Milchdrüse exprimiert und anschließend über Exocytose ausgeschleust (Farrell et al., 2006). Die Ermittlung der Größenverteilungen von Casenmizellen in Milch kann beispielweise über statische oder dynamische Lichtstreuung, über eine statistische Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen oder über eine Feld-Fluss-Fraktionierung erfolgen (de Kruif, 1998). Die so

ermittelten Partikelgrößenverteilungen sind durch eine Log-Normalverteilung (siehe Gl.38 nach de Kruijff, 1998; Gebhardt et al., 2011) vergleichsweise gut annäherbar.

$$f(d) = \frac{1}{d \cdot \beta \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{\left(-\frac{\ln\left(\frac{d}{d_0}\right)}{\beta \cdot \sqrt{2}} \right)^2} \quad (\text{Gl.38})$$

Dabei entsprechen hier β der Standardabweichung und d_0 dem Partikeldurchmesser am Peakmaximum. In diversen Studien wird der untere Grenzpartikeldurchmesser der Partikelgrößenverteilungen zwischen 50 und 80 nm angegeben (Horne & Dalgleish, 1985; Udabage et al., 2003; Marchin et al., 2007). Einen zusammenfassenden Überblick über einige wesentliche Eigenschaften der Caseinmizelle geben McMahon & Brown (1984) und Fox & Brodkorb (2008):

Tab. 3.1: Eigenschaften der Caseinmizelle nach (McMahon & Brown, 1984; Fox & Brodkorb, 2008)

| | |
|---|------------------------------------|
| Mittlerer Mizelldurchmesser | 120 nm |
| Mittlere Partikeloberfläche | $8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ |
| Mittleres Partikelvolumen | $2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$ |
| Mittlere Partikelmasse | $2,2 \times 10^{-15} \text{ g}$ |
| Hydratation | 3,7 g H ₂ O / g Protein |
| Molekulargewicht (hydratisiert) | $1,3 \times 10^9$ Dalton |
| Molekulargewicht (dehydratisiert) | 5×10^8 Dalton |
| Anzahl der Polypeptidketten (MW 30000 Da) | Ca. 1×10^4 |
| Mittlere Partikelanzahl pro ml Milch | 10^{14} - 10^{16} |
| Mittlere freie Wegstrecke zwischen den Mizellen | 240 nm |

Wie zu erkennen ist, sind Caseinmizellen in Milch stark hydratisierte Proteinkomplexe. Betrachtet man sich die Molekulargewichte der einzelnen Caseinfraktionen (im Schnitt rund 30000 Da), so sind am Aufbau einer Caseinmizelle rund 10000 Caseinmonomere beteiligt.

3.2.2 Die Oberfläche der Caseinmizelle

κ -Casein ist an der Mizelloberfläche lokalisiert, bildet dort durch das hydrophile CMP eine „haarige“, in das Milchserum ragende Schicht („hairy Layer“ oder „salted brush“) und bestimmt so wesentlich die kolloidale Stabilität der Caseinmizelle. Viele Modelle zur Interaktion von Caseinmizellen gehen von einer homogenen Oberflächenbelegung mit κ -Casein aus. Dabei werden die Caseinmizellen als harte bzw. „klebrige“ harte Kugeln („hard spheres“ / „adhesive hard spheres“) beschrieben, von denen das hydrophile CMP etwa 5-10 nm weit absteht (de Kruif, 1992; de Kruif & Zhulina, 1996; de Kruif, 1998; Dalgleish, 2011).

Allerdings hegt Dalgleish (1998) aufgrund der hohen Gesamtpartikeloberfläche in Milch und des doch eher niedrigen κ -Caseingehalts Zweifel an einer vollständigen, homogenen Oberflächenbesetzung der Caseinmizellen durch κ -Casein. Auf der Grundlage der Grenzflächenbesetzung in proteinstabilisierten Emulsionen errechnet er die theoretisch von einem κ -Casein-Molekül besetzte Fläche von 13 nm^2 , was bedeutet, dass lediglich etwa ein Drittel der gesamten Mizelloberfläche mit κ -Casein besetzt ist. Gestützt werden diese Überlegungen durch hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen von Caseinmizellen (McMahon & McManus, 1998; Dalgleish et al., 2004; Marchin et al., 2007; McMahon & Oommen, 2008). Hier erscheint die Mizelloberfläche eher inhomogen und zerklüftet, mit unterschiedlich stark ausgeprägten Tubuli, an deren Enden Dalgleish das κ -Casein hauptsächlich lokalisiert sieht (Dalgleish, 2011). Ebenfalls in diese Richtungen gehen Überlegungen von Kühnl (2010) zur Caseinmizellinteraktion in Deckschichten bei der Cross-flow-Filtration. Sie beruhen auf Erkenntnissen von Kreuß et al. (2009) hinsichtlich der Grenzflächenaktivität von CMP. Da das CMP am κ -Casein von der Mizelle in das Milchserum ragt, ist vor allem die Ladungsverteilung an diesem Molekülteil für die Oberflächenladung der Caseinmizelle verantwortlich. Geht man zusätzlich davon aus, dass 50 % des CMP glycosyliert vorliegen, errechnet sich der pI des CMP im Mittel zu 3,65, was doch deutlich vom pI der Caseinmizelle von etwa pH 4,6 abweicht. Werden allerdings diese Überlegungen von Kühnl (2010) mit den Berechnungen von Dalgleish (1998) zusammengeführt, so berechnet sich der theoretische pI einer Caseinmizelle zu 4,44 (siehe Tab. 3.2), was deutlich näher am gemessenen Caseinmizell-pI von 4,6 liegt. Hierbei handelt es sich nur um theoretische Überlegungen, bei denen die Orientierung der anderen Caseinmoleküle an der Mizelloberfläche nicht einbezogen wurde. Sicher werden von α_s - bzw. β -Caseinen auch nur bestimmte, polare Molekülgruppen verstärkt an der Mizelloberfläche liegen und dort wie das CMP die Partikelladung beeinflussen. Allerdings stützt die rein phänomenologisch basierte Berechnung die Annahmen von Dalgleish.

Tab. 3.2: Berechnung des theoretischen pI einer Caseinmizelle auf der Grundlage der Überlegungen von (Dalgleish, 1998; Kühnl, 2010)

| Anteil an der Oberflächenbesetzung der Casein-mizelle nach (Dalgleish, 1998) | Casein-fraktion | Variation | Gewichtung bzogen auf mizellares Vorkommen [%] | $\emptyset pI$ nach (Töpel, 2004; Kreuß et al., 2009), | $\emptyset pI$ gemäß Gewichtung | $\emptyset pI$ der Casein-mizelle (theoret.) |
|--|---------------------------|-----------------------|--|--|---------------------------------|--|
| 1/3 | κ -Casein bzw. CMP | gCMP | 50 | 3,15 | 3,65 | 4,44 |
| | | aCMP | 50 | 4,15 | | |
| 2/3 | α_s -Casein | α_{s1} -Casein | 40 | 4,60 | 4,83 | |
| | | α_{s2} -Casein | 10 | 5,10 | | |
| | β -Casein | -- | 50 | 4,95 | | |

Caseinmizellen weisen bei physiologischem pH eine negative Oberflächenladung auf. Ihr Zetapotential liegt hier bei rund -20 mV (Darling & Dickson, 1979; Dalgleish, 1984). Obwohl sich gleichgeladene Partikel abstoßen, kann aufgrund der hohen Ionenstärke in Milch und der daraus resultierenden Ladungsabschirmung, die Elektrostatik nicht als alleiniger Stabilisierungsmechanismus für Caseinmizellen in Milch angesehen werden. In Milchserum berechnen Tuinier & de Kruijff (2002) eine mittlere Debye-Länge, die die Reichweite elektrostatischer Kräfte widerspiegelt, von 1 nm. Das heißt, dass bereits ab dieser Entfernung die Caseinmizelle als elektrisch neutraler Partikel erscheint. Die Stabilität wird eher auf sterische Effekte an der Mizelloberfläche zurückgeführt: Kommen zwei Caseinmizellen in unmittelbare Nähe zueinander, überlappen sich die von der Mizelloberfläche abstehenden CMP-Moleküle. Dabei nimmt die Anzahl von deren Freiheitsgraden ab, da sich deren Konzentration in Überlappungsbereich erhöht. Das bedeutet, dass durch die Partikelannäherung die Entropie innerhalb des betrachteten Systems abnimmt, was einen Anstieg der Freien Enthalpie zur Folge hat (siehe Gl.2) und letztendlich zu einer Partikelabstossung führt (Tuinier & de Kruijff, 2002; Horne, 2006).

Elektrostatische Wechselwirkungen wirken sich aber deutlich auf die Konformation der CMP-Schicht aus. Eine Veränderung der Ladungsverhältnisse, z.B. durch eine pH-Absenkung, oder eine stärkere Abschirmung, z.B. durch Erhöhung der Ionenstärke, bewirkt, dass die CMP-Schicht in sich zusammenfällt und eng an der Caseinmizelle anliegt (de Kruijff & Zhulina, 1996; Tuinier & de Kruijff, 2002). Die

sterische Stabilisierung der Mizellen ist nicht mehr gegeben und sie beginnen zu aggregieren. Die elektrostatischen Effekte haben über diesen Weg also eher einen indirekten Einfluss auf die mizellare Stabilität.

3.2.3 Modellvorstellungen zur inneren Struktur der Caseinmizelle

Die innere Struktur der Caseinmizelle ist nach wie vor nicht endgültig aufgeklärt, bislang existieren nur Modelle zu deren Beschreibung, die allerdings alle ihre Stärken und Schwächen besitzen. Die Mechanismen, die der Bildung der Mizelle zu Grunde liegen, wurden kontrovers diskutiert, was sich auch in der Art und Anzahl dieser Strukturmodelle äußert. Die im Laufe der Zeit entstandenen Modelle über die innere Mizellstruktur lassen sich in drei generelle Kategorien einteilen, wie sie in Tab. 3.3 zusammengefasst sind.

Tab. 3.3: Kategorien für Caseinmizellmodelle mit den zugehörigen Autoren

| Modell-Kategorie | Autoren |
|----------------------------------|---|
| „coat-core“-Modelle | (Waugh & Noble, 1965), (Payens, 1966), (Parry, JR. & Carroll, 1969), (Paquin et al., 1987) |
| „subunit“- oder Submizellmodelle | (Morr, 1967), (Slattery & Evard, 1973), [Schmidt & Payens (1976), Schmidt (1982)] zit. nach (Phadungath, 2005), (Walstra et al., 1984), (Ono & Obata, 1989), (Walstra, 1999/03), (Farrell et al., 2006) |
| „internal structure“-Modelle | (Rose, 1969), (Dumas & Garnier, 1970), (Holt, 1998), (Horne, 1998), (Horne, 2008), (McMahon & Oommen, 2008), (Dalglish, 2011) |

Eine detaillierte Erläuterung der Überlegungen soll anhand bekanntesten und auch weithin gebräuchlichen Modelle, dem Submizellmodell von Walstra (Abb. 3.4) sowie dem „Dual Binding“-Modell von Horne (Abb. 3.5), erfolgen. Zuletzt wird auf die aktuellsten Überlegungen und Theorien von Dalglish eingegangen, der in seinem Modellansatz Ansätze von Walstra und Horne verknüpft (Abb. 3.6). Durch weitere Vertiefung der Erkenntnisse über die Struktur und das Verhalten der Caseinmizellen unter bestimmten Bedingungen können die Modelle angepasst, erweitert oder aber entkräftet werden.

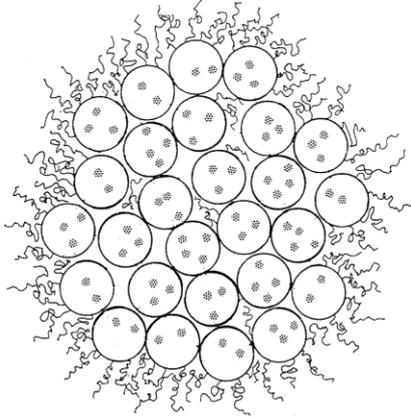


Abb. 3.4: Submizellen-Modell nach Walstra (1999)

Im Submizellenmodell besteht die Caseinmizelle aus kleineren sphärischen Partikeln, die 12-15 nm groß sind und aus 20-25 Caseinmonomeren bestehen. Die Zusammensetzung der Submizellen ist variabel. Ein α - und β -Caseinreicher Submizelltyp befindet sich vornehmlich im Inneren der Caseinmizelle, während sich α - und κ -Caseinreiche Submizellen auf der Oberfläche der Mizelle befinden. Der hydrophile Teil des κ -Caseins ragt dabei in das umgebende Medium und bildet eine haarige Schicht, die weitere Aggregation durch sterische und elektrostatische Abstoßung verhindert (Walstra, 1999). Auf der Basis strukturebiologischer Untersuchungen gehen auch Farrell et al.

(2006) eher davon aus, dass die Caseinmizelle aus Submizellen aufgebaut ist. Dabei werden hier die Inhomogenitäten in Streumustern bei vorangegangenen SAXS bzw. SANS-Versuchen von Stothart et al. (1982), Kumosinski et al. (1988), und Hansen et al. (1996 zit. nach (Farrell et al., 2006)) auf das Vorhandensein von Submizellen zurückgeführt. Allerdings fehlen an dieser Stelle Erklärungen für das Vorkommen zweier Submizelltypen und für die Rolle bzw. die Lokalisierung des Calciumphosphats (Dalglish, 2011).

Das „Dual Binding Modell“ von Horne (1998) beschreibt die Caseinmizelle als eine komplexe polymere Struktur, die auf einem Gleichgewicht zwischen hydrophober Anziehung und elektrostatischer Abstoßung zwischen den nach ihrer Primärstruktur als Blockcopolymeren aufgefassten Caseinmonomeren basiert. Es bezieht sich in erster Linie auf deren vorher beschriebenes Assoziationsverhalten. Die Möglichkeit der hydrophob getriebenen Aggregation der Caseine ist durch die stark geladenen Phosphatreste in den hydrophilen Molekülendomen zunächst eingeschränkt. Die Anlagerung von Calcium bzw. CCP führt zu einer Neutralisation der negativen Ladung und damit zu einer Reduktion der elektrostatischen Abstoßung (Gaucheron, 2005; Horne, 2008). Calciumphosphat übernimmt damit eine entscheidende Rolle für die Stabilität innerhalb der Caseinmizelle.

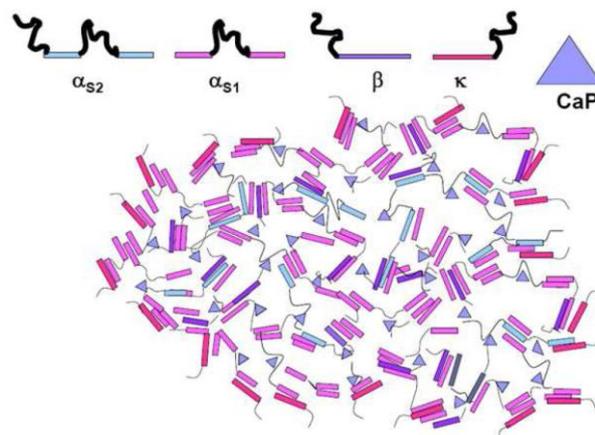
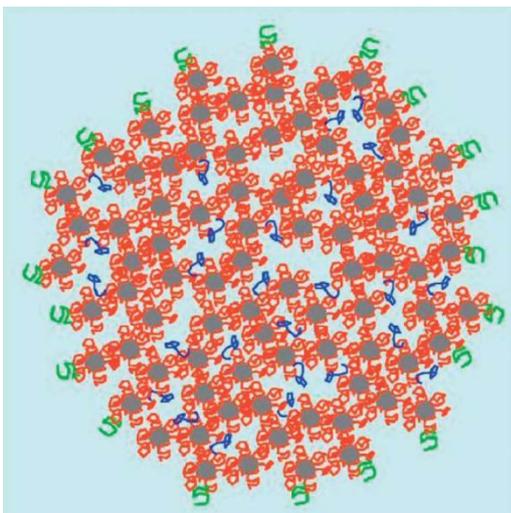


Abb. 3.5: Dual Binding Modell nach Horne (1998)

Neben der Ladungsneutralisation fungiert CCP bei der Anbindung an die negativ geladenen Phosphatreste darüber hinaus auch als Verknüpfungspunkt, an den sich mehrere Caseine anlagern können. In diesem Zusammenhang werden die oben genannten Inhomogenitäten in den Streumustern sowie unterschiedliche Elektronendichten in TEM-Aufnahmen, beispielsweise von Marchin et al. (2007), auf das Vorhandensein der Ca-Phosphat-Nanocluster im Inneren der Caseinmizelle zurückgeführt (Horne, 2008; McMahon & Oommen, 2008). Aufgrund ihrer Struktur können monomere α - und β -Caseine somit über hydrophobe Wechselwirkungen sowie Calciumbrücken polymerisieren und werden in diesem Modell auch als bifunktional hinsichtlich der Polymerisierung bezeichnet, wobei α -Caseine mit drei bzw. vier Interaktionsbereichen mehr Ankerpunkte aufweisen als β -Caseine (zwei Ankerpunkte; siehe auch Abschnitt 2.4). Das κ -Casein ist in diesem Modell das Schlüsselprotein zur Erklärung, warum die Polymerisierung nicht kontinuierlich weiterläuft und sich letztendlich Caseinmizellen bilden. Im Gegensatz zu den anderen Caseinen ist κ -Casein bei der Polymerisierung monofunktional. Es kann über seinen hydrophoben, N-Terminalen Molekülteil an eine wachsende Caseinkette aus α - und β -Caseinen anbinden. Da es aber weder einen weiteren hydrophoben Block noch über Bindestellen für Calciumphosphat (siehe Abschnitt 2.4) verfügt und noch dazu an seinem C-Terminalen Ende stark geladen ist, erfolgt mit Anbinden des κ -Caseins, ein Abbruch des Kettenwachstums (Horne, 2002; Horne, 2008).

Nach Dalgleish ist es nun möglich, beide Ansätze über Mizellstruktur zu verknüpfen. Seiner Meinung nach ist die Caseinmizelle zwar aus Untereinheiten aufgebaut, allerdings nicht im Sinne der Submizellen, die ihre Integrität auch bei der Mizelldissoziation behalten. Vielmehr werden originäre



Caseinatpartikel über Veränderung in deren Interaktion mit Calciumphosphat zu kleineren Untereinheiten verknüpft, die anschließend aggregieren und über κ -Casein an der Oberfläche als Caseinmizelle stabilisiert werden (Dalgleish, 2011). Zusätzlich betont er in seinem Ansatz, dass weitere stabilisierende Kräfte beim Aufbau der Mizelle beteiligt sein müssen. Insbesondere die Rolle des Hydratwassers für die mizellare Stabilität wird hervorgehoben. Für die initiale Aggregation bei der Bildung der mizellaren Untereinheiten aus Caseinen und Calciumphosphat sind hydrophobe Wechselwirkungen essentiell. Nach deren Bildung jedoch stabilisieren wei-

Abb. 3.6: Vorstellung zur inneren Mizellstruktur nach Dalgleish (2011)

tere über kürzere Distanzen reichende Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken oder Van-der-Waals-Interaktionen das komplexe Gebilde.

Aufgrund der hohen Hydratation muss außerdem ein nicht unerheblicher Teil des detektierten Wassers auch im Mizellinneren lokalisiert sein. Wegen der Eigenschaften der Caseine ist das Wasser dort aber nicht gleichmäßig verteilt, sondern in Kanälen und Kavitäten lokalisiert. Aufgrund seiner Molekülstruktur, die der des κ -Caseins ähnlich ist, schreibt Dalgleish β -Casein die Grenzflächenbesetzung im Mizellinneren zu. Zudem kann dieses Casein über die beschriebenen Poren und Kanäle relativ ungehindert zwischen Mizelle und Serumphase diffundieren (siehe Temperatureinfluss auf die mizellare Struktur). Dalgleish (2011) unterscheidet also zwischen innerer „Mizelloberfläche“, die hauptsächlich mit β -Casein belegt und für kleinere Moleküle, sprich Salze, Caseinmonomere aber auch für Enzyme, zugänglich ist und äußerer Mizelloberfläche, die die colloidale Stabilität und die mizellare Interaktion im Caseinsystem bestimmt.

3.3 Einflüsse auf die Struktur und die Stabilität der Caseinmizelle

Caseinmizellen können nicht als statische Gebilde aufgefasst werden. Sie befinden sich vielmehr mit ihrer Umgebung in einem empfindlichen Gleichgewicht. Störungen in diesem Gleichgewicht wirken sich direkt oder indirekt auf die mizellare Stabilität bzw. auf das mizellare Caseinsystem aus. Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit Auswirkungen von Milieubedingungen, sprich Ionenstärke, pH-Wert oder Temperatur auf Caseinmizellen beschäftigen. Aber auch oder gerade hohe hydrostatische Drücke beeinflussen wegen der Modifikation nicht-kovalenter Bindungen im Besonderen die mizellare Struktur. In diesem Zusammenhang sollen abschließend Ansatzpunkte für den Druckeinsatz zur strukturellen Untersuchung der Caseinmizelle herausgestellt werden.

3.3.1 Ionen

Aufgrund der mizellaren Ladungsverhältnisse beeinflussen in erster Linie Kationen die mizellare Struktur. Integraler Mizellbestandteil ist Calcium in Form von Ca^{2+} oder CCP. Chelatbildner, wie EDTA, Citrat oder Oxalat, führen zu einer Veränderung des Calciumgleichgewichts der Milch. Calcium wird der Caseinmizelle entzogen, wodurch diese strukturell geschwächt wird und dissoziiert. Die Dissoziation der Caseinmizellen ist auf einerseits auf eine Zerstörung der Ca-Phosphat-Nanocluster und andererseits zusätzlich auf eine erhöhte elektrostatische Abstoßung zwischen Phosphoserinresten der Caseinmonomere zurückzuführen. Anders als bei einer Senkung des pH Wertes, wo die freiwerdenden negativen Ladungen der Phosphoserinreste durch H^+ -Ionen abgesättigt werden, können diese bei der Calciumkomplexierung durch Chelatbildner nicht mehr abgeschirmt werden und die Mizelle zerfällt (Udabage et al., 2000; Marchin et al., 2007; Horne, 2008).

Werden bei konstant gehaltener Ionenstärke einwertige Kationen wie Na^+ zugesetzt, wird durch Ionenaustausch mizellar gebundenes Ca^{2+} in den Caseinmizellen ersetzt. Da allerdings kein gleichzeitiger Anstieg des Phosphatgehaltes im Milchserum detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass die Calciumphosphatnanocluster durch den Ionenaustausch nicht zerstört wurden und nur Ca^{2+} in den Ionenaustausch involviert ist (Horne, 2008). Dennoch wird dadurch die innere Mizellstruktur gelockert und die Mizellhydratation gesteigert (Famelart et al., 1999).

Mehrwertige Kationen Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} senken zunächst den Serumcaseingehalt, indem freie Caseinmonomere mit Caseinmizellen über Salzbrücken verknüpft werden (Philippe et al., 2005). Darüber hinaus nimmt besonders bei der Zugabe von Calcium die optische Dichte der Caseinmizellsuspension zu, obwohl die hydrodynamischen Durchmesser annähernd unverändert bleiben (Philippe et al., 2003). Da mit der Zugabe von Calcium auch die Hydratation der Mizelle reduziert wird (Philippe et al., 2005), könnte die Verdichtung durch eine Verkleinerung der internen Hohlräume der Mizelle (siehe Modell von Dalgleish) über eine intensivere Caseinverbrückung oder durch die Einbindung der vorher serumständigen Caseinmonomere begründet werden. Zusätzlich wird generell bei der Zugabe von polyvalenten Kationen die Hitzestabilität der Caseinmizellen reduziert. Dies ist in erster Linie auf eine Reduzierung der mizellaren Oberflächenladung zurückzuführen.

Wird durch die Ionen- oder Salzzugabe die Ionenstärke im System erhöht, so ist eine Reduktion des Debye-Hückel-Parameters die Folge. Elektrostatische Interaktionen werden also noch stärker abgeschirmt (Horne, 2008) und die Stabilität des Mizellsystem wird, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, reduziert.

3.3.2 pH

Eine Absenkung des pH-Werts führt zu einer Solubilisierung des mizellar gebundenen Calciumphosphats. Dabei dissoziieren die Caseinmizellen jedoch nicht, da hydrophobe Wechselwirkungen oder Van-der-Waals Wechselwirkungen nicht beeinträchtigt werden (van Hooydonk et al., 1986; Horne & Davidson, 1986; Marchin et al., 2007). Die Koagulation der Caseinmizellen ist wieder auf ein Kollabieren der CMP-Schicht an der Mizelloberfläche zurückzuführen (Tuinier & de Kruif, 2002). Durch die pH-Absenkung wird die negative Ladung am CMP neutralisiert. Die Abstoßung zwischen den Peptidsträngen der „hairy layer“ nimmt ab und führt dazu, dass diese an der Mizelle anliegen und die so destabilisierten Caseinmizellen aggregieren (Fox & McSweeney, 1998; Horne, 2003; Donato et al., 2007; Horne, 2008).

Ein pH-Wert > 9 hingegen führt zum Zerfall der Caseinmizellen (Vaia et al., 2006). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In einem Erklärungsansatz werden einerseits eine Ladungsveränderung in den Caseinmonomeren und eine Veränderung der Lösungsmittelqualität durch den pH-Anstieg für den Mizellzerfall verantwortlich gemacht. Liegt der pH-Wert oberhalb des pI , werden saure AS-Seitenketten stärker ionisiert. Beispielsweise sind die Phosphoserinreste bei pH 9 zweifach negativ geladen. Als Folge können vorher ungeladene Moleküldomänen weniger stark durch hydrophobe Interaktionen interagieren, was deren Zusammenhalt lockert aber nicht alleine zur Mizelldissoziation führen kann. Denn aufgrund der verschlechterten Löslichkeit von Calciumphosphat (CaP) bei hohem pH (Vaia et al., 2006) werden die CaP-Nanocluster und deren Caseinbindung eher stabilisiert (Fox, 2006b). Die verschlechterte Calcium- und Phosphatlöslichkeit erhöht aber die Lösungsmittelqualität für Caseine was deren Protein-Protein-Wechselwirkungen weiter abschwächt und somit zum Mizellzerfall führt. Als Zerfallsprodukte würden dann individuelle oder verknüpfte CaP-Nanocluster mit den angebondenen Caseinen vorliegen (Vaia et al., 2006).

3.3.3 Temperatur

Erhitzung

Caseinmizellen werden generell als sehr hitzestabile Proteinkomplexe beschrieben. Mit steigender Temperatur sinkt jedoch die Löslichkeit von serumständigem Calciumphosphat. Es konnte gezeigt werden, dass das ausfallende Calciumphosphat bei steigender Temperatur an die Caseinmizellen anbinden kann. Die thermisch bedingten Veränderungen im Salzgleichgewicht sind bis zu einer Temperatur von 95 °C weitestgehend reversibel. Erst ab 120 °C und einer Haltezeit von 20 min sind irreversible Veränderungen in der Mizellstruktur zu detektieren. Phosphoserinreste können hydrolysiert werden (Gaucheron, 2005) und Calciumphosphat bildet unlösliches Tricalciumphosphat (Nelson Jr. et al., 1989) bzw. Hydroxylapatit (Visser et al., 1986).

Bei Erhitzungstemperaturen oberhalb von 120 °C konnte Bulca (2007) eine intermizellare Polymerisierung von Caseinen zeigen. Diese nimmt linear mit steigender Temperatur zu. Trotz der Polymerisierung nahm gleichzeitig mit steigender Erhitzungstemperatur auch der Gehalt an serumständigen α - (10 %), β - (20 %) und κ -Caseinen (70 %) zu. Die abdissoziierten Caseine liegen in Aggregaten unterschiedlicher Größe bis hin zu einzelnen Monomeren vor (Singh, 2004). Beide Phänomene hängen möglicherweise mit der thermischen Dephosphorylierung von Phosphoserinresten an den Caseinen zusammen (Singh, 2004).

Kühlung

Durch die Kühlung einer Caseinmizellsuspension werden hydrophobe Wechselwirkungen in der Caseinmizelle zunehmend geschwächt (Visser, 1992; Marchin et al., 2007). Dies führt zu einem verstärkten Übertritt von β -Casein aus der Mizelle in die Serumphase. Möglicherweise spielt auch der temperaturabhängige Konformationswechsel im β -Casein-Monomer eine Rolle, da dadurch die Assoziationsneigung und damit auch die Mizelleinbindung verändert werden können (siehe Abschnitt 3.1). Im Serum kann β -Casein sowohl als monomer oder in assoziierter Form, selbstassoziiertes β -Casein oder als β -Casein-Ca-Komplex vorliegen. Form und Größe der Caseinmizelle werden durch diesen Prozess nicht signifikant beeinflusst (Marchin et al., 2007). Allerdings beobachtet Gebhardt (2005) eine Vergrößerung der Verteilungsbreite in Caseinmizellen mit sinkender Temperatur. Der Serumübertritt von β -Casein ist reversibel. Mit steigender Temperatur wird es wieder in die Caseinmizelle inkorporiert (Dalgleish, 1998; Horne, 2008). Da β -Casein einen großen Anteil am Gesamtcasein hat, bewirkt die Reassoziation von β -Casein während einer Temperaturerhöhung von 10 auf 70 °C eine Vergrößerung des Molekulargewichts bei zuvor β -Casein abgereicherten Caseinmizellen (Gebhardt, 2005).

3.3.4 Druck

Wie in Abschnitt 2 ausführlich beschrieben, kann hoher hydrostatischer Druck gezielt zur Beeinflussung und Erzeugung von Proteinstrukturen genutzt werden. Besonders interessant ist die Wirkung des Hochdruckes im Zusammenhang mit der strukturellen Veränderung von Caseinen bzw. Caseinmizellen, da so Proteinstrukturen, insbesondere die mizellstabilisierenden, nicht kovalenten Bindungen ohne den Einsatz chaotroper Reagenzien reversibel oder irreversibel beeinflusst werden können.

Veränderungen in Caseinmizellen durch den Einsatz von hohem hydrostatischem Druck sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre. Die Palette der dabei eingesetzten Analysemethoden reicht von Trübungs- und Transmissionsmessungen (Huppertz et al., 2006; Huppertz & de Kruif, 2006), von dynamischer und statischer Lichtstreuung (Anema et al., 2005; Gebhardt et al., 2005; Gebhardt & Kulozik, 2011), über bildgebende Verfahren wie TEM- (Gaucheron et al., 1997; Garía-Risco et al., 2000; García-Risco et al., 2003) oder AFM-Messungen (Regnault et al., 2004; Gebhardt et al., 2006), bis hin zu spektroskopischen Untersuchungen (Hubbard et al., 2002; Gebhardt et al., 2011).

Je nach eingesetzter Technik können diese Beobachtungen ex-situ, also jeweils vor und nach der Behandlung, während der Druckapplikation, in-situ, oder über den gesamten Prozess erfolgen. Auf diese Weise konnte bereits gutes Bild über das Verhalten von Caseinmizellen unter Druck gezeichnet werden, das allerdings immer noch genügend Raum für Hypothesen und Spekulationen hinsichtlich der mizellaren Struktur, der Natur und chemischer Zusammensetzung der Zerfallsprodukte sowie des Dissoziationsverhaltens einzelner Caseinmonomere lässt.

Die Auswertung von TEM-Aufnahmen von Milch nach einer Hochdruckbehandlung zeigte, dass Behandlungsdrücke oberhalb von 300 MPa die mittleren Mizelldurchmesser von ursprünglich 150 bis 200 nm auf etwa 40 nm reduzieren (Lopez-Fandino, 2006). García-Risco et al. (2003) zeigten mit der gleichen Methode bereits beginnenden Mizellzerfall bei Drücken zwischen 150 und 200 MPa.

In-situ-Untersuchungen, also die Messung der Veränderungen während der Hochdruckbehandlung, eröffnen ein sehr viel detaillierteres Bild der Druckwirkung auf das mizellare Caseinsystem. Der starke Anstieg der Licht-Transmission durch eine Caseinmizellen-Suspension in einem Druckbereich von 100 – 400 MPa weist die Zerstörung der Caseinmizellen nach (Gebhardt, 2005; Gebhardt et al., 2006; Huppertz & de Kruif, 2007a; Huppertz & de Kruif, 2007b). Dabei beginnt der Mizellzerfall bereits während des Druckaufbaus. Je höher der aufgebrachte Druck ist, desto schneller und vollständiger läuft der Zerfall ab (Hinrichs, 2000; Gebhardt et al., 2006). Es wird vermutet, dass das in Lösung gehen von CCP die treibende Kraft für die druckinduzierte Zerstörung der Caseinmizellen ist (Schrader et al., 1997; Huppertz & de Kruif, 2007a). In der mizellaren Phase sind Calcium- und Phosphationen über elektrostatische Wechselwirkungen untereinander und mit Phosphoserseitenketten der Caseine verknüpft. Mit steigendem Druck werden derartige Wechselwirkungen gelöst, da sich aufgrund der Elektrostriktion freie, ungebundene Ionen stärker volumenreduzierend auswirken als Ionen im Wechselwirkungsverbund (siehe Abschnitt 2.3). Im Falle der Lösung von CCP führt dieses Freiwerden der Ionen zu einer Zerstörung der amorphen Calcium-Phosphat-Nanocluster bei gleichzeitigem Verlust der mizellaren Stabilität (Huppertz et al., 2006). Untersuchungen mittels P^{31} -Kernspinresonanzspektroskopie bestätigen diese Hypothese: Es konnte gezeigt werden, dass Milch unter Hochdruck einen konstant ansteigenden Gehalt an freien anorganischen Phosphaten sowie an freien Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen aufweist. Jedoch ist dieser Vorgang bei der Dekompression weitestgehend reversibel (Hubbard et al., 2002; Lopez-Fandino, 2006). Darüber hinaus führt die Schwächung bzw. das Lösen von hydrophoben (analog zu einer Temperaturabsenkung) und Van-der-Waals'schen Wechselwirkungen zu einem Verlust der mizellaren Integrität (de La Fuente, 1998; Considine et al., 2007; Huppertz & de Kruif, 2007; Gebhardt et al., 2011).

Eine erneute Trübung nach der Dekompression bei Prozessdrücken unterhalb von 250 bis 300 MPa lässt eine Reversibilität der Mizellzerstörung und eine Neubildung von Aggregaten in kolloidaler Größe vermuten. Dieser Prozess ist nicht beobachtbar bei Prozessdrücken oberhalb von 400 MPa, da möglicherweise ein Kern in Form von intakten oder partiell zerstörten Nanoclustern notwendig ist, um Caseinaggregate zu bilden. Diese Kerne scheinen aufgrund der kompletten Lösung von CCP bei Drücken über 300 MPa zu fehlen (Huppertz et al., 2004). Als Folge der strukturellen Veränderung der Caseinmizellen durch den aufgebrachten Druck konnte eine signifikante Zunahme des Serumcaseingehalts bzw. des Gehalts an nicht sedimentierbarem Casein in hochdruckbehandelten Milchproben detektiert werden. Auffallend war dabei, dass sich die Gehalte der einzelnen Caseinfraktionen annähernd umgekehrt proportional zu ihren Phosphorgehalten veränderten (Lopez-Fandino et al., 1998; Anema et al., 2005), was wiederum für die zentrale Rolle des Ausmaßes der CCP-Solubilisierung während der Mizelldissoziation und –Reassoziaton sprechen würde.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen auch Gebhardt et al. (2006, 2011). Messungen mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung ergaben, dass je nach Druckhöhe die Dissoziation unterschiedlich stark und ist bis zu einem gewissen Bereich reversibel erfolgt. Drei Druckbereiche konnten unterschieden werden, ohne dass dabei weiterreichende Aussagen über die Zusammensetzung der Mizellfragmente und das Dissoziationsverhalten einzelner Caseinfraktionen getroffen werden konnten:

- bis 50 MPa: Die Mizellen zerfallen nur partiell, das Streulichtsignal bleibt auf einem relativ hohen Level. Die Reassoziaton verläuft fast vollständig. Die so rückgebildeten Mizellen unterscheiden sich in ihrer Größe (100 bis 200 nm Durchmesser) fast nicht von den nativen Mizellen.
- bis 250 MPa: Die aus dem druckbedingten Mizellzerfall resultierenden Partikel sind kleiner. Die unter Druck vorliegenden Partikel bewegen sich im Größenbereich zwischen 10 bis 20 nm. Die bei der Reassoziaton nach der Druckentspannung gebildeten mizellaren Partikel sind deutlich kleiner als im nativen Zustande und weisen eine kompaktere Struktur auf (Durchmesser zwischen 80 und 120 nm).
- ab 300 MPa: Bedingt durch den Druck zerfallen die Mizellen fast vollständig und liegen vermutlich als monomere Caseine vor: Bei diesem Druckregime wird das Streusignalsignal am schwächsten. Die Reassoziaton erfolgt nur noch partiell. Die resultierenden Partikel bewegen sich nach der Druckbehandlung im Größenbereich zwischen 10 und 20 nm.

Neben der Druckhöhe und der Behandlungstemperatur muss im Zusammenhang mit der strukturellen Betrachtung der Caseinmizelle auch die Druckrampe geachtet werden. Wie Merel-Rausch et al. (2006, 2007) zeigen konnten, beeinflusst vor allem die Druckabbaugeschwindigkeit die Reassoziations der Caseine. Während bei sehr flachen Druckabbaurampen (20 MPa/min) nach Prozessende größere Caseinpartikel detektiert werden konnten, nahm die Partikelgröße mit steiler werdender Rampe (bis zu 600 MPa/min) ab. Für entsprechende Druckuntersuchungen und vergleichbare Aussagen ist demnach neben der Druckhöhe und der Behandlungstemperatur auch immer und vor allem die Druckabbaugeschwindigkeit anzugeben.

Ein besonderes Phänomen wurde bei langen Prozessdauern ($t > 30$ min) im Druckbereich von 250 bis 400 MPa von Huppertz et al. (2006) beobachtet. Nach einem anfänglichen Mizellzerfall während der ersten Phase der Druckbehandlung nahm die Trübung im Prozessverlauf wieder zu, was auf eine Reassoziations der Mizellfragmente bereits unter Druck hindeutet. Neben Milieubedingungen wie pH-Wert oder Temperatur ist die bereits unter Druck stattfindende Reassoziations sehr stark von der Caseinkonzentration abhängig und findet besonders ausgeprägt in konzentrierten Caseinsuspensionen statt (Huppertz & de Kruif, 2006). Mit abnehmender Caseinkonzentration wird der Effekt immer schwächer und ist ab einer Caseinkonzentration von 1,5 bis 2 g/L annähernd nicht mehr detektierbar. Huppertz & de Kruif (2006) beschreiben dieses Phänomen als lösungsmittelbedingte Aggregation. Da die Assoziationsneigung mit steigender Temperatur und sinkendem pH-Wert zunimmt, scheinen hydrophobe Wechselwirkungen bzw. die hydrophobe Hydratation und veränderte Ladungsverhältnisse an und zwischen den Mizellfragmenten ausschlaggebend zu sein. Besonders die unterschiedliche Kompressibilität von freiem und gebundenem Wasser könnte dabei eine Rolle spielen. Die Konzentrationsabhängigkeit und ein Fehlen der Reassoziations bei Prozessdrücken oberhalb von 450 MPa deuten ferner auf eine Beteiligung von CCP hin (Huppertz & de Kruif, 2006). Hierbei handelt es sich jedoch nur um Hypothesen, und der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden

4 Zielsetzung

Wie im vorangegangenen Abschnitt ersichtlich wird, ist die Struktur der Caseinmizelle und das Verhalten der einzelnen Caseine ein sehr komplexes Themengebiet, das nach wie vor seine Lücken aufweist und Raum für Spekulationen und Hypothesen lässt. Die Hochdrucktechnologie stellt aufgrund ihrer theoretischen aber auch dokumentierten Wirkung auf Caseinmizellen eine interessante und vielversprechende Methode dar, um Caseininteraktionen oder Vorgänge bei der Mizellbildung und Stabilisierung genauer zu ermitteln.

Während die Einflüsse von Temperatur, Ionenmilieu oder pH unter Normaldruck nicht durch die Zugänglichkeit zur Probe eingeschränkt sind, gestalten sich die Analysenmöglichkeiten unter Druck und damit auch detaillierte Einblicke hinsichtlich chemischer Parameter mitunter schwierig. Partikelgrößen, Trübung oder Ca-Solubilisierung sind auch unter Druck durch optische und spektroskopische Methoden vergleichsweise gut messbar. Doch vor allem die Ermittlung der Zusammensetzung der Zerfallsprodukte, das Verhalten einzelner Caseinfraktionen bei der Dissoziation oder aber auch die Erfassung der Vorgänge und Mechanismen bei der Reassoziaton und deren Beschreibung durch entsprechende Mizellmodelle gestalten sich schwierig (Horne, 2008).

Aufgrund der partiellen oder fast vollständigen Reversibilität zahlreicher druckbedingter Mizellveränderungen können Ex-situ-Analysen, beispielsweise im Bezug auf den Serumcaseingehalt oder auf die Partikelgrößen, lediglich als Indiz für die Vorgänge in der Mizelle unter Druck herangezogen werden. Auch ist nicht jede Ex-situ-Analysetechnik für den Einsatz unter Druck geeignet bzw. liefert dann keine entsprechend zielführenden Ergebnisse. Spektroskopische Untersuchungen beispielsweise erfassen immer den gesamten Druckkammerinhalt und liefern damit keine Auskunft über einzelne Mizellfragmente. Eine Konservierung des Zustandes des Mizellsystems unter Druck für eine spätere, detaillierte Ex-situ-Analytik ist ebenfalls schwierig. Zum Beispiel würde eine Viskositätserhöhung zwar diffusive Vorgänge bei der Mizellreassoziaton verlangsamen und damit möglicherweise für eine entsprechende Probenaufbereitung und Messung zugänglich machen, aber eben auch die Dissoziation verzögern. Da ferner die Caseinkonzentration konstant gehalten und eine Interaktion mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden müsste, kämen für die Viskositätserhöhung allenfalls Polysaccharide als Dickungsmittel in Frage. Doch sie können, beispielsweise wie Pektin oder Carrageenan, mit den Caseinen interagieren und das System so in unerwünschter Weise druckunabhängig verändern. Ferner ist das Phänomen der thermodynamischen Inkompatibilität von Proteinen und Polysacchariden bekannt, wonach sich beide Komponenten nicht in beliebigen Konzentrationen kombinieren lassen und was sehr schnell in einer Phasentrennung des Systems resultiert.

Ziel dieser Arbeit war es demnach, detaillierteres Wissen über das Dissoziations- und Reassoziationsverhalten der Caseinmizelle zu gewinnen:

- Im ersten Teil soll der Mizellzerfall und die daraus resultierenden Zerfallsprodukte ex-situ-detectierbar gemacht und daraus die Einbindung und Rolle der Caseinfraktionen im Mizellverband abgeleitet werden.
- Im zweiten Teil der Arbeit soll die Reassoziationsverhalten der Caseinmizellen nach der Druckbehandlung näher untersucht werden. Wegen seiner Schlüsselfunktion bei der Mizellstabilisierung stehen dabei das κ -Casein und seine Funktion als stabilisierender aber auch größenlimitierender Faktor im Fokus der Betrachtungen.

Dazu wurde folgender Lösungsweg gewählt:

Für die Untersuchung des druckbedingten Mizellzerfalls galt es zunächst, einen Versuchsaufbau sowie Methoden zu entwickeln, die eine Ex-situ-Charakterisierung der unter Druck freigesetzten Caseine und Caseinkomplexe ermöglichen. Dazu wurden diffusiv betriebene Membranen eingesetzt. Während die Membran für intakte Mizellen impermeabel ist, sollten die entstehenden Mizellfragmente der Theorie nach klein genug sein, um sie passieren zu können. Sie diffundieren aufgrund ihres Konzentrationsgefälles über die Membran, wobei größere Fragmente die Membran langsamer passieren als kleine Mizellfragmente und Caseinmonomere. So sollte durch die Diffusionsbarriere die Reassoziationsverhalten der bereits dissoziierten und diffundierten Caseinmizellfragmente und -monomere während des Druckabbaus verhindert und der Zustand unter Druck quasi „konserviert“ werden. Die Analyse der Konzentrationen der einzelnen Caseinfraktionen im Konzentratvolumen erlaubt dann Rückschlüsse auf deren Dissoziationsneigung bei variablen Druckstufen und Prozesstemperaturen und damit auch auf die Einbindung einzelner Caseinfraktionen in den Mizellverband bzw. auf die Zusammensetzung der druckbedingten Mizellzerfallsprodukte.

Für die Beurteilung des Reassoziationsverhaltens wurde der Weg einer enzymatischen Spaltung und damit funktionellen Modifikation von κ -Casein unter Druck gewählt. Zunächst musste allerdings die Druckwirkung auf Chymosin ermittelt werden. Vor allem der Effekt auf Aktivität, Spezifität und Enzymkinetik müssen für einen zielgerichteten Einsatz des Enzyms zur funktionellen Modifikation von κ -Casein unter Druck bekannt sein. Nur so ist es möglich, geeignete Prozessparameter wie Druckhöhe, Prozesstemperatur und –Dauer zu wählen. Erst danach kann der Effekt der Hydrolyse auf die Reassoziationsverhalten der Caseinmizelle ermittelt und im Kontext bestehender Mizellmodelle diskutiert werden.

5 Material und Methoden

Im Anhang sind detaillierte Listen der verwendeten Chemikalien, Materialien sowie der Geräte und Anlagen mit Angaben zur jeweiligen Verwendung und zum Hersteller in tabellarischer Form dargestellt.

5.1 Caseingewinnung

5.1.1 Gewinnung von UF-Permeat

Zum Waschen und Resuspendieren sowie für Casein- und Enzymverdünnungen wurde UF-Permeat verwendet, das aus pasteurisierter Magermilch gewonnen wurde. Dabei wird Milch tangential über ein Membranwickelmodul mit einem molekularem cut-off (MWCO) von 10 kDa gefördert und durch Anlegen eines transmembranen Druckgefälles filtriert. Caseinmizellen, die in der Magermilch noch enthaltenen kleinen Fettkugeln sowie die Molkenproteine werden dabei zu mehr als 99 % zurückgehalten, während Laktose und Milchmineralien, wie Ca, Na oder K die Membran passieren können. Das mit UF-Permeat bezeichnete Endprodukt zeichnet sich durch eine milchidentisches Ionenmilieu aus, während der Gehalt an majoren Molkenproteinen (gemessen mittels RP-HPLC) unter 0,1 % liegt.

5.1.2 Caseingewinnung im Großmaßstab für die Inaktivierungsversuche von Chymosin, sowie zur Bestimmung der Enzymkinetik von Chymosin unter hohem hydrostatischen Druck

Für die Vorversuche zur enzymatischen Modifikation wurde wegen des benötigten größeren Probenumfangs auf getrocknetes mizellares Caseinpulver zurückgegriffen. Aufgrund der thermischen Belastung bei der Sprühtrocknung und den damit möglicherweise verbundenen Veränderungen in der Caseinmizelle wurde dieses Pulver nicht für die Versuche zur Dissoziation bzw. zur Reassoziaton nach enzymatischer Modifikation von κ -Casein verwendet.

Das Pulver wurde nach der von Tolkach & Kulozik (2005) beschriebenen Methode in einem Diafiltrationsprozess (acht Diafiltrationsschritte) gewonnen. Dabei werden Mikrofiltration (mittlerer Porendurchmesser 100 nm) und Ultrafiltration (MWCO 25 kDa) miteinander nach dem in Abb. 5.1 dargestellten Schema kombiniert. In der MF-Anlage wird das Casein angereichert, während die Molkenproteine zunehmend ausgewaschen und in der UF-Anlage zurückgehalten werden. Über die Erfassung

des zirkulierten Volumens sowie des Initialvolumens des Magermilchkonzentrates werden die Diafiltrationsschritte erfasst.

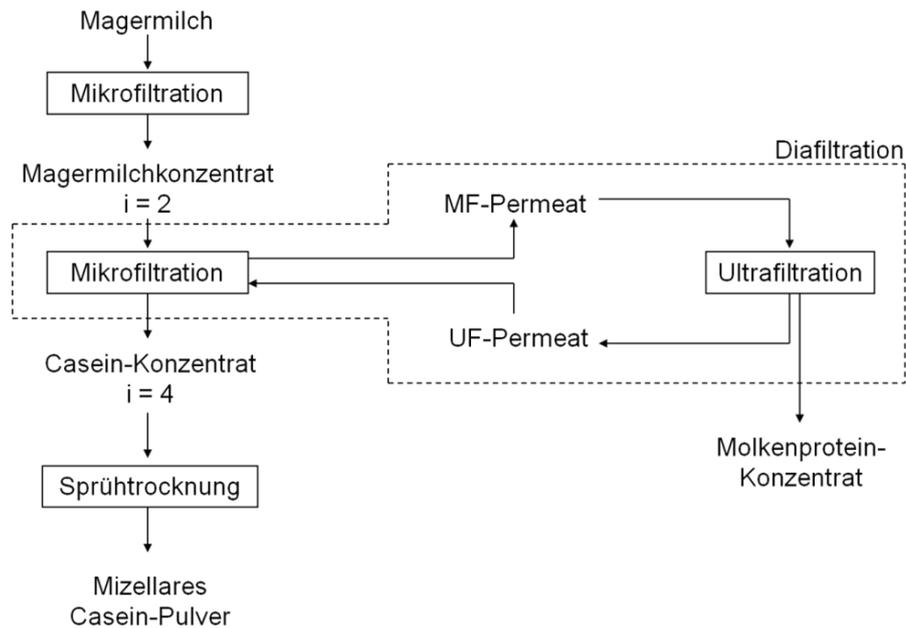


Abb. 5.1: Fließschema zur Gewinnung von mizellarem Casein-Pulver

Nach einer abschließenden Konzentrierung wurde das Konzentrat sprühgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung kühl und dunkel gelagert. Die genaue Zusammensetzung des Pulvers ist in Tab. 5.1 angegeben.

Tab. 5.1: Mittlere Zusammensetzung des gewonnenen Caseinpulvers

| Inhaltsstoff | Anteil [% (w/w)] |
|-------------------------|------------------|
| Gesamtprotein (LECO) | 58,8 |
| Molkenprotein (RP-HPLC) | 0,06 |
| Laktose | 26,5 |
| Asche | 8,7 |
| Restwasser | 5,9 |

5.1.3 Zentrifugale Caseingewinnung aus Magermilch

Natives, mizellares Casein wurde aus pasteurisierter Magermilch durch Ultrazentrifugation gewonnen. Zur vollständigen Erfassung der Caseinfraktion wurde die Magermilch bei pH 6,8 auf 25 °C temperiert, auf 8 Zentrifugengläschen à 30 g verteilt und anschließend für 65 min mit 70741 g_a bei dieser

Temperatur zentrifugiert. Die Zentrifugalbeschleunigung ergibt sich aus der Geometrie des Festwinkelrotors in der Zentrifuge sowie der Drehzahl von 31000 min^{-1} . Nach der Zentrifugation wurde der Zentrifugationsüberstand abdekantiert, gewogen und verworfen. Das entstandene Pellet wurde in der gleichen Menge UF-Permeat mit pH 6,8 resuspendiert und zur vollständigen Lösung bei 37 °C für 2 h unter Rühren inkubiert. Zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums wurden der Lösung 0,02 % (w/w) NaN_3 zugesetzt.

5.1.4 Zentrifugale Größenfraktionierung von Caseinmizellen

Bei der Größenfraktionierung der abzentrifugierten Caseinmizellen wurde nach einem modifizierten Zentrifugationsprotokoll von Marchin et al. (2007) gearbeitet. Nachdem die extrahierte Caseinprobe vollständig resuspendiert ist, wird die Versuchslösung sukzessive mit steigenden g_a -Zahlen zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und jeweils für die weiteren Zentrifugationsschritte verwendet. Das Pellet wurde nach den ersten vier Zentrifugationen jeweils in 30 g UF-Permeat, nach der fünften in 15 g und nach der sechsten Zentrifugation in 10 g UF-Permeat resuspendiert und anschließend wieder bei 37 °C unter Rühren für 2 h bei pH 6,8 inkubiert. Zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums werden den Lösungen erneut jeweils 0,02 % (w/w) NaN_3 zugesetzt. Tabelle 5.2 stellt zusammenfassend die einzelnen Zentrifugationsschritte zur Extraktion und Größenfraktionierung der Caseinmizellen aus pasteurisierter Magermilch dar.

Tab. 5.2: Modifiziertes Zentrifugationsprotokoll nach Marchin et al. (2007) zur Extraktion und Größenfraktionierung von Caseinmizellen aus pasteurisierter Magermilch

| Arbeitsschritt | Drehzahl [min^{-1}] | Zentrifugalbeschleunigung $\times g_a$ | Zeit [min] |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|------------|
| Zentrifugale Gewinnung aus Magermilch | 31 000 | 70 741 | 65 |
| Fraktionierung | | | |
| Fraktion I | 12 000 | 10 596 | 17 |
| Fraktion II | 15 000 | 16 556 | 17 |
| Fraktion III | 20 000 | 29 434 | 18 |
| Fraktion IV | 25 000 | 45 990 | 18 |
| Fraktion V | 29 000 | 61 884 | 18 |
| Fraktion VI | 31 000 | 70 741 | 65 |

Nach der Gewinnung und Fraktionierung wurden die Caseinfraktionen hinsichtlich ihres Proteingehaltes, ihrer Caseinzusammensetzung, ihrer Partikelgrößen und ihres Zeta-Potentials näher untersucht.

5.1.5 Gewinnung von Caseinmizellen mit reduzierter Verteilungsbreite

Für die Dissoziationsversuche in keramischen Röhrenmembranen unter hohem Druck wurden die Caseinmizellen in einer verkürzten, dreistufigen Zentrifugation gewonnen, gewaschen und ein milchähnliches Puffersystem überführt. Im ersten Aufreinigungsschritt wurde pasteurisierte Magermilch erneut bei pH 6,8 auf 25 °C temperiert und für 18 min bei 26564 g_a (19000 min⁻¹) bei dieser Temperatur in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das entstandene Zentrifugationspellet wurde in UF-Permeat überführt und für 2 h bei 37 °C resuspendiert. Dabei wurde der Überstand abermals durch die gleiche Menge an UF-Permeat ersetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 26564 g_a (19000 min⁻¹) und 25 °C wurde der Zentrifugationsrückstand in 25 g 0,1 M TRIS/MES-Puffer (basierend auf Gebhardt et al. (2006)), modifiziert mit 7,5 mM CaCl₂ zur besseren Adaption an das Milchsyste, bei 37 °C für 2 h gelöst. Im letzten Schritt wurden größere Proteinaggregate, nicht vollständig resuspendierte Caseinmicellen und Staubpartikel durch eine Zentrifugation bei 25 °C und 4709 g_a (8000 min⁻¹) entfernt. Der Proteingehalt der Lösung wurde bestimmt und für die weiteren Versuche mit Puffer auf die gewünschte Proteinkonzentration von 2,0 % eingestellt.

5.2 Probenbehandlung

Die Druckversuche wurden in einer Pilotanlage der Firma Bolenz und Schäfer durchgeführt. Die Anlage besitzt ein Nutzvolumen von 200 ml und kann in einem Temperaturbereich zwischen 5 und 80 °C mit Drücken von bis zu 800 MPa betrieben werden. In Abb. 5.2 ist das Anlagenschema dargestellt. Wie zu erkennen, besitzt die Anlage drei Druckkreisläufe (grün, rot und braun eingefärbt), um die erforderlichen Drücke zu erreichen.

Mittels eines druckluftgetriebenen Druckübersetzers (Arbeitsdruck = 0,4 bar, Übersetzungsverhältnis = 1:400) wird der Hochdruckkreislauf (rot) inklusive Druckbehälter befüllt, entlüftet und ein Vordruck von maximal 160 MPa aufgebaut. Mit dem dritten Kreislauf (braun) wird der Hochdruckübersetzer betrieben, der den Vordruck entsprechend vervielfacht und den maximalen Arbeitsdruck von bis zu 800 MPa aufbaut. Daneben dient der Hydraulikkreislauf zur Steuerung bewegter Anlagenteile, d.h. dem Öffnen und Verschließen sowie dem Sichern des Druckbehälters.

Um den niedrig legierten Stahl des Druckbehälters sowie die Gummidichtungen zu schonen, wird als Druckübertragungsmedium eine Mischung aus 40 % aus Univis J13, 30 % Diesel und 30 % Petroleum besteht. Darüber hinaus ist hier gewährleistet, dass der flüssige Aggregatzustand im gesamten Druckbereich beibehalten wird (Hinrichs, 2000).

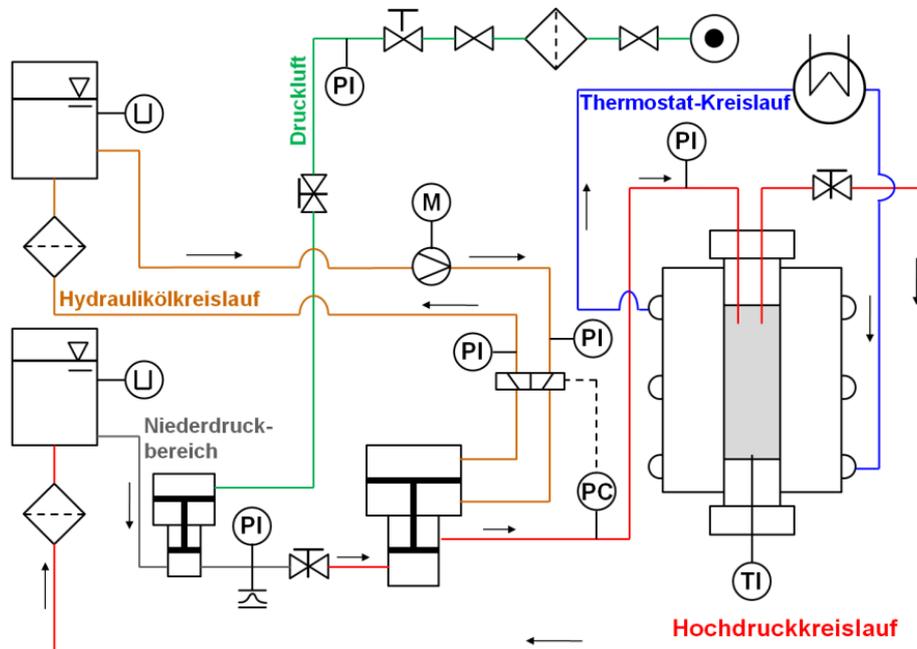


Abb. 5.2: Anlagenschema der Pilot-Hochdruckanlage

In der elektrischen Steuereinheit befindet sich eine Speicherprogrammierbare Steuerung, kurz SPS. Die Versuchsparameter Druck und Zeit werden über einen Programmregler entsprechend vorgegeben. Für alle Druckversuche wurde die Druckaufbau- sowie die Druckabbaurate konstant bei 200 MPa/min gehalten. Bei langen Druckhaltezeiten ($t > 5$ min) gliedert sich die Prozesszeit unter Druck in eine Regelzeit, in der der Druck über die Hydraulik geregelt und konstant gehalten wird sowie eine reine Haltezeit. In dieser Zeit wird der Druckbehälter abgeschottet und das Hydraulikaggregat kann entsprechend ausgeschaltet werden. Der Druckverlust innerhalb der reinen Haltezeit bewegt sich mit 2 bis 5 % des Arbeitsdruckes innerhalb einer vernachlässigbaren Größenordnung. Für konstante Temperaturbedingungen sorgt ein Thermostat des Typs Haake F3 CH.

Alle Proben für die Hochdruckbehandlung wurden in HDPE-Kunststoffbehälter (Fassungsvermögen 3 ml, 30 ml oder 60 ml) gefüllt und mit Gummistopfen blasenfrei verschlossen. Anschließend werden die Behälter mit Parafilm doppelt versiegelt und in LDPE-Folie zweimal vakuumiert (80 – 90 HPa).

5.2.1 Untersuchungen zum druckbedingten Dissoziationsverhalten von Caseinmizellen

Vorversuche zur Membranauswahl und zur Validierung des Setups

Für die Herleitung des formalkinetischen Ansatzes zur Beschreibung der Caseindiffusion wurde zunächst ein Zweikammersystem mit einspannbaren Polymermembranen (Spectrapor, MWCO 5 bis 8 kDa) verwendet. Als Modellsubstanzen dienten einfache Salzlösungen (CaCl_2 , KCl, NaCl) in unterschiedlichen Konzentrationen. Für die Versuche wurden Membranplättchen mit Gummidichtungen fixiert und in die Halterung eingespannt. Die Salzlösung wurde anschließend blasenfrei in eine Kammerseite eingüllt und verschlossen. Die zweite Kammer wurde mit Millipore-Wasser gefüllt und ebenfalls verschlossen. Anschließend wurde das so vorbereitete Modul bei 0,1 MPa und 20 °C bis zu 30 h gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde der Diffusionsprozess abgebrochen und anschließend die Mineralienzusammensetzung in den Lösungen sowohl konzentrat- als auch dialysatseitig flammenphotometrisch bestimmt.

Für die Druckversuche wurde das Membranmodul in gleicher Weise vorbereitet und in LDPE-Schlauchbeutel folie verpackt. Die Lagerung erfolgte bei 200 MPa und 20 °C für bis zu 5 h. Auch bei den Druckversuchen wurde der Diffusionsprozess nach unterschiedlichen Prozesszeiten abgebrochen und anschließend sowohl konzentrat- als auch dialysatseitig die Mineralienkomposition in den Lösungen über Flammenphotometrie bestimmt.

Für den Einsatz keramischer Membranen wurde ein Modul benutzt, in das Einkanal-Membransegmente (atech innovations, Gladbeck) mit einer Länge von 50 mm eingespannt werden konnten (siehe Anhang B, Abb. 10.3). Verwendet wurden zunächst Membranen mit einem MWCO von 10, 60 und 100 kDa. Die Diffusion der Salzbestandteile wurde nach o.g. Vorgehen sowohl bei 0,1 MPa als auch bei 200 MPa erfasst.

Bei der Validierung der Membranen mit einer nominellen Trenngrenze von 50 nm wurde als Modellsubstanz eine in HPLC-Probenpuffer (siehe Tab. 5.3) vollständig dissoziierte Caseinmizellsuspension verwendet. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens beim Befüllen und Inkubieren der keramischen Membransegmente ist im Folgenden angegeben.

Dissoziationsversuche

Das Schema zum Ablauf der Versuche ist in Abb. 5.3 dargestellt. Verwendet wurden keramische Einkanalmembranen aus SiO_x mit einer nominellen Trenngrenze von 50 nm. Die Standardmembranen wurden auf eine Länge von 50 mm gebracht, was einem ungefähren Fassungsvermögen im Membraninnenraum von 1 ml entspricht.

Für eine vollständige Membranbenetzung wurden sie vor ihrer Befüllung für 5 min in enthärtetes Wasser getaucht. Die Membranen wurden von unten mit einem Gummistopfen verschlossen und anschließend mit einer größenstandardisierten Caseinsuspension (siehe Abschnitt 5.1.5) so befüllt, dass am oberen Rand ein Flüssigkeitsmeniskus entstand. Der obere Gummistopfen wurde dort anschließend blasenfrei aufgesetzt und vorsichtig festgedrückt. Anschließend wurden jeweils vier befüllte und verschlossene Membranröhrchen in einen mit entsprechenden Vertiefungen ausgestatteten Teller gesetzt und von oben ebenfalls mit einem solchen Teller versehen. Durch die Verschraubung der beiden Teller über eine Gewindestange (handfest) erfolgte die Fixierung der Proben in der Halterung.

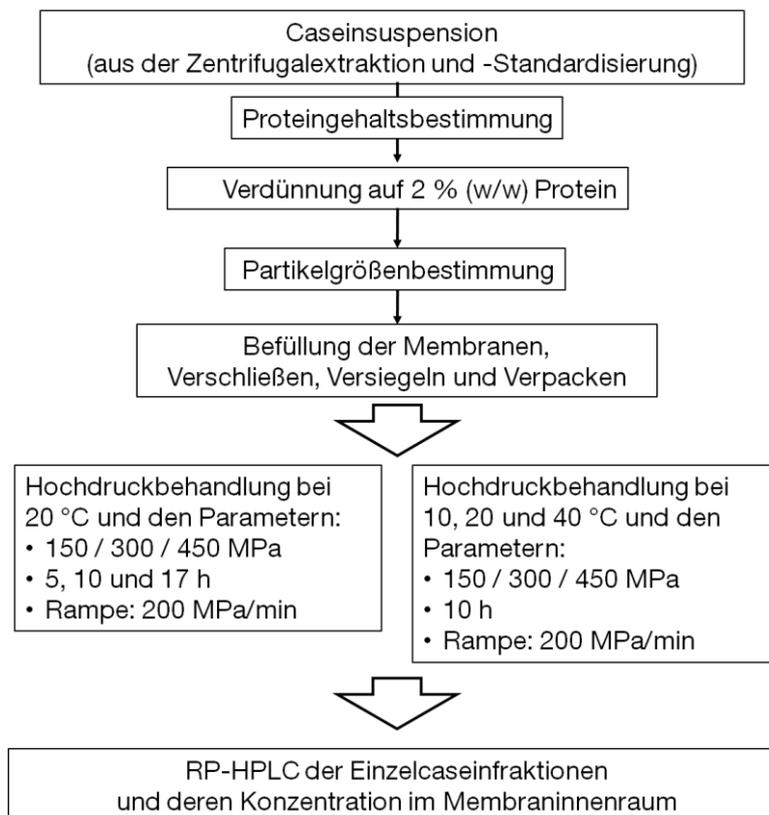


Abb. 5.3: Versuchsschema zur Druckdissoziation von Casein unter Hochdruck

Nach der Fixierung wurde die gesamte Membranhalterung mehrmals in enthärtetem Wasser gespült, um außen an der Membran anhaftende Caseinrückstände abzuwaschen. Anschließend wurden die verschlossenen Membranröhrchen blasenfrei in ein mit caseinfreiem TRIS/MES-Puffer (siehe Abschnitt 5.1.5) gefülltes Probengefäß eingebracht, verschlossen und wie beschrieben versiegelt. Die Proben wurden mit 150, 300 und 450 MPa jeweils bei Temperaturen von 10, 20, 40 °C behandelt. Die Erfassung des zeit- und druckabhängigen Caseindurchtritts durch die Membran erfolgte bei Prozess-

zeiten von 5, 10 und 17 h bei 20 °C. Das temperaturabhängige Dissoziationsverhalten der Caseinmizellen wurde nach einer Standardprozesszeit von 10 h bestimmt.

5.2.2 Enzymatische Modifikation von Caseinmizellen unter Druck

Untersuchungen zur hydrostatischen Chymosin-Inaktivierung

Für die Versuche zur Chymosinaktivierung wurde ein reines Enzympräparat (Maxiren 180) eingesetzt. Da diese Versuche die Grundlage für einen späteren Einsatz des Enzyms unter Hochdruck darstellen, sollte Chymosin in einem milchähnlichen System untersucht und näher charakterisiert werden.

Dazu wurde das Enzym in UF-Permeat bei pH 6,8 auf unterschiedliche Konzentrationen (0,0005 %, 0,001 %, 0,002 %, 0,005 %, 0,02 % und 0,05 %) verdünnt. Die 0,02 %ige Chymosinlösung wurde für die Bestimmung der hydrostatischen Inaktivierung verwendet. Das Schema zum Ablauf der Versuche ist in Abb. 5.4 dargestellt.

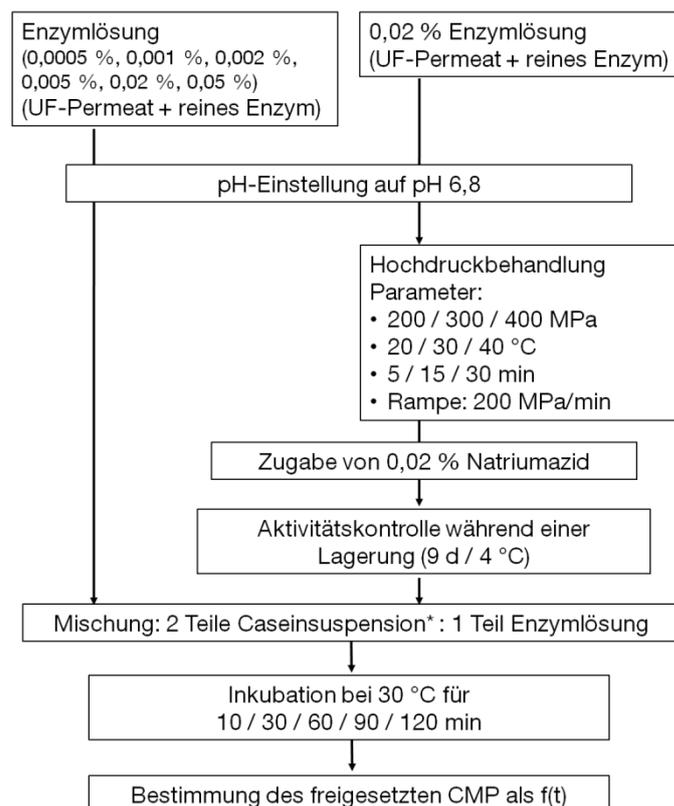


Abb. 5.4: Versuchschemata zur Untersuchung der thermischen und hydrostatischen Inaktivierung von Chymosin (*zur besseren Übersicht wurde das Vorgehen zur Herstellung der 3%igen Caseinsuspension in Abb. 5.5 zur Bestimmung der Chymosinkinetik unter Druck eingearbeitet)

Zur Untersuchung der Enzymaktivität vor und nach der Prozessierung diente mizellares Caseinpulver als Substrat. Das Pulver wurde mit einem Gewichtsanteil von 3 % in UF-Permeat bei pH 6,8 suspendiert. Zur vollständigen Hydratisierung wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C unter Rühren gelagert. Zur Entfernung größerer, ungelöster Pulverbestandteile wurde die Lösung vor den Versuchen durch ein feines Metallsieb passiert.

Zum Start der enzymatischen Reaktion wurden sowohl die behandelte als auch die unbehandelten Enzymlösungen mit der vorbereiteten Caseinsuspension bei pH 6,8 im Verhältnis 1:2 vermischt. Anschließend wurden mit fortschreitender Reaktion zu unterschiedlichen Zeiten (10, 30, 60, 90, 120 min) 1 ml-Aliquote entnommen und durch die Zugabe von 20 µl Perchlorsäure angesäuert. Durch den rapiden pH-Abfall wird Chymosin unmittelbar inaktiviert und Casein ausgefällt. Das in Lösung verbleibende CMP kann nach einer Zentrifugation (15000 g_a für 20 min) im Überstand direkt mittels RP-HPLC bestimmt werden. Zur Untersuchung der Reversibilität der Inaktivierung wurde die Enzymaktivität während einer Lagerung von 9 Tagen bei 4 °C alle 2 Tage erneut überprüft. Zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums während der Lagerung wurde die Enzymlösung mit 0,02 % (w/w) NaN₃ versetzt.

Bestimmung der Chymosinkinetik unter Druck

Bei der Bestimmung der Reaktionskinetik unter Druck zeigte sich, dass die Enzymaktivität unter Druck so stark einbrach, dass für die Aufnahme der formalen Reaktionskinetik unter Druck die Chymosinkonzentration in der Enzymlösung auf 0,05 % erhöht werden musste. Die Versuche folgten dem in Abb. 5.5 dargestellten Schema.

Die Enzymlösung wurde im Verhältnis 2:1 mit einer 3 %igen Caseinsuspension (für die Vorbereitung siehe Abschnitt 5.1) vermischt, in 3 ml-Probengefäße gefüllt und wie oben beschrieben für die Hochdruckbehandlung vorbereitet. Das Chymosin-Caseinverhältnis betrug somit $8,3 \cdot 10^{-3}$ g Enzym/g Casein. Da die Reaktion unmittelbar mit der Zugabe der Enzymlösung gestartet wird, musste die Druckbeaufschlagung entsprechend zügig erfolgen (in den Versuchen betrug die mittlere Zeit vom Vermischen bis zum Beginn des Druckaufbaus $6,7 \pm 0,7$ min).

Parallel zu den druckbeaufschlagten Proben wurden Referenzproben in der gleichen Weise vorbereitet und bei Atmosphärendruck inkubiert. Unmittelbar nach der Hochdruckbehandlung bzw. zu den entsprechenden Inkubationszeiten bei Atmosphärendruck wurden wieder 1 ml-Aliquote der Proben durch die Zugaben von 20 µl Perchlorsäure angesäuert und wie beschrieben für die HPLC-Bestimmung des freigesetzten CMP vorbereitet.

Für eine genaue Erfassung der Chymosinreaktion unter Druck mussten parallel zu den Druckproben die CMP-Gehalte zu Beginn des Druckaufbaus (Vorhydrolyse) und am Ende des Druckabbaus bei den atmosphärisch inkubierten Proben bestimmt werden. Zusätzlich musste die maximal freisetzbare CMP-Menge für jede Caseinsuspension durch natives Enzym erfasst werden.

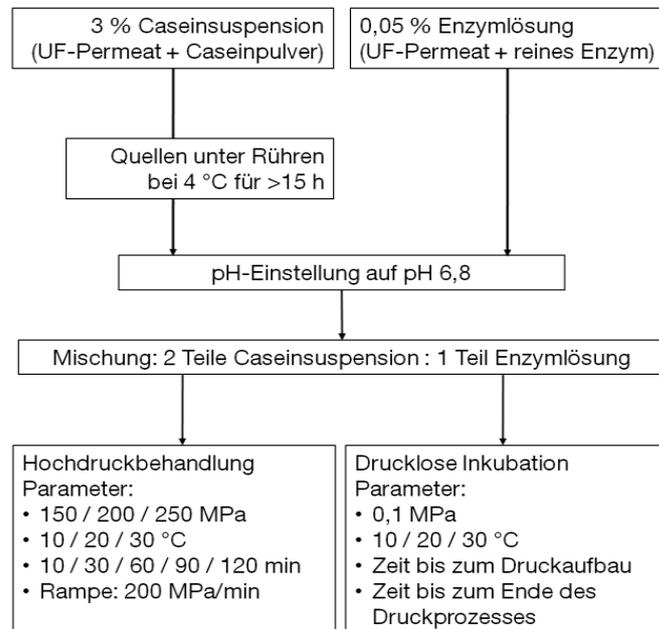


Abb. 5.5: Versuchsschema zur Bestimmung der Chymosinreaktion unter Hochdruck

Versuche zur Partialhydrolyse von κ -Casein unter Druck

Die Versuche zur Partialhydrolyse von κ -Casein und deren Einfluss auf das Reassoziationsverhalten der Caseinmizellen wurden bei 150 MPa bzw. 200 MPa durchgeführt. Je nach Druckhöhe und damit je nach Enzymaktivität wurden Druckhaltezeiten von 20, 40, 60 und 120 min bei 150 MPa bzw. 40, 60, 120 und 240 min bei 200 MPa realisiert. Bei jedem Versuchsdurchlauf wurden pro Fraktion je drei Proben vorbereitet: Eine Blindprobe ohne Enzymzusatz, eine Druckprobe sowie eine Probe zur Bestimmung der drucklosen Vorhydrolyse.

Um von einem möglichst nativen Caseinsystem auszugehen, wurde hier mit Caseinmizellen gearbeitet, die zentrifugal aus Magermilch gewonnen wurden. Vor den Versuchen wurden die Mizellen durch Zentrifugation nach ihrer Größe in sechs Gruppen fraktioniert (siehe Abschnitt 5.1.4). Da der relative κ -Caseingehalt in Caseinmizellen umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist, sollte so die Schlüsselfunktion des κ -Caseins als größenlimitierender Faktor bei der Caseinreassoziaton herausgestellt werden.

Darüber hinaus wurden durch die Fraktionierung die Verteilungsbreiten in den Mizelfractionen reduziert und kleinere Verschiebungen innerhalb der Partikelpopulation wurden leichter detektierbar. Für die Versuche wurden die Fraktionen II (sedimentierbar bei 16556 g_a) und IV (sedimentierbar bei 45900 g_a) gewählt. Einerseits unterschieden sie sich deutlich hinsichtlich ihrer Partikelgrößen und andererseits lag die Ausbeute bei ihrer Gewinnung in einer akzeptablen Größenordnung. Das Schema zum Ablauf der Versuche ist in Abb. 5.6 dargestellt.

Für ein konstantes Chymosin-Caseinverhältnis wurde zunächst der Proteingehalt in den Caseinproben bestimmt. Anschließend wurde die erforderliche Enzymmenge in die Reaktionsgefäße (3 ml) eingewogen und für 30 min bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das Gefrieren hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität und kann deshalb vernachlässigt werden.

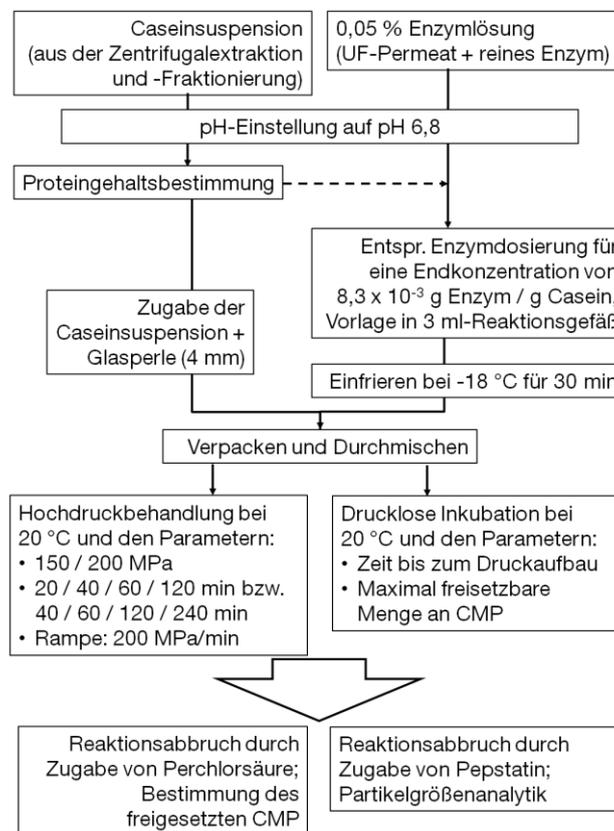


Abb. 5.6: Versuchsschema zur Partialhydrolyse von κ -Casein unter Hochdruck

Nach dem Gefrieren wurde die jeweilige Caseinsuspension zur Enzymlösung gegeben. Zusätzlich wurde eine Glasperle (Durchmesser 4 mm) für eine bessere Durchmischung beim Schütteln eingebracht. Anschließend wurden die Proben wie bereits beschrieben für die Hochdruckbehandlung vorbereitet, zur homogenen Durchmischung geschüttelt und zügig in den Autoklaven eingebracht. Parallel wurden identische Proben drucklos inkubiert. So konnte erneut die drucklose Vorhydrolyse bzw. die maximal mögliche Hydrolyse innerhalb der Probe bestimmt werden.

Nach Abschluss der Hochdruckbehandlung wurde die Probe geteilt. 1 ml wurde mit Perchlorsäure angesäuert, um, wie bereits beschrieben, die Menge an freigesetztem CMP mittels RP-HPLC zu bestimmen. Da Perchlorsäure jedoch zu einer kompletten Zerstörung der mizellaren Struktur führt, musste das Enzym in den Lösungen für die Partikelanalytik anderweitig inaktiviert werden. Dazu wurden zu weiteren 1 ml behandelte Probe 105 µl ethanolische Pepstatinlösung (1 mg/ml) gegeben. Pepstatin, ein mikrobielles Pentapeptid, hemmt selektiv Aspartat-Endopeptidasen (Produktdatenblatt). Zur Bestimmung des Ethanoleinflusses auf die Partikelgröße wurden parallel behandelte Blindproben – Caseinsuspensionen die vor der Behandlung nur mit UF-Permeat verdünnt wurden – ebenfalls mit 105 µl Ethanol versetzt und auf ihre Partikelgrößen hin untersucht.

5.3 Analysen

5.3.1 Methode zur Analytik der einzelnen Caseinfraktionen mittels RP-HPLC

Die qualitative und quantitative Erfassung der einzelnen Caseinfraktionen α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein erfolgte auf der Basis des Vorgehens von Bonfatti et al. (2008) und Bonizzi et al. (2009). Die Erarbeitung und Adaption der Methode war Grundvoraussetzung zur Ermittlung des druckabhängigen Dissoziationsverhaltens einzelner Caseinfraktionen. Der Übersichtlichkeit wegen ist dieser Teil deshalb im Material- und Methodenteil detaillierter aufgeführt.

Probenpuffer und Gradientenelution

Der in o.g. Arbeiten entwickelte Puffer für die Probenvorbereitung konnte direkt übernommen werden. Seine Zusammensetzung sowie die Funktion der einzelnen Komponenten sind in Tab.5.3 angeführt.

Tab. 5.3: Probenvorbereitungspuffer für die HPLC-Analytik von Caseinen nach Bonizzi et al. (2009)

| Komponente | Konzentration [M] | Funktion |
|---|-------------------|---|
| TRIS (Trishydroxymethyl-aminomethan) | 0,165 | Pufferung der Lösung |
| Harnstoff | 8,000 | Aufbrechen hydrophober Wechselwirkungen, Proteinauffaltung |
| Natrium-Citrat | 0,044 | Calciumkomplexierung; Aufbrechen von Calciumphosphatbrücken |
| β -Mercaptoethanol | 0,3 % (v/w) | Reduktive Spaltung von Disulphidbrücken |

Bei einer erwarteten Gesamtcaseinkonzentration von rund 30 g/L werden für die Analyse 400 μL der zu untersuchenden Lösung mit 1600 μL Probenpuffer gemischt und anschließend durch einen Einmalfilter (Porenweite 0,45 μm) direkt in die HPLC-Vials gefüllt. Bei der Analytik von Vollmilch und anderen fetthaltigen Produkten müssen diese vor der Aufbereitung entsprechend entfettet werden.

Die Trennung der Caseine erfolgt auf einer Säule des Typs Zorbax 300SB– C18. Bonizzi et al. (2009) verwenden zur Gradientenelution reine Laufmittel (Acetonitril und Wasser). Wie von Gottwald (1993) beschrieben, kann dies jedoch in der Mischkammer der HPLC-Einheit zu einem Ausgasen der Lösungsmittel führen, was die Trennleistung des Systems reduziert. Aus diesem Grund werden in der adaptierten Methode im Gegensatz zu Bonizzi et al. (2009) Vormischungen aus polarer und apolarer Phase verwendet, um vergleichbare Elutionsbedingungen einzustellen:

Laufmittel A besteht aus 10 % Acetonitril in destilliertem Wasser mit 1mL/L Trifluoressigsäure (TFA).

Laufmittel B besteht aus 90 % Acetonitril in destilliertem Wasser mit 0,7 mL/L TFA.

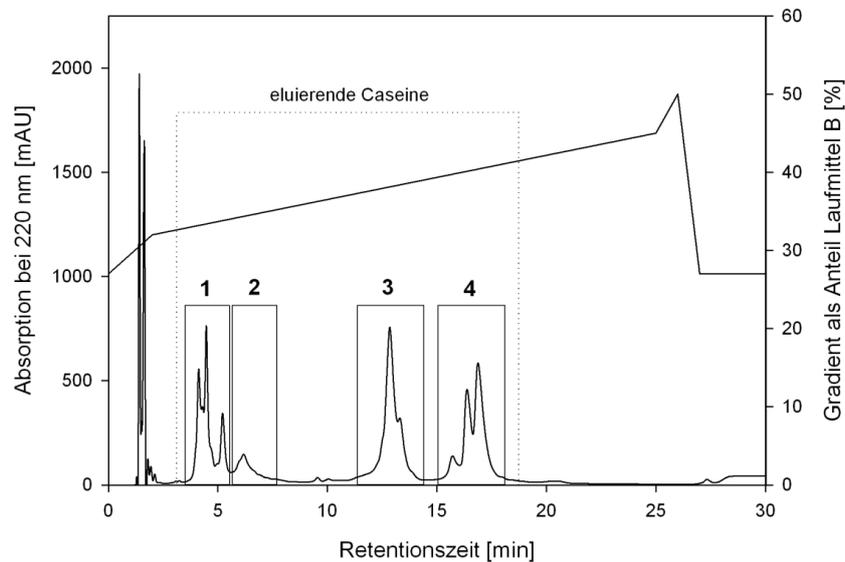


Abb. 5.7: Elutionsprofil der Caseine in Magermilch mit zugehörigem Laufmittel-gradienten

In Abbildung 5.7 ist exemplarisch das Elutionsprofil einer Magermilchprobe mit dem zugehörigen Laufmittelgradienten dargestellt. Anhand der Elutionsprofile von Bonizzi et al. (2009) sowie mit Hilfe von kommerziellen Standards der einzelnen Caseinfractionen konnten die einzelnen Peaks identifiziert werden als κ -Casein (1), α_{S2} -Casein (2), α_{S1} -Casein (3) und β -Casein (4).

Kalibrierung für die quantitative Caseinerfassung

Die Kalibrierung erfolgte auf der Basis kommerziell erhältlicher Einzelcaseinstandards mit angegebenen Reinheiten >70 %. Im Unterschied zu Bonizzi et al. (2009) wurden für die Kalibrierung die Rein-

heitswerte der einzelnen Caseinstandards gemessen. Besonders beim α -Caseinstandard (ein separater Reinstandard jeweils für für α_{S1} - und α_{S2} -Casein ist nicht erhältlich) kann entgegen der Auffassung o.g. Autoren nicht von einem konstantem Konzentrationsverhältnis aus 4 Teilen α_{S1} - und einem Teil α_{S2} -Casein ausgegangen werden. Die genauen Reinheitswerte waren dementsprechend in zwei Schritten zu bestimmen.

In einem ersten Schritt wurden konstante Mengen der Standards mittels der o.g. HPLC-Methode auf ihr jeweiliges Caseinspektrum hin analysiert. Aufgrund der resultierenden Peakflächenverhältnisse in jeweils 10 Analysen konnten daraus die Anteile der Einzelfraktionen am Gesamtcasein in den einzelnen Standards ermittelt werden. Die Chromatogramme und die daraus Caseinzusammensetzungen der Einzelstandards sind in Abb. 5.8 und Tab. 5.4 dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, enthalten alle Reinstandards Spuren der anderen Caseinfraktionen.

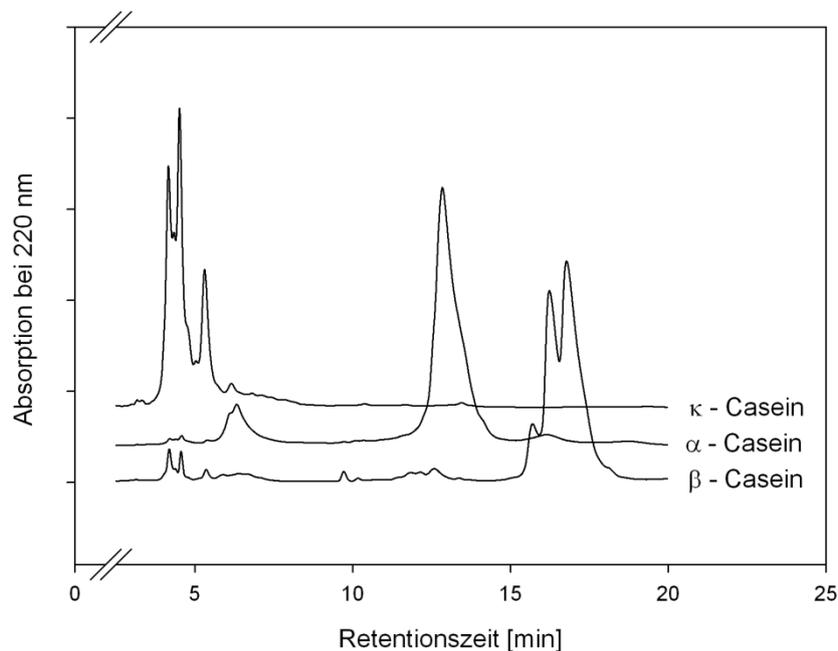


Abb. 5.8: Chromatogramme der einzelnen Caseinstandards

Tab. 5.4: Zusammensetzung und Reinheit (bezogen auf das Gesamtcasein) der einzelnen Caseinstandards von Sigma

| Standard | κ -Casein [%] $\pm \sigma^*$ | α_{S2} -Casein [%] $\pm \sigma^*$ | α_{S1} -Casein [%] $\pm \sigma^*$ | β -Casein [%] $\pm \sigma^*$ |
|------------------|--|---|---|---------------------------------------|
| κ -Casein | 86,3 \pm 0,8 | 11,3 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,2 | 0 |
| α -Casein | 2,6 \pm 0,4 | 11,4 \pm 2,4 | 79,5 \pm 3,1 | 6,5 \pm 0,4 |
| β -Casein | 5,5 \pm 0,1 | 3,5 \pm 0,2 | 5,4 \pm 0,1 | 85,6 \pm 0,1 |

* σ = Standardabweichung bei 10 Einzelmessungen

Auf der Basis der Aminosäurezusammensetzung wurde im Anschluss der molare Extinktionskoeffizient der Einzelcaseine nach der von Pace et al. (1995) beschriebenen Methode berechnet (Gl. (39)). Entscheidend für die Absorption ist dabei die Anzahl an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin ($\#Tyr$) und Tryptophan ($\#Trp$) sowie der Gehalt an Cystein bzw. des Dimers Cystin ($\#Cys$) im Protein.

$$\varepsilon(\lambda) = [\#Trp] \cdot \varepsilon_{\lambda}(Trp) + [\#Tyr] \cdot \varepsilon_{\lambda}(Tyr) + [\#Cys] \cdot \varepsilon_{\lambda}(Cys) \quad (39)$$

Für die Berechnung wurden die Extinktionswerte der Aminosäuren in 6 M Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) verwendet (Pace et al., 1995). Durch dieses Agens kann eine vollständige Entfaltung des Proteins gewährleistet werden. Bei der späteren Absorptionsmessung der Proteinlösungen können so Absorptionsveränderungen aufgrund konformationeller Eigenheiten der Proteine vernachlässigt werden. Nach ihrer AS-Sequenz ergeben sich nach Gl.39 für die einzelnen Caseine die in Tab 5.5 dargestellten Extinktionskoeffizienten. Mit der anteiligen Gewichtung der einzelnen Caseinfraktionen in den jeweiligen Standards konnte somit ein mittlerer Extinktionskoeffizient für jeden Standard berechnet werden.

Tab. 5.5: Berechnung der einzelnen Extinktionskoeffizienten nach Pace et al. (1995) auf der Basis der Caseinzusammensetzung nach der *Swissprot Database* (www.expasy.org)

| | κ -Casein | α_{s2} -Casein | α_{s1} -Casein | β -Casein |
|---|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| # Trp | 1 | 2 | 2 | 1 |
| # Tyr | 9 | 12 | 10 | 4 |
| # Cys | 2 | 2 | 0 | 0 |
| MW [g Mol ⁻¹] | 18974,4 | 24348,5 | 22974,8 | 23583,2 |
| ε [Mol ⁻¹ cm ⁻¹] | 18400 | 28150 | 25080 | 11145 |
| ε [g ⁻¹ cm ⁻¹] | 0,970 | 1,156 | 1,092 | 0,473 |

Für die Bestimmung der einzelnen Reinheiten wurden die Caseinstandards jeweils mit einer Konzentration von 1 mg/mL in einem denaturierendem Phosphat-Guanidin-Puffer (0,02 M Phosphat / 6 M GdnHCl, pH 6,5) gelöst. Anschließend wurde die Extinktion der jeweiligen Lösung in einer Quarzküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) bei 278 nm im Photometer gemessen. Mit den gemessenen Extinktionen (E) konnte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetztes (siehe Gl. (40)) in Verbindung mit den zuvor errechneten mittleren Extinktionskoeffizienten für die einzelnen Standards deren jeweilige Caseinkonzentration (c) ermittelt werden.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (40)$$

Durch den Vergleich von gemessener und eingewogener Caseinkonzentration in den Standards ließ sich die genaue Reinheit der Standards, bezogen auf den Gesamtcaseingehalt, ermitteln (siehe Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Vergleich der Reinheiten der Caseinstandards

| | Reinheiten [%] | |
|------------------|-------------------|------------------|
| | Herstellerangaben | Eigene Messungen |
| κ -Casein | ≥ 80 | 94,4 |
| α -Casein | > 70 | 89,0 |
| β -Casein | > 70 | 79,5 |

Darüber hinaus konnten anhand der Einwaagen, der Reinheiten und der Chromatogramme der Reinstandards die jeweiligen Massenanteile der unterschiedlichen Caseinfraktionen ermittelt und bei der Erstellung des Mischstandards berücksichtigt werden. Die letztendliche Quantifizierung erfolgte über eine Vierpunkt-Kalibration.

Zur Überprüfung der Methode wurde an unterschiedlichen Tagen frische Magermilch mit in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Die ermittelten Caseingehalte wurden anschließend, wie in Abb. 5.9 dargestellt mit Literaturwerten (Farrell et al., 2004) verglichen.

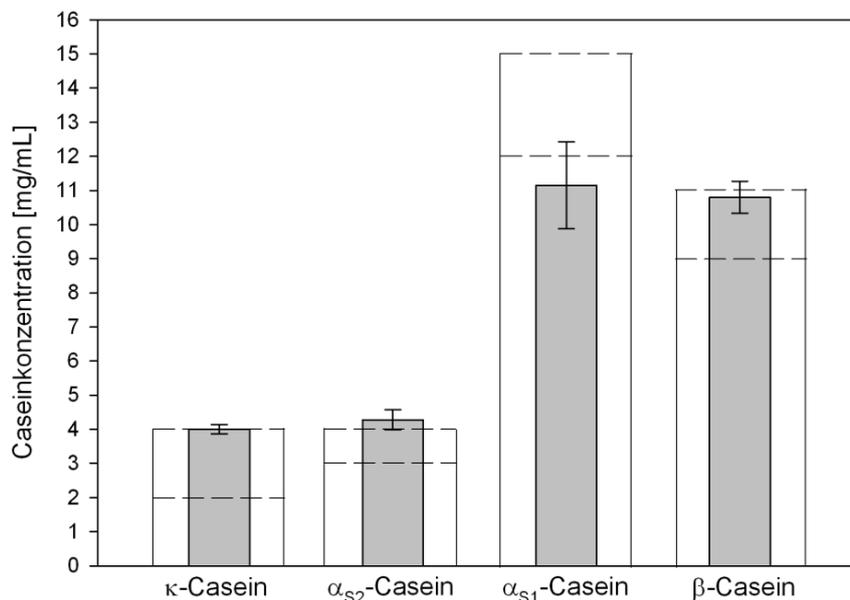


Abb. 5.9: Vergleich der mittleren gemessenen Caseinkonzentrationen [$\pm\sigma$ bei $n = 10$] in Magermilch mit Literaturwerten von Farrell et al. (2004)

Dabei sind die Mittelwerte ($\pm\sigma$ bei $n = 10$) der gemessenen Caseinkonzentration als schmale Balken vor den als breite Balken dargestellten Literaturwerten abgebildet. Wie zu erkennen ist, werden die Literaturwerte gut wiedergegeben. Lediglich die Werte für α_{s1} -Casein liegen mit $11,1 \pm 1,3$ mg/mL etwas unterhalb der Literaturwerte von 12-15 mg/mL.

5.3.2 CMP-Analytik mittels RP-HPLC

Für die Untersuchung der Hydrolyseaktivität von Chymosin wurde das Reaktionsprodukt CMP quantitativ mittels RP-HPLC erfasst. Die Erfassung folgt dem Vorgehen von Thomä et al. (2006), wobei die Methode geringfügig verkürzt und die Mengen an glycosiliertem sowie nicht glycosiliertem CMP in den genetischen Varianten A und B zusammen als Gesamt-CMP erfasst wurden. Die Trennung erfolgt auf einer PLRP-Säule. Die Säulentemperatur beträgt 40 °C bei einer Flussrate von 1 ml/min. Laufmittel A besteht aus Reinstwasser mit 1 mL/L Trifluoressigsäure (TFA). Laufmittel B besteht aus 80 % Acetonitril in destilliertem Wasser mit 0,555 mL/L TFA. Die Detektion der eluierenden Komponenten erfolgt bei 226 nm. In Tab. 5.7 ist der Laufmittelgradient als prozentualer Anteil des Laufmittels B bei der CMP-Elution angegeben. Der Anteil von Laufmittel A [%] ergänzt sich entsprechend zu 100 %. Das Standardinjektionsvolumen beträgt 20 μ L.

Tab. 5.7: Laufmittelgradient bei der CMP-Erfassung mittels RP-HPLC

| Zeit [min] | Anteil Laufmittel B [%] |
|------------|-------------------------|
| 0 | 25 |
| 5 | 47 |
| 7,5 | 49 |
| 10,5 | 52 |
| 13 | 55 |
| 13,1 | 100 |
| 15 | 100 |
| 15,2 | 25 |

Die Proben wurden nach der Ansäuerung mit Perchlorsäure für 20 min bei 15000 g_a zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und direkt in die Analysenvials gefüllt. Das Standardinjektionsvolumen beträgt 20 μ L, kann aber entsprechend des Kalibrationsbereiches der Methode auf die CMP-Konzentration in den Proben angepasst werden.

5.3.2.1 Bestimmung des κ -Casein-Gesamthydrolysegrades

Aus den Chromatogrammen wurde entsprechend der Kalibration eine CMP-Konzentration ermittelt. Durch eine Inkubation mit Chymosin für 3 h wurde in der Probe die Menge des maximal abspaltbaren CMP's (CMP_{max}) ermittelt. Der Quotient aus CMP_t , der nach einer Zeit t freigesetzten CMP-Menge, und CMP_{max} ergibt sich der Gesamt- κ -Caseinhydrolysegrad DH. Da aus einem κ -Caseinmolekül nur ein CMP-Molekül freigesetzt wird, gilt für DH gemäß Gl. (32) folgender Ausdruck:

$$\left(\frac{CMP_t}{CMP_{max}} = DH = 1 - e^{-kt} \right) \quad (41)$$

5.3.2.2 Bestimmung des κ -Casein-Hydrolysegrades unter Druck

Bei der Bestimmung des κ -Casein-Hydrolysegrades unter Druck musste aufgrund des Versuchsaufbaus Gl. (41) leicht modifiziert werden. Die Gesamtprozesszeit t setzt sich aus einer drucklosen Vorlaufzeit t_v und einer Druckzeit t_p zusammen. Für den reinen Hydrolysegrad unter Druck DH_p muss sowohl von CMP_t als auch von CMP_{max} die in der Vorlaufzeit freigesetzte CMP-Menge CMP_{t_v} abgezogen werden. Damit ergibt sich für DH_p folgender Ausdruck:

$$\left(\frac{CMP_t - CMP_{t_v}}{CMP_{max} - CMP_{t_v}} = DH_p = 1 - e^{-kt_p} \right) \quad (42)$$

5.4 SDS-Page

Eine unspezifische Anlagerung von Casein an die eingesetzten Membranen wurde zusätzlich mittels SDS-PAGE untersucht. Für die Analyse wurden die zermahlenden Membranen in einem reduzierenden Probenpuffer gegeben. Anschließend wurden die Proben für eine gute Anlagerung des SDS-Reagens für für 10 min auf 100 °C erhitzt, anschließend abgekühlt und kurz bei 10 000 g_a zentrifugiert. Der erhaltende Überstand wird für die Gelelektrophorese verwendet und auf ein 12,5 %iges homologes Polyacrylamidgel (ExcelGel, GE Healthcare, Deutschland) gegeben. Für eine optimale Proteintrennung wird die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 10 mA gestartet und anschließend schrittweise auf 50 mA gesteigert.

Für die Auswertung wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt und densitometrisch ausgewertet. Für die Detektion sehr geringer Proteinspuren erfolgte zusätzlich eine empfindlichere Silberfärbung nach dem Protokoll von GE Healthcare. Die Zusammensetzung der Färbelösungen und des Probenpuffers sowie die einzelnen Schritte der Färbeprotokolle sind im Anhang detailliert beschrieben.

5.5 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt in den Proben wurde aus dem jeweiligen Stickstoffgehalt bestimmt. Dieser wurde in einem Stickstoffanalysator auf der Basis der Methode von Dumas ermittelt (Wiles et al., 1998). Dabei wird die Probe in reiner O₂-Atmosphäre in einer Acetylenflamme bei 850 °C verbrannt. Als Verbrennungsprodukte entstehen CO₂, NO_x, N₂ und H₂O. Die Stickoxide werden an einem Katalysator (CuO/Pt) zu elementarem N₂ reduziert. Der so aus der Probe freigesetzte N₂ wird in einem Trägergas (He) einer Wärmeleitfähigkeitsmesszelle zugeführt und quantitativ erfasst. Dabei ist der N₂-Gehalt direkt proportional zum Proteingehalt und kann über einen caseinspezifischen Faktor von 6,38 umgerechnet werden (Wiles et al., 1998).

5.6 Bestimmung der Partikelgröße in den Versuchslösungen

Die Partikelgrößenverteilungen in den Caseinsuspensionen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (Zeta-Sizer Nano ZS) durchgeführt. Bei diesem auch als Photonenkorrelationspektroskopie bezeichneten Messprinzip wird die Probe von einem Laser durchstrahlt (bei diesem Messgerät: roter He-Ne-Laser, $\lambda = 632,8$ nm). Das gestreute Licht bzw. dessen Photonen werden unter 173 ° Rückstreuung mit einem Photomultiplier detektiert. Durch die mit der Zeit detektierten Photonen entsteht durch die relative Lage der Streuzentren, in diesem Fall Caseinmizellen, ein Interferenzmuster der Probe. Da die Streuzentren aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ihre relative Lage verändern, fluktuiert auch die Zahl der am Detektor gemessenen Photonen (Winter & Noll, 1998). Informationen über die Translationsbewegung können dann aus der Intensitätskorrelationsfunktion gewonnen werden und über den Diffusionskoeffizienten in Verbindung mit der Stokes-Einstein-Beziehung in einen hydrodynamischen Radius oder Durchmesser umgerechnet werden. Generell eignet sich die dynamische Lichtstreuung zur Partikeluntersuchung im Bereich von 5 nm bis 5 μ m, und damit zur Untersuchung von Caseinmizellen.

Für die Messung wurde die temperierte Caseinsuspension jeweils unverdünnt in eine Küvette (10 x 10 mm) gegeben und nach einer Equilibrierungszeit von 2 min in drei aufeinanderfolgenden Messungen analysiert. Für die Auswertung wurden die anzahlgewichteten Messgrößen herangezogen.

5.7 Bestimmung des Zeta-Potentials

An der Oberfläche eines elektrisch geladenen Partikels in Lösung bildet sich durch die Adsorption von Gegenionen eine elektrische Doppelschicht aus. Unter Zeta-Potential versteht das Oberflächenpotential nach Abscherung eines Teils der äußeren diffusiven Ionenschicht um ein geladenes Partikel. Es entspricht in seinem Betrag annähernd dem Stern-Potential und gibt Aufschluss über die Oberflächenladung am Partikel selbst sowie über die kolloidale Stabilität der vermessenen Suspension.

Die Bestimmung des Zetapotentials in den Caseinsuspensionen wurde mittels Laser-Doppler-Velocimetrie (Zeta-Sizer Nano ZS) bestimmt. Bei dieser Messmethode wird die elektrophoretische Mobilität der Caseinmicellen in einem elektrischen Feld bestimmt. Nach Hersteller-Angaben wird bei dieser Bestimmung wegen der hohen Dielektrizitätskonstanten von wässrigen Systemen und der Geometrie der Messzelle die Smoluchowski-Approximation zugrunde gelegt.

Für die Messung wurden die zu analysierenden Proben 1:100 mit UF-Permeat oder Puffer verdünnt, temperiert und blasenfrei in die Kapillarmessküvetten gefüllt. Die Küvetten wurden anschließend verschlossen und die Kontakte von übergelaufener Probe gründlich gesäubert. Nach einer Equilibrierungszeit von 2 min wurden die Proben bei 25 °C dreifach vermessen.

5.8 Analyse der Mineralienkomposition

Die Kationen Natrium, Kalium und Calcium wurden quantitativ mit einem Flammenphotometer (ELEX 6361) bestimmt. Dabei werden die Elemente in einer Acetylenflamme thermisch angeregt. Das von den Atomen emittierte Licht wird detektiert und über eine Kalibration mit einer Eichlösung bekannter Ionenkonzentration zur Quantifizierung genutzt. Die Untersuchungslösungen dürfen keine größeren Partikel enthalten und müssen gegebenenfalls mit Reinstwasser verdünnt werden, um erforderlichen Kalibrationsbereich zu liegen.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Untersuchungen zur druckabhängigen Dissoziation von Caseinmizellen

Wie in den Abschnitten zwei und drei eingehend beschrieben, existieren zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss hohen hydrostatischen Druckes auf das mizellare Caseinsystem. Durch ihre Stabilisierung über nicht kovalente Bindungen sind diese Proteinkomplexe sehr empfindlich gegenüber einer solchen Behandlung, da gerade die stabilisierenden hydrophoben aber auch die elektrostatischen Wechselwirkungen gelöst und der Mizellverbund so aufgebrochen wird.

Während der Zerfall über Trübungsmessungen (Huppertz & de Kruif, 2006; Regnault et al., 2006) bzw. die Zerfallsprodukte hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilungen über statische oder dynamische Lichtstreuung (Anema et al., 2005; Gebhardt et al., 2006; Gebhardt & Kulozik, 2011) eingehend beschrieben wurden, existieren kaum Informationen hinsichtlich des Verhaltens der einzelnen Caseinfraktionen beim Zerfall der originären Caseinmizelle. Lediglich Untersuchungen zum Serumcaseingehalt in Milch nach einer Hochdruckbehandlung von Lopez-Fandino et al. (1998) und Anema et al. (2005) zeigten beispielsweise für β -Casein einen stärkeren Konzentrationsanstieg in der Serumphase als für α_{s1} -oder α_{s2} -Casein.

In einem neuartigen, membranbasierten Versuchsaufbau, soll deshalb im Folgenden das Dissoziationsverhalten der Einzelcaseine bzw. die Art und Zusammensetzung der Mizellzerfallsfragmente untersucht werden. Zuvor stand die Entwicklung eines hochdrucktauglichen Membransystems sowie einer Möglichkeit zur Beurteilung von dessen Funktion im Fokus des Interesses.

6.1.1 Mathematische Beschreibung des diffusiven Durchtritts einer Substanz durch eine mikroporöse Membran

Nach der Regeln und Ansätzen der Formalkinetik werden diffusiv limitierte Reaktionen in der Regel mit einer Reaktionsordnung $n = 1$ beschrieben (Kessler, 1996), sofern die diffundierenden Teilchen nicht miteinander interagieren. Abb. 6.1 zeigt schematisch die Ausgangssituation für die nachstehenden Überlegungen. Zwei Lösungen mit den Volumina V_1 und V_2 sind durch eine Membran voneinander getrennt. Für die betrachtete, diffundierende Substanz wird in V_1 die Ausgangskonzentration C_1 angenommen, die zu Beginn des Experiments deutlich größer ist als entsprechend C_2 in V_2 .

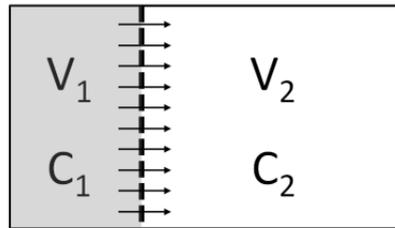


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der Ausgangssituation zwischen Konzentratvolumen (V_1 mit C_1) und Permeatvolumen (V_2 und C_2) bei diffusiver Membranoperation für die Überlegungen im formal-kinetischen Ansatz

Im Verlauf der Zeit t sinkt C_1 , während C_2 ansteigt, wenn der diffundierende Stoff die Membran passieren kann. Wird die zeitliche Abnahme von C_1 in V_1 als eine Art diffusionslimitierte Abbaureaktion interpretiert, kann dafür der allgemeine reaktionskinetische Ansatz aus Gl. (29) herangezogen und entsprechend zum Ausdruck in Gl. (43) umgeformt werden.

$$\frac{dC_1}{dt} = -k \cdot (\Delta C)^n \quad (43)$$

Werden die Rahmenbedingungen aus Gl. (44) bis Gl. (46) zu Grunde gelegt, kann für die zeitliche Veränderung von C_1 bei $n = 1$ unter Berücksichtigung der Volumenverhältnisse von V_1 und V_2 der Ausdruck in Gl. (47) geschrieben werden.

$$\Delta C = C_1(t) - \left[(C_{1,0} - C_1(t)) \cdot \frac{V_1}{V_2} \right] \quad (44)$$

(Gl. (44) beschreibt das transmembrane Konzentrationsgefälle in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration $C_{1,0}$, von der Zeit t und vom Volumenverhältnis V_1/V_2)

$$\Delta C_{t=0} = C_{1,0} \quad (45)$$

$$\Delta C_{t=\infty} = 0 \quad (46)$$

$$C_1(t) = \frac{\left[e^{-\left(1+\frac{V_1}{V_2}\right)kt} + \frac{V_1}{V_2} \right] \cdot C_{1,0}}{1 + \frac{V_1}{V_2}} \quad (47)$$

Die Geschwindigkeitskonstante k stellt hier ein Maß für die Permeationsgeschwindigkeit dar. Durch die Diffusion durch die Membran bedeutet eine Abnahme von C_1 eine Zunahme von C_2 , sodass für C_2 der Ausdruck in Gl. (48) geschrieben werden kann (nur sofern keine unspezifische Adsorption der diffundierenden Substanz in und an der Membran erfolgt).

$$C_2(t) = \frac{V_1}{V_2} \cdot [C_{1,0} - C_1(t)] \quad (48)$$

Die Gültigkeit der vorgestellten Zusammenhänge wurde durch die Beobachtung des Ionenübertritts aus definierten Salzlösungen in Milli-Pore-Wasser durch eine Dialysemembran (Spectra/Por, MWCO 6000 bis 8000) über einen Zeitraum von 30 h überprüft. Die Überprüfung erfolgte mittels Salzlösungen, da Ionen aufgrund Ihrer geringen Größe höhere Diffusionsgeschwindigkeiten aufweisen und flammenphotometrisch ohne weitere Probenvorbereitung schnell und einfach zu detektieren waren. Abb. 6.2 zeigt den zeitlichen Verlauf von C_1 (konzentratseitig) und C_2 (dialysatseitig) für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} bei der Dialyse gegen destilliertes Wasser bei 20 °C.

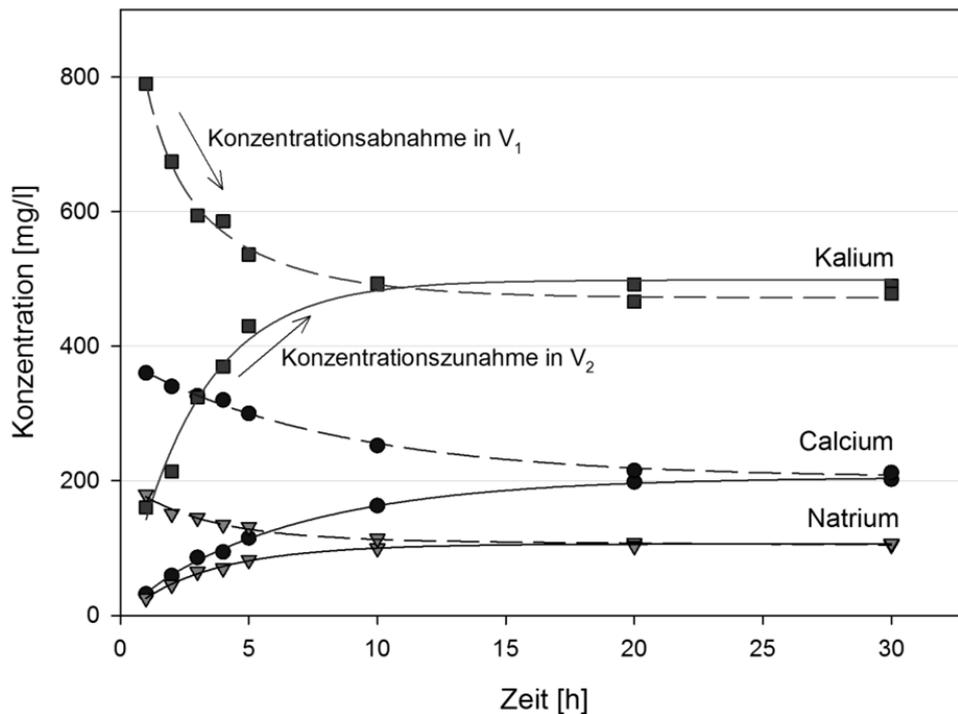


Abb. 6.2: Konzentrationsverläufe unterschiedlicher Salzionen in Abhängigkeit von der Zeit bei der Dialyse gegen Millipore-Wasser bei 20 °C unter Atmosphärendruck

Wie zu sehen ist, nähern sich die Ionenkonzentrationen in Retentat und Dialysat an. Bei einem Volumenverhältnis $V_1 / V_2 \approx 1$ beträgt die maximale Abreicherung bei gleich gehaltenem Dialysat 50 % der Ausgangskonzentration. Die Messreihen wurden für unterschiedliche Salzkonzentrationen zu Beginn der Versuche wiederholt. Für einen Vergleich der Werte untereinander wurden die Konzentrationswerte zum Zeitpunkt t auf die Ausgangswerte für die Versuchszeit $t = 0$ bezogen.

Die kinetische Auswertung der Messwerte ergab für Calcium ein mittleres k von $0,077 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$. Für Natrium liegt dieser Wert k bei $0,082 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ und für Kalium bei $0,120 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$. Ein Vergleich der gemessenen Werte mit den nach dem kinetischen Ansatz berechneten Werten aller betrachteten Salzionen ergab, wie in Abb.6.3 dargestellt, eine gute formalkinetische Beschreibung ($R^2 = 0,92$) des diffusiven Stoffdurchgangs durch die untersuchte Membran.

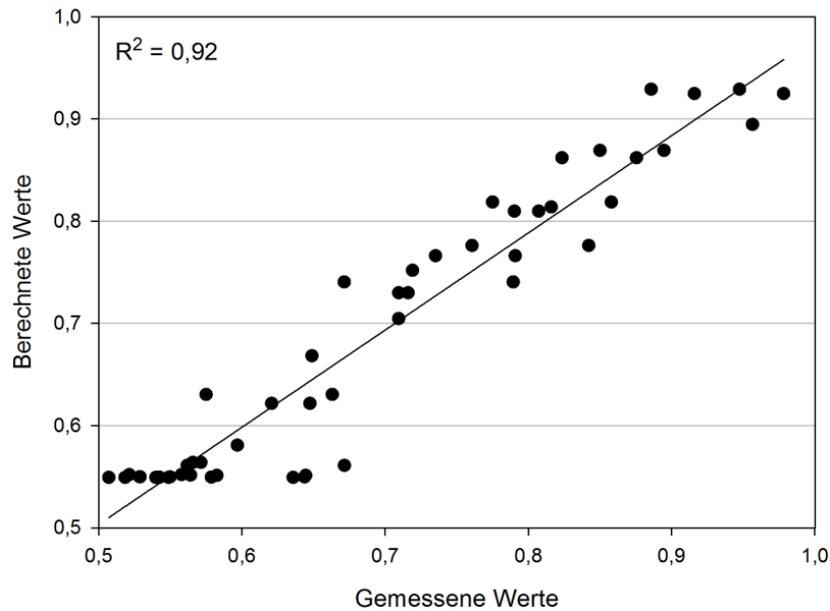


Abb. 6.3: Korrelogramm zwischen gemessenen und den im kinetischen Ansatz berechneten Werten der relativen Ionenkonzentration bei der atmosphärischen Dialyse

6.1.2 Diffusionsversuche unter hohem hydrostatischen Druck

Auch bei den Druckversuchen konnte die Anwendbarkeit des formalkinetischen Ansatzes bestätigt werden. Allerdings wurden die Geschwindigkeitskonstanten des Diffusionsvorgangs für alle betrachteten Salzionen bereits bei 200 MPa deutlich reduziert. Bei einer Druckbehandlung mit 200 MPa bei 20 °C reduzierten sich die k-Werte aller drei betrachteten Ionen: Für Calcium lag der Wert bei nur noch bei $0,019 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, für Natrium bei $0,019 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ und Kalium $0,021 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$.

Diese deutliche Reduktion der Diffusionsrate ist auf den ersten Blick überraschend. Denn aufgrund elektrostriktiver Effekte wird mit steigendem Druck die Bildung freier Ionen verstärkt, was deren Diffusionsfähigkeit steigern müsste, da unvollständig dissoziierte Salze so stärker dissoziiert werden würden. Auch eine Viskositätssteigerung der kontinuierlichen Wasserphase kann als Ursache ausgeschlossen werden. Wie Untersuchungen von Woolf (1974) und Woolf (1975) zeigten, ist der Diffusionskoeffizient D für Wasser im Druckbereich bis 220 MPa relativ konstant. Dabei hängt er wesentlich stärker von der Temperatur als vom Druck ab.

Die Ursache für die drastische Verringerung der Permeation muss also in der verwendeten Polymermembran liegen. Bei der hier verwendeten Membran handelt es sich um eine Kunststoffmembran aus regenerierter Zellulose, die eine amorphe Struktur aufweist. Wie Richter (2011) bei Packstoffuntersuchungen hinsichtlich ihrer Permeabilität für Lebensmittelkomponenten unter Druck zeigen konnte, führt eine Druckbeaufschlagung amorpher Strukturen in Packstoffolien zur Bildung

einer reversiblen Diffusionsbarriere, was deren Durchlässigkeit für Substanzen während der Druckhaltezeit deutlich (um mehr als 50 %) herabsetzt. Darüber hinaus geht er davon aus, dass amorphe Strukturen im Packstoff auch irreversibel umgefaltet werden, was zu einer Nachkristallisation führt. Diese Nachkristallisation wiederum erhöht den Gesamtteil der kristallinen Strukturen im Kunststofffilm und führt zu seiner Verdichtung.

Es empfiehlt es sich daher, zur Beobachtung Diffusiver Vorgänge unter Druck eher unflexible und starre Membranen einzusetzen, die von Beginn an kristalline Strukturen aufweisen. Im Weiteren wurde daher mit als inkompressibel eingestuften keramischen Membranen gearbeitet, deren Trennwirkung auf eine kristalline bzw. gesinterte Struktur zurückzuführen ist.

6.1.3 Diffusionsversuche mit keramischen Membranen bei Normal- und unter Hochdruck

Für die weiteren Untersuchungen wurden keramische Membranen in Betracht gezogen. Es wurden keramische Einkanal-Membranen in einem modifizierten Modul eingesetzt. Die Spannweite der im Bezug auf ihre Trenngrenze zur Verfügung stehenden Membranen reichte hierbei von einem MWCO von 10 kDa (NF) über MWCO's bis 150 kDa (UF) bis hin zu Mikrofiltrationsmembranen mit nominellen Porenweiten von mehreren μm .

In Screening-Versuchen konnte mit NF-Membranen im Dialysebetrieb mit definierten Salzlösungen die Gültigkeit des formalkinetischen Ansatzes in Gl. (47) bestätigt werden. Abb. 6.4 zeigt die Gegenüberstellung zwischen den Mess- und den im mathematischen Modell berechneten Werten.

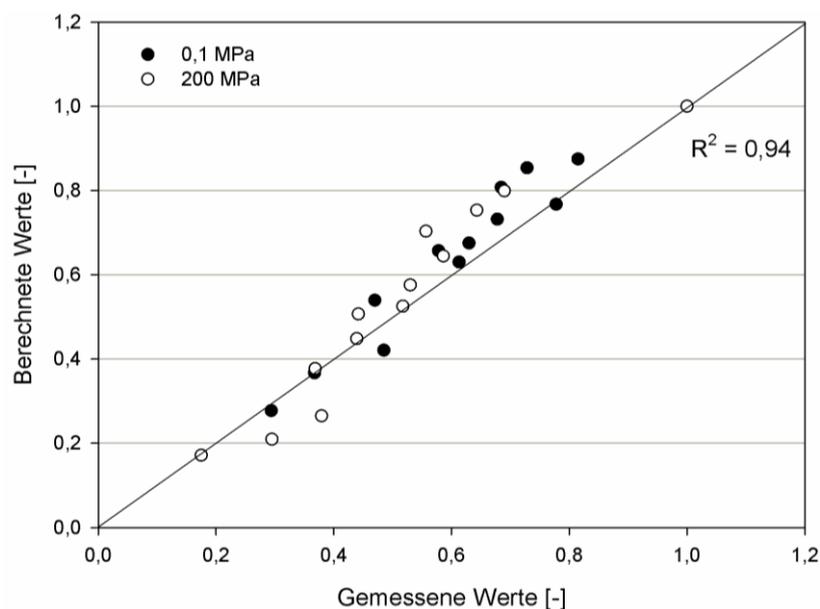


Abb. 6.4: Korrelogramm zwischen gemessenen und den im kinetischen Ansatz berechneten Werten der relativen Ionenkonzentration bei der atmosphärischen und bei der Hochdruck-Dialyse

Sowohl bei Atmosphärendruck als auch bei 200 MPa wird ein R^2 von 0,94 erreicht. Um den Konzentrationsgradienten über die Membran zu vergrößern und damit die Diffusionsgeschwindigkeit zu steigern, wurden außerdem die Volumenverhältnisse im für die veränderten Membranen angepassten Modul zu $V_2 \approx 10 \cdot V_1$ verändert. Für den Membranbetrieb bei 0,1 MPa ergab die kinetische Auswertung der Messwerte für Calcium ein mittleres k von $0,135 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$. Für Natrium lag dieser Wert k bei $0,160 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$ und für Kalium bei $0,218 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$. Beim Betrieb unter Druck erhöhte sich der k -Wert bei Calcium auf $0,228 \pm 0,021 \text{ h}^{-1}$, für Natrium auf $0,290 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ und Kalium auf $0,362 \pm 0,025 \text{ h}^{-1}$. Diese Steigerung der Diffusionsrate bei den Versuchen bei 200 MPa könnte wie oben beschrieben in der Elektrostriktion und damit in der Konzentration freier Ionen begründet sein.

Aufgrund der vorliegenden Membranstruktur muss an dieser Stelle jedoch die Membranstabilität und –Integrität während der Druckbehandlung eingehender betrachtet werden. Keramische Membranen werden durch die Sinterung unterschiedlich großer Keramik-Partikel gefertigt. Die Größe der SiO- oder TiO-Partikel und deren Anordnung in einem Haufwerk entscheiden über die mittlere Porenweite und damit über die Trenngrenze der Membran. Je niedriger die Trenngrenze sein soll, desto kleiner müssen auch die bei ihrer Herstellung gesinterten Partikel sein. Aus Untersuchungen zum Be- und Entfeuchtungsverhalten von Betonhaufwerken ist bekannt, dass mit sinkender Teilchengröße der Partikel, die das Haufwerk ausbilden, deren Benetzbarkeit im Haufwerk vor allem bei alternierender Be- und Entfeuchtung abnimmt (Schubert, 1973). Die Wahrscheinlichkeit von Gaseinschlüssen im Inneren des Haufwerkes nimmt zu, da gasgefüllte Hohlräume und Kanäle von flüssigkeitsgefüllten Kapillaren blockiert werden.

Im Fall einer inhomogenen Gas- und Flüssigkeitsverteilung in der Membran könnte es also aufgrund der unterschiedlichen Kompressibilitäten der Medien zu einer ungleichmäßigen Druckbeaufschlagung und damit zu einer Scherbeanspruchung innerhalb des Haufwerkes der Keramikpartikel kommen. Daraus würden zunächst mikroskopisch kleine Ermüdungsbrüche resultieren, was bei letztendlich zum Bruch der Membran führen kann. In der Tat war mit sinkendem Membran-cutoff eine verstärkte Bruchanfälligkeit der Membranen zu beobachten. Insbesondere NF- aber auch UF Membranen zerbrachen bereits nach zwei bis vier Druckzyklen (siehe Abb. 6.5).



Abb. 6.5: Membranbruch (10 kDa Cutoff) nach einer Druckbeaufschlagung mit 200 MPa in drei Druckzyklen

Ein definierter Größenausschluss unter Druck kann also besonders bei NF-Membranen nicht gewährleistet werden. Wie angesprochen sank die Bruchanfälligkeit mit steigendem MWCO und war ab einer Porenweite von 50 nm nicht mehr zu beobachten (siehe Abschnitt 6.1.4).

6.1.4 Untersuchung der Membranintegrität nach einer Druckbehandlung

Für die Untersuchung der Membranintegrität wurde direkt Casein verwendet. Dazu wurden Caseinmizellen im Probenpuffer für die HPLC-Analytik (siehe Abschnitt 4) vollständig dissoziiert und als Indikatorsubstanz eingesetzt. In diesem Modellsystem wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Konzentrationsabnahme im Membraninnenraum für die einzelnen Caseinmonomere bestimmt und nach mehreren Druckzyklen miteinander verglichen. Ferner war es so auch möglich, die Reinigung und Regeneration der Membransegmente bei mehrmaliger Verwendung zu überprüfen bzw. ein Verblocken der Membran auszuschließen.

Auch für die Caseinfraktionen ergaben sich beim Vergleich der Berechnungen mit den Messwerten Korrelationswerte von $R^2 = 0,97$ und damit eine gute mathematische Vorhersagbarkeit der Permeation mittels des formalkinetischen Ansatzes. Tabelle 6.1 zeigt die k-Werte für die einzelnen Caseinfraktionen zu Beginn, nach 10 und nach 20 Druckzyklen. Wie zu erkennen ist, konnte über die betrachtete Einsatzdauer der Membranen keine signifikante Reduktion oder Steigerung des Caseindurchtritts beobachtet werden.

Tab. 6.1: Membranperformance (50 nm Cut-off) über eine Einsatzdauer von 20 Druckzyklen bei Druckleveln zwischen 150 und 450 MPa

| | $k \pm \sigma \cdot 10^3 [h^{-1}]$ | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | Ausgangsmembran | Nach 10 Zyklen | Nach 20 Zyklen |
| κ -Casein | $2,33 \pm 0,26^a$ | $2,48 \pm 0,20^a$ | $2,21 \pm 0,11^a$ |
| α_{s2} -Casein | $1,17 \pm 0,04^b$ | $1,44 \pm 0,14^b$ | $1,31 \pm 0,09^b$ |
| α_{s1} -Casein | $2,68 \pm 0,16^a$ | $2,85 \pm 0,29^a$ | $2,70 \pm 0,12^a$ |
| β -Casein | $2,51 \pm 0,06^a$ | $2,54 \pm 0,13^a$ | $2,63 \pm 0,19^a$ |

Werte ohne gemeinsamen Index unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$)

Wie ebenfalls zu erkennen, bewegt sich bei allen Caseinen mit Ausnahme von α_{s2} -Casein der k-Wert in einer vergleichbaren Größenordnung.

6.1.5 Untersuchung auf unspezifische Caseinadsorption an und in der Membran

Aufgrund der Konditionierung der Membranen sollte keine Adsorption der Caseine durch elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen. Da aber eine Anlagerung von Caseinen durch freies Calcium an die Membran denkbar wäre, wurden Membransegmente nach dem Versuch fein vermahlen, und einer Proteinextraktion unterzogen, um mögliche Caseine an und in der Membran nachzuweisen. Dies war erforderlich, um zu zeigen, dass nur diffusive Transportvorgänge durch die Membran zu einer Reduktion der Konzentration an Caseinmonomeren im Inneren der Membranvolumen führen. Die pulverisierte Membran wurde dabei sowohl in HPLC-Probenpuffer als auch in SDS-Puffer gegeben, um eventuell vorhandene Caseine zu lösen. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand mittels RP-HPLC bzw. SDS-PAGE analysiert. Selbst die sehr empfindliche Silberfärbung bei der SDS-Page zeigte keine nachweisbaren Proteinrückstände in der Membran.

6.1.6 Validierung des Versuchsaufbaus

Für die Validierung wurde eine nach Abschnitt 5.1.5 größenstandardisierte Caseinsuspension eingesetzt. So sollte ausgeschlossen werden, dass Serumcaseine und kleinere Caseinmizellen die Untersuchungen verfälschen. Membran-Cutoff und Caseinsuspension wurden so aufeinander abgestimmt, dass intakte Casein-Mizellen bei 0,1 MPa Atmosphärendruck die Membran nicht passieren konnten. Erst die unter Druck gebildeten Caseinfragmente sollten die Membran passieren. Abb. 6.6 zeigt die Ausgangssituation zu Beginn der Experimente in einem Vergleich der Caseinmizell-Größenverteilung in pasteurisierter Magermilch und standardisierter Caseinsuspensionen.

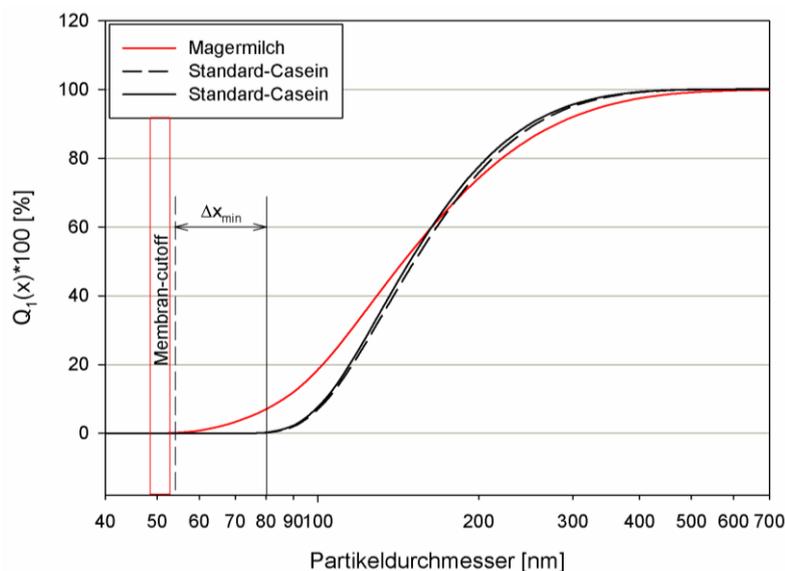


Abb. 6.6: Anzahlgewichtete Summenverteilungen der Partikelgrößen in pasteurisierter Magermilch und standardisierter Caseinsuspension

Deutlich ist zu erkennen, dass die Verteilungsbreite der Ausgangssuspension reduziert, die Verteilungsschärfe also erhöht wurde. Darüber hinaus ist eine Anhebung des minimalen Partikeldurchmessers um $\Delta x_{\min} = 20$ nm von 58 auf 78 nm zu erkennen, während der Median kaum verändert wurde.

Bei keramischen Membranen ist die nominelle Trenngrenze oder der cutoff nicht als Absolutwert anzusehen. Vielmehr beschreibt sie die Partikelgröße, die von der Membran zu 90 % zurückgehalten werden. Aufgrund des Herstellungsprozesses (Sinterung von keramischen Partikeln) kommt es im Haufwerk zu unterschiedlichen Kugelpackungen, weshalb auch die aus den Zwickelräumen resultierenden Porenweiten variieren. Es wird also immer Poren geben, deren Durchmesser oberhalb und unterhalb der angegebenen Trenngrenze liegen. Die Anhebung des minimalen Partikeldurchmessers in der standardisierten Caseinsuspension um Δx_{\min} dient daher der Verhinderung der Passage kleinerer, undissozierter Caseinmizellen bei den anschließenden Druckversuchen.

6.1.7 Zeit- und druckabhängiges Permeationsverhalten der Caseine

Bei der Untersuchung der druckinduzierten, diffusiven Membranpermeation der Caseine bei 20 °C konnte bereits bei einem Prozessdruck von 150 MPa eine signifikante Abnahme der Caseinkonzentration im Inneren der Membranröhrchen verzeichnet werden. Abb. 6.7 zeigt die relativen Caseingehalte bezogen auf die Ausgangscaseinkonzentration zum Zeitpunkt $t=0$ im Inneren der Membran – also „retentatseitig“ – während einer 17-stündigen Druckbeaufschlagung mit 150, 300 und 450 MPa bei 20 °C.

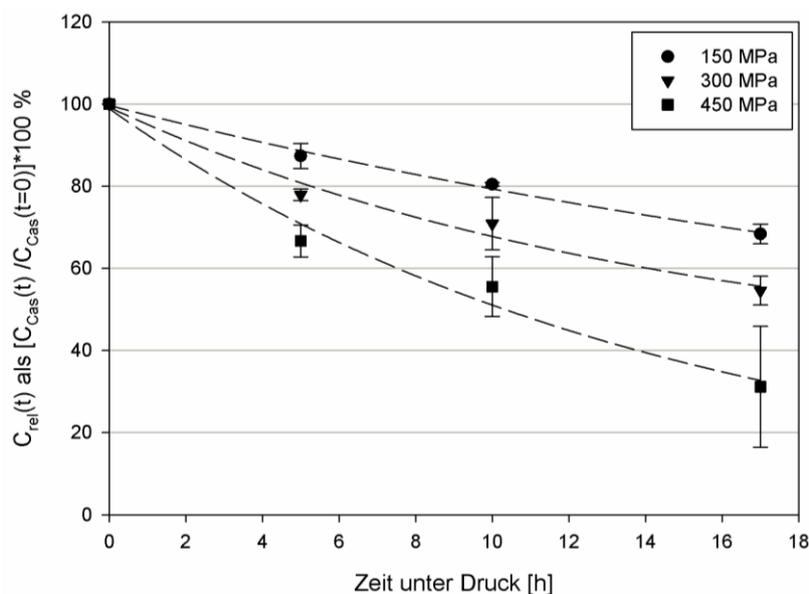


Abb. 6.7: Zeitabhängig Abnahme der relativen Caseinkonzentration im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 20 °C

Deutlich ist zu erkennen, dass mit steigendem Druck die Konzentrationsabnahme im Verlauf der Prozesszeit verstärkt wird. Da die Membranen unter Atmosphärendruck auch bei längerer Inkubation (bis zu 72 h) für intakte Caseinmizellen impermeabel waren, kann aufgrund der Integritätsuntersuchungen der Membransegmente davon ausgegangen werden, dass die Abnahme der Caseinkonzentration in V_1 (Membraninnenvolumen) auf einen Mizellzerfall mit anschließender Diffusion der Zerfallsprodukte nach V_2 zurückzuführen ist. Wegen des diffusiven Stoffdurchgangs durch das Keramikhaufwerk der Membran kann vorausgesetzt werden, dass kleinere Mizellfragmente und Caseinmonomere die Membran schneller passieren können als größere Fragmente.

Eine starke Konzentrationsabnahme des Caseins im Membraninnenraum ist somit gleichbedeutend mit einer weiter fortgeschrittenen Mizelldissoziation. Diese Schlussfolgerungen decken sich demnach mit den Untersuchungen von Regnault et al. (2004), Gebhardt et al. (2006), Lopez-Fandino, (2006) oder Gebhardt & Kulozik (2011), die mit steigendem Druck einen verstärkten Mizellzerfall beobachteten. Allerdings beschränken sich diese Untersuchungen auf die Analyse von Trübungsindices und/oder Partikelgrößen. Über das Verhalten einzelner Caseinfraktionen bei der mizellaren Dissoziation resultieren aus diesen Arbeiten keine Erkenntnisse.

Huppertz et al. (2006) und Merel-Rausch et al. (2006) beschreiben einerseits kaum eine Mizelldissoziation bei 150 MPa und andererseits eine Partikelvergrößerung im Druckbereich zwischen 250 und 350 MPa. Beides würde den Membrandurchtritt verlangsamen und steht damit scheinbar im Widerspruch zu o.g. Beobachtungen. Eine detailliertere Betrachtung offenbart jedoch, dass die dort vorgestellten Phänomene stark von Mizellkonzentration abhängig sind (Huppertz & de Kruif, 2006). Für verdünnte Lösungen ($i = 0,5$ bis $0,75$) konnte eine deutlich beschleunigte Dissoziation, d.h. schneller und bei niedrigeren Drücken erfolgend, aber auch keine Reassoziaton unter Druck beobachtet werden. Die hier verwendete 2 %ige Caseinmizellkonzentration entspricht im Vergleich mit dem originären Caseingehalt in Milch (2,6 bis 3 %) einem Verdünnungsfaktor von $i \approx 0,7$. Daher ist davon auszugehen die Caseinmizellen bei 150 MPa durchaus signifikant dissoziieren und während der Druckbehandlung nicht reassoziieren. Erst nach der Entspannung würde die Partikelreassoziaton erfolgen.

6.1.8 Betrachtung der zeit- und druckabhängigen Konzentrationsveränderung der Einzelcaseinfraktionen bei 20 °C

Mit dem beschriebenen Membranversuchsaufbau war es nun möglich, die Konzentrationsänderung des Gesamtcaseins auf einzelne Caseinfraktionen aufzuschlüsseln und damit den Mizellzerfall hin-

sichtlich der Zerfallsprodukte näher zu beschreiben. Der Caseindurchtritt und damit die Konzentrationsabnahme erfolgt unter Druck. Wegen der Größenabhängigkeit bei der Diffusion einzelner Mizellfragmente kann über die Konzentrationsverminderung eine Aussage über die Diffusionsneigung und deren Druckabhängigkeit getroffen werden. In Verbindung mit den Konzentrationsänderungen der anderen Caseine und deren Druck- und Zeitabhängigkeit sind somit Aussagen über die Mizellfragmente in ihrer Zusammensetzung und damit auch über deren Einbindung in den mizellaren Aufbau möglich.

Abb. 6.8 zeigt in der gleichen Darstellung wie Abb. 6.7 die druckabhängige Änderung der relativen α_{S1} -Casein- und α_{S2} -Casein-Konzentration bei 20 °C. Die Unterschiede in den Konzentrationsverläufen in den verschiedenen Druckstufen sind reduziert, wobei beim α_{S2} -Casein kein signifikanter Unterschied zwischen 150 und 300 MPa, dann aber eine deutlich beschleunigte Konzentrationsabnahme im Membraninneren bei 450 MPa zu erkennen ist. Beim α_{S1} -Casein dagegen ist eher ein Unterschied beim Sprung von 150 auf 300 MPa Behandlungsdruck zu erkennen, während sich die Konzentrationsverläufe während der 300 und 450 MPa-Behandlung partiell überlagern.

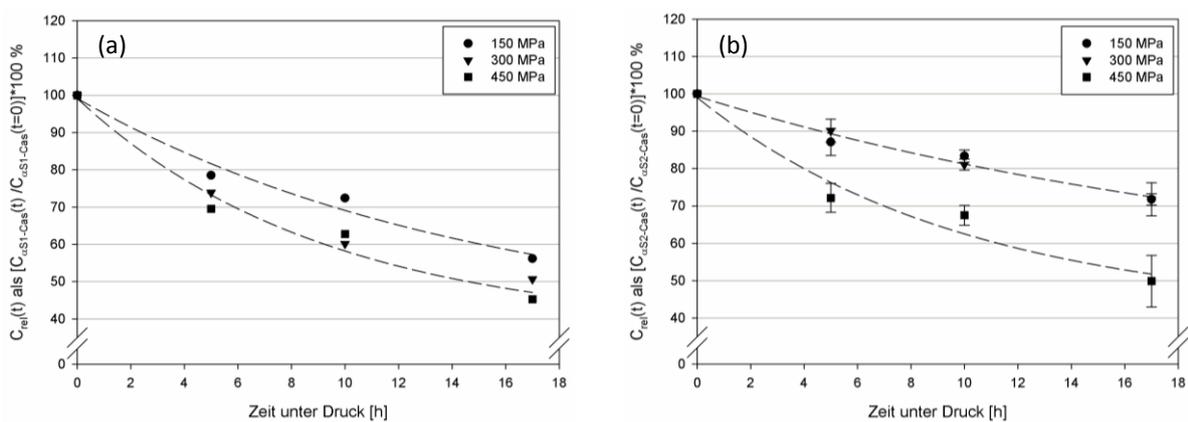


Abb. 6.8: Zeitabhängige Abnahme der relativen Konzentration von α_{S1} -Casein (a) und α_{S2} -Casein (b) im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 20 °C

Eine mögliche Erklärung könnte im Phosphoserin Gehalt der beiden α_S -Caseine liegen: Das α_{S2} -Casein weist mit im Schnitt 11 Phosphoserinresten drei Ankerpunkte mehr für CaP auf als das α_{S1} -Casein (siehe Abschnitt 2.4.2). Das Lösen der Ca-Brücken ist als statistischer Prozess anzusehen. Je geringer die Anzahl dieser Ankerpunkte in den dissoziierenden Partikeln ist, desto wahrscheinlicher ist auch deren Zerfall. Die beschleunigte Diffusion könnte bei α_{S2} -Casein daher erst später oder eben bei höheren Drücken erfolgen.

Abb. 6.9 zeigt parallel das Verhalten der β -Casein- (a) und der κ -Caseinfraction (b). Bei deren Konzentrationsverläufen als Funktion der Prozesszeit ist eine deutliche Druckabhängigkeit über alle Druckstufen zu erkennen. Mit steigendem Prozessdruck nimmt deren relative Konzentration im Vergleich zur Ausgangslösung schneller ab. Beim β -Casein bewirkt die Druckerhöhung von 150 auf 300 MPa eine stärkere Beschleunigung des Membrandurchtritts als die Drucksteigerung von 300 auf 450 MPa. Die κ -Caseinfraction zeigt dagegen eine schnellere Konzentrationsabnahme mit steigendem Druck.

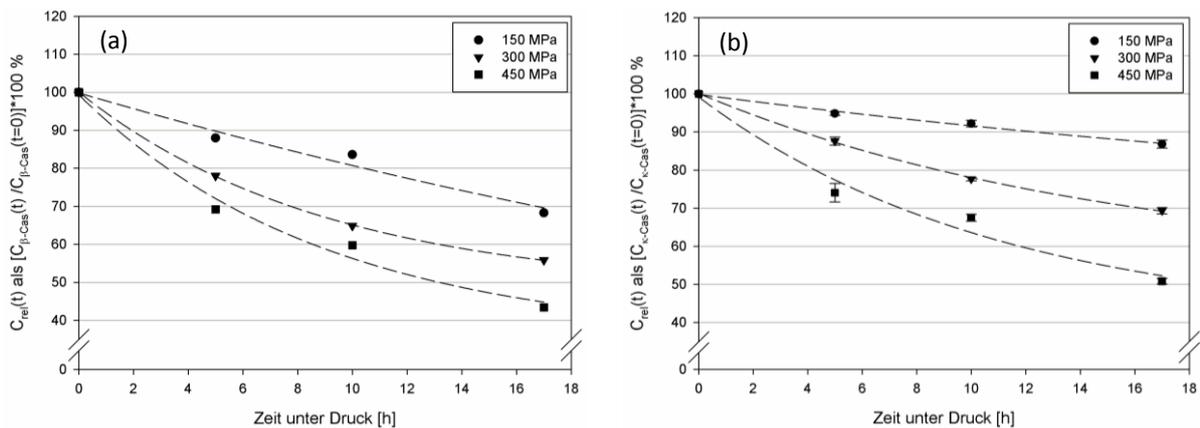


Abb. 6.9: Zeitabhängige Abnahme der relativen Konzentration von β -Casein (a) und κ -Casein (b) im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 20 °C

Werden die relativen Konzentrationsverläufe in den Einzelcaseinfractionen im formalkinetischen Ansatz aus Gl.47 eingerechnet, so kann eine virtuelle Gesamtgeschwindigkeitskonstante k für den Mizellzerfall und den Membrandurchtritt des jeweiligen Caseins bestimmt werden. Größere k -Werte stehen dabei für eine schnellere Caseinabreicherung im Membraninnenvolumen als kleinere k -Werte. Gemäß des in Gl. (38) enthaltenen Zusammenhangs kann aus den formalkinetischen Geschwindigkeitskonstanten ein Aktivierungsvolumen der betrachteten Reaktion ermittelt werden. In Tab. 6.2 sind die bei den jeweiligen Druckstufen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Konzentrationsminderung und das daraus resultierende Aktivierungsvolumen einschließlich des R^2 bei deren Ermittlung aufgeführt.

Das Aktivierungsvolumen stellt einen direkten Zahlenwert für die Druckabhängigkeit der einzelnen Caseinreduktion und damit der Wahrscheinlichkeit der Membranpassage für jede Caseinfraction dar. Ein negativer Wert steht für eine beschleunigende Wirkung des Druckes. Der Betrag gibt Auskunft über die Druckempfindlichkeit des betrachteten Phänomens. Je größer der Wert von ΔV^\ddagger ist, desto größer ist auch der Druckeffekt. Im gleichen Sinn würde ein positives Vorzeichen des Aktivierungsvolumens bedeuten, dass der Druck hemmend auf die untersuchte Reaktion einwirken würde.

Tab. 6.2: Reaktionsvolumen des Membrandurchtritts einzelner Caseinfraktionen und 20 °C als Indiz für die Druckempfindlichkeit ihrer Dissoziation

| | p [MPa] | k · 10 ³ [h ⁻¹] | ΔV [#] [cm ³ /mol] | R ² |
|------------------------------|---------|--|--|----------------|
| κ-Casein | 150 | 8,47 | | |
| | 300 | 23,41 | -13,15 | 0,98 |
| | 450 | 43,24 | | |
| α_{s2}-Casein | 150 | 20,05 | | |
| | 300 | 20,26 | -6,58 | 0,75 |
| | 450 | 44,58 | | |
| α_{s1}-Casein | 150 | 35,71 | | |
| | 300 | 47,66 | -2,92 | 0,90 |
| | 450 | 51,77 | | |
| β-Casein | 150 | 21,63 | | |
| | 300 | 39,91 | -7,55 | 0,97 |
| | 450 | 55,35 | | |

Es wird deutlich, dass β- und vor allem κ-Casein mit Reaktionsvolumina von -7,55 bzw. -13,15 cm³/mol die größte Druckempfindlichkeit hinsichtlich ihrer Konzentrationsabnahme aufweisen. Das würde für eine relativ schwache Einbindung in den Mizellverband sprechen. Für β-Casein ist ein analoges Verhalten bei einer Kühlung von Caseinsuspensionen bereits hinreichend dokumentiert (Payens & Heremans, 1969; O'Connell et al., 2003; Dagleish, 2011). Da eine Temperaturabsenkung auf hydrophobe Wechselwirkungen eine vergleichbare abschwächende Wirkung hat wie eine Druckerhöhung, würde dieses Verhalten für eine weitestgehend auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Einbindung des β-Caseins in die Caseinmizelle sprechen.

Für κ-Casein ist ein derartiges Temperaturverhalten bei der Kühlung von Milch nicht beschrieben. Bei einem Blick auf die Molekülstruktur von κ-Casein (siehe Abschnitt 2.4.2) und seiner im Dual-Binding-Modell zugrunde gelegte Rolle bei der Mizellbildung wäre diese Art Druckempfindlichkeit aber plausibel. Dass der Druckeffekt auf die Membranpassage bei β-Casein schwächer ausgeprägt ist als bei κ-Casein, könnte auf die im β-Casein vorhandenen Bindestellen für CCP zurückzuführen sein. Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil dieses Caseins auch über CaP-Brücken in den Mizellverband eingebunden ist und somit langsamer aus dem Mizellverband dissoziiert.

Bei den α_s-Caseinen ist das Reaktionsvolumen des Membrandurchtritts am geringsten. D.h. die Druckempfindlichkeit von deren Membranpassage ist deutlich reduziert. Das kann als eine besonders intensive und stabile Verflechtung dieser Caseinfraktionen im Mizellverband interpretiert werden. In der Tat weisen beide Caseine in ihrer Molekularstruktur sowohl Bereiche für hydrophobe Interaktion

als auch mehrere Phosphoserincluster auf, was deren Interaktionsmöglichkeiten im Vergleich mit β - und κ -Casein erhöht und sie somit fester in der Mizelle verankert (siehe Abschnitt 2.4.2).

6.1.9 Temperaturabhängigkeit der Permeation

Für eine genauere Betrachtung der Temperaturabhängigkeit der Caseinmizelldissoziation wurden die Prozesszeit von 10 h konstant gehalten und die Drücke bei 10, 20 und 40 °C variiert. Abb. 6.10 zeigt die relativen retentatseitigen Konzentrationen der einzelnen Caseinfraktionen nach einer Behandlung für 10 h bei 150, 300 und 450 MPa und 20 °C, jeweils bezogen auf die Ausgangslösung.

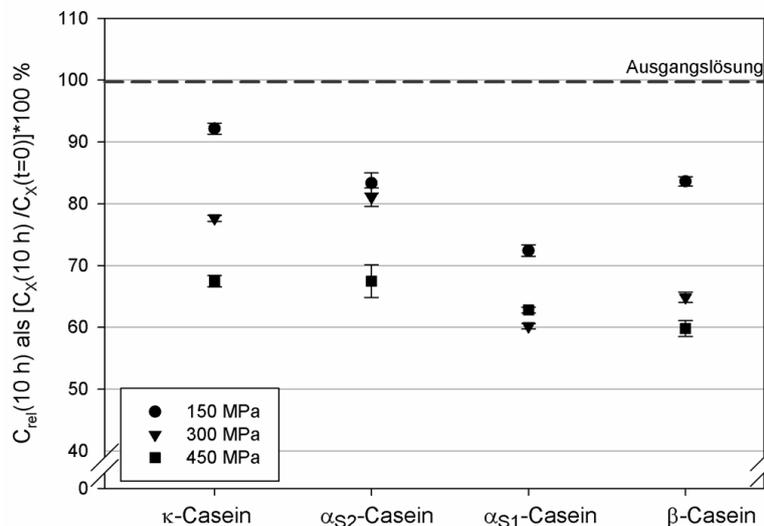


Abb. 6.10: Abnahme der relativen Konzentration der einzelnen Caseinfraktionen im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 20 °C für 10 h

Über alle Druckstufen ist die bereits beschriebene Abnahme der relativen Caseinkonzentration zu erkennen. Je höher dabei der aufgebrachte Druck ist, desto größer ist in allen Caseinfraktionen die Differenz zur Ausgangslösung. Nach einer Behandlung mit 450 MPa liegen die Konzentrationen von κ - und α_{S2} -Casein sowie von α_{S1} - und β -Casein mit etwa 67 % bzw. 60 % Restkonzentration jeweils auf dem gleichen Level. Dabei lagen die Konzentrationswerte von α_{S1} - und β -Casein unterhalb derer von κ - und α_{S2} -Casein. Nach Gebhardt et al. (2006), Huppertz et al. (2006), Knudsen & Skibsted (2010) und Gebhardt et al. (2011) kann aufgrund der detektierten Partikelgrößen bzw. Trübungsindices ab einem Druck 400 MPa davon ausgegangen werden, dass die Caseinmizelle vollständig dissoziiert ist und die Caseine als einzelne Monomere vorliegen. So würde ihre Diffusion durch die Membran maßgeblich vom dort anliegenden Konzentrationsgradienten abhängen. Mit einem Anteil von etwa 40 % am Gesamtcasein stellen α_{S1} - und β -Casein gegenüber dem κ - und α_{S2} -Casein mit jeweils etwa 10 %

die majoren Caseinfraktionen dar. Der Konzentrationsgradient ihrer Monomere ist demnach größer, was deren stärkere Konzentrationsabnahme in der gleichen Prozesszeit erklären würde.

Beim Vergleich der Caseinkonzentrationen in der niedrigsten Druckstufe von 150 MPa fällt auf, dass die α_5 -Caseingehalte im Vergleich zu β - und κ -Casein deutlich schneller abnehmen, obwohl in diesem Druckbereich die Caseinmizelle noch nicht vollständig dissoziiert ist. Gebhardt et al. (2006) zufolge entstehen Fragmente mit einem mittleren Durchmesser von etwa 10 bis 20 nm. Eine Druckerhöhung auf 300 MPa bewirkt eine weitere Dissoziation der Fragmente, was sich allerdings wesentlich stärker auf die Gehalte von β - und κ -Casein auswirkt als dies bei den α_5 -Caseinen (vor allem α_{51} -Casein) der Fall ist.

Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlich starken Verknüpfung der einzelnen Caseinmonomere liegen (siehe Abschnitt 2.4.2). Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, weisen β - und κ -Casein hinsichtlich ihrer Membranpassage die größere Druckempfindlichkeit auf. Das spricht für eine hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Einbindung in den Mizellverband, da die α_5 -Caseine zusätzlich über ihre Phosphoserincluster an CCP geknüpft sind. Die Solubilisierung des CCP nimmt nach Huppertz & de Kruif (2007a) und Hubbard et al. (2002) mit steigendem Druck zu und ist erst ab 400 MPa vollständig abgeschlossen. Somit sind bei niedrigeren Prozessdrücken noch genügend Ankerpunkte für eine stärkere Verflechtung über Ca-Phosphatbrücken vorhanden. Während hydrophobe Wechselwirkungen oberhalb der 300 MPa weitestgehend gelöst sind, sind in diesem Druckbereich die Ca-Phosphatbrücken teilweise noch intakt.

In der Zusammenschau würde dies bedeuten, dass die Caseinmizelle bei 150 MPa in kleinere Unterheiten zerfällt. Aus der besonders hohen Konzentrationsabnahme der α_5 -Caseine lässt sich ableiten, dass diese Fragmente hauptsächlich aus dieser Caseinfraktion bestehen. Die zwar langsamer diffundierenden großen Fragmente transportieren aufgrund ihres Partikelvolumens größere Mengen α_5 -Caseine durch die Membran. Die β - und κ -Caseine sind teilweise immer noch an diese größeren Partikel gebunden, steuern aber dort mengenmäßig einen geringen Volumenanteil bei, weshalb deren Konzentration nur langsam sinkt. Ein weiteres Aufbrechen dieser α_5 -caseinreichen Fragmente durch einen Drucksprung auf 300 MPa steigert die Menge an durch die Membran diffundierten α_5 -Caseins nur schwach. Der viel deutlichere Anstieg in der β - und κ -Caseinfraktion dagegen spricht dafür, dass diese Caseinfraktionen jetzt unabhängig vom α_5 -Casein diffundieren. Die Druckerhöhung setzt also die hydrophob eingebundenen Caseine aus den primären Zerfallspartikel frei und erhöht damit deren Diffusionsfähigkeit.

Da β -Casein ebenfalls Bindestellen für CCP besitzt, kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil dieses Caseins auch über CaP-Brücken stabiler in den Mizellverband

integriert ist als das rein hydrophob eingebundene κ -Casein. Das alleine erklärt jedoch nicht, warum die Konzentrationsabnahme dieses majoren Caseins bei 150 MPa im Vergleich zum α_{S1} -Casein so gering ausfällt. Aufgrund des äquivalenten Anteils am Gesamtcasein wäre zu erwarten, dass die Konzentration des β -Caseins in den primären Zerfallspartikeln in der gleichen Größenordnung liegt wie die des α_{S1} -Caseins. Dementsprechend müsste auch die relative Konzentration in gleichem Maße abnehmen. Nach de Kruif & Grinberg (2002) und Horne (1998) besitzt β -Casein bei Temperaturen über 15 °C eine Neigung zur Selbstassoziation. Es wäre also möglich, dass β -Casein bei 150 MPa zwar schnell aus der Mizelle herausgelöst wird, dann aber mit anderen β -Casein-Monomeren Assoziate bildet, die ihrerseits die Membran nur langsam passieren können. Erst mit dem Druckanstieg auf 300 MPa wird diese Selbstassoziationsneigung reduziert. Die jetzt freien Monomere passieren die Membran schneller, was zu einer deutlich beschleunigten Abnahme der relativen Konzentration führt.

Effekte einer Absenkung der Prozesstemperatur

Die einfachste Methode, die Stabilität hydrophober Wechselwirkungen und damit auch die Mizellstabilität zu variieren, ist eine Änderung der Prozesstemperatur (Gebhardt et al., 2011). Eine Temperaturabsenkung wirkt sich destabilisierend auf hydrophobe Wechselwirkungen aus, während eine Temperaturerhöhung den gegenteiligen Effekt hat.

Abb. 6.11 zeigt die Veränderungen der relativen Konzentration der einzelnen Caseinfractionen im Konzentratvolumen nach einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa bei 10 °C für 10 h. Auch bei einer Prozesstemperatur von 10 °C ist die deutliche Abnahme der Caseinkonzentrationen über alle Druckstufen zu erkennen.

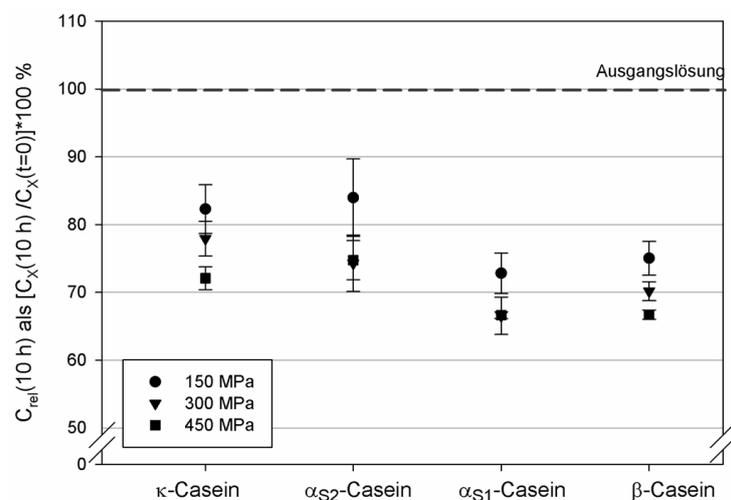


Abb. 6.11: Abnahme der relativen Konzentration der einzelnen Caseinfractionen im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 10 °C für 10 h

Wie bei den bei 20 °C durchgeführten Versuchen wird die Konzentrationsabnahme mit steigendem Druck vergrößert. Werden jedoch die Druckstufen untereinander verglichen, liegen die relativen Konzentrationen sehr viel dichter zusammen als dies bei 20 °C der Fall ist. Diese Beobachtung kann so aufgefasst werden, dass die Mizellstruktur bei 10 °C früher, also bereits bei 150 MPa, zu einem Großteil aufgebrochen wird. Ähnliche Beobachtungen machten Regnault et al. (2004). Sie beobachteten bei einem Druck von 200 MPa und einer Prozesstemperatur von 9 °C einen niedrigeren Trübungsindex als bei gleichem Druck und 20 °C, was für eine stärkere Dissoziation der Caseinmizelle bei niedrigeren Temperaturen spricht.

Die α_s -Caseine zeigen bei 10 °C im Vergleich zu Versuchen bei 20 °C keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in ihrer Konzentrationsabnahme, während β - und κ -Casein bei 150 MPa und 10 °C deutlich schneller an Konzentration verlieren als dies bei 150 MPa und 20 °C der Fall ist. Zur Veranschaulichung sind die Konzentrationsverhältnisse für diese Casein-Fractionen in Abb. 6.12 jeweils für 10 und für 20 °C vergleichend gegenüber gestellt.

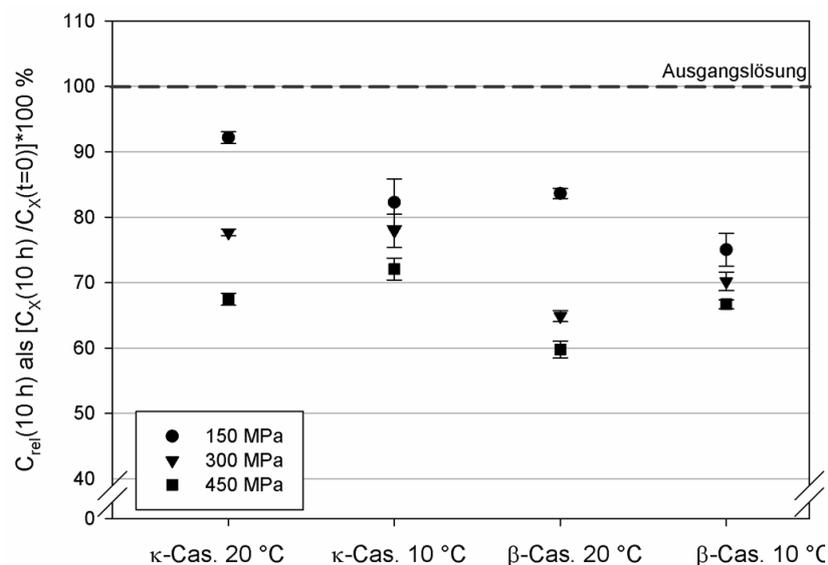


Abb. 6.12: Abnahme der relativen Konzentration bei κ - und β -Casein im Membraninnenraum bei einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa und 10 °C bzw. 20 °C für 10 h

Beide Casein-Fractionen zeigen bei einem Druck von 150 MPa und einer Temperatur von 20 °C eine deutlich geringere Konzentrationsabnahme als bei einer Temperatur von 10 °C. Die deutliche Abhängigkeit der Dissoziation von der Prozesstemperatur gerade bei 150 MPa bestätigt die Annahme, dass beide Caseine hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen und damit im Vergleich zu den α_s -Caseinen lockerer in die Mizelle eingebunden sind. Deren annähernd temperaturunabhängige Konzentrationsabnahme scheint eher für eine sehr intensive Verflechtung über Ca-Phosphat zu sprechen.

Auffallend beim Temperaturvergleich der Konzentrationsverhältnisse von β - und κ -Casein ist, dass im Fall der 450 MPa-Behandlung die Konzentrationswerte bei 20 °C unterhalb der Werte für 10 °C liegen. Bei einem Druck von 450 MPa ist, wie bereits erwähnt, davon auszugehen, dass die Caseinmizelle unabhängig von der Temperatur komplett dissoziiert vorliegt (Gebhardt et al., 2006; Huppertz et al., 2006; Knudsen & Skibsted, 2010; Gebhardt et al., 2011). Somit weisen alle Partikel eine nahezu einheitliche Größe auf und es sollte angenommen werden, dass sie deshalb in gleichem Maße an Konzentration verlieren. Der Diffusionskoeffizient in Wasser (Die Caseinsuspension mit erniedrigter Caseinkonzentration kann hier vereinfacht als wässriges System gesehen werden) ist auch unter Druck von der Temperatur abhängig (siehe Anhang E, Abb. 10.6 und Tab. 10.6). Eine Temperaturerhöhung hebt den Diffusionskoeffizienten an und beschleunigt demnach die Beweglichkeit der diffundierenden Teilchen. Eine Temperaturreduktion bewirkt das Gegenteil, was dazu führt, dass die Konzentrationsabnahme in den Caseinfraktionen bei 10 °C tendenziell niedriger ist als bei 20 °C.

Effekte einer Erhöhung der Temperatur während der Druckbeaufschlagung

Im Gegensatz zur Temperatur-Reduktion sollte sich eine Temperatursteigerung stabilisierend auf die Mizellstruktur des Caseins auswirken. Da hydrophobe Wechselwirkungen ihre maximale Stärke bei einer Temperatur von rund 60 °C aufweisen, sollte bei einer Erhöhung der Versuchstemperatur von 20 °C auf 40 °C die Caseinmizelle erwartungsgemäß eine höhere Stabilität gegenüber der druckinduzierten Dissoziation zeigen.

Bei der Betrachtung der relativen Konzentrationen der einzelnen Caseinfraktionen im Konzentratvolumen nach einer Druckbehandlung mit 150, 300 und 450 MPa bei 40 °C für 10 h zeigten sich eklatante Anomalien in den Messwerten. Zum einen lagen die Konzentrationswerte für α_{s2} -Casein in den Druckstufen 150 und 300 MPa über 100 %, was bedeuten würde, dass unter Druck „neues“ Casein gebildet worden wäre. Zum anderen weisen α_{s1} - und β -Casein bei 450 MPa die geringste Konzentrationsabnahme auf, was die vorherigen Beobachtungen und Schlussfolgerungen komplett in Frage stellen würde.

Eine Betrachtung der RP-HPLC-Fingerprints ergab deutliche Abweichungen der Peakmuster besonders in den bei 150 und 300 MPa und 40 °C behandelten Proben. Alle übrigen Versuche (10 °C, alle Druckstufen; 20 °C, alle Prozesszeiten und alle Druckstufen) zeigten diese Abweichung im RP-HPLC-Fingerprint nicht oder nicht in signifikantem Ausmaß.

Für eine eingehendere Beurteilung der Aussagekraft der Messergebnisse wurden in der Folge frische Standard-Casein-Suspensionen in Druckprobengefäße gefüllt und ohne Membraneinsatz bei 0,1 , 150, 300 und 450 MPa und 40 °C für 10 h behandelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung auf

ihre Casein-Zusammensetzung bzw. auf ihr Peak-Muster im RP-HPLC-Chromatogramm. Abb. 6.13 zeigt beispielhaft die Peakmuster der Caseinsuspension zu Beginn und am Ende einer zehnstündigen Behandlung bei 150 MPa und 40 °C ohne den Einsatz der Membransegmente.

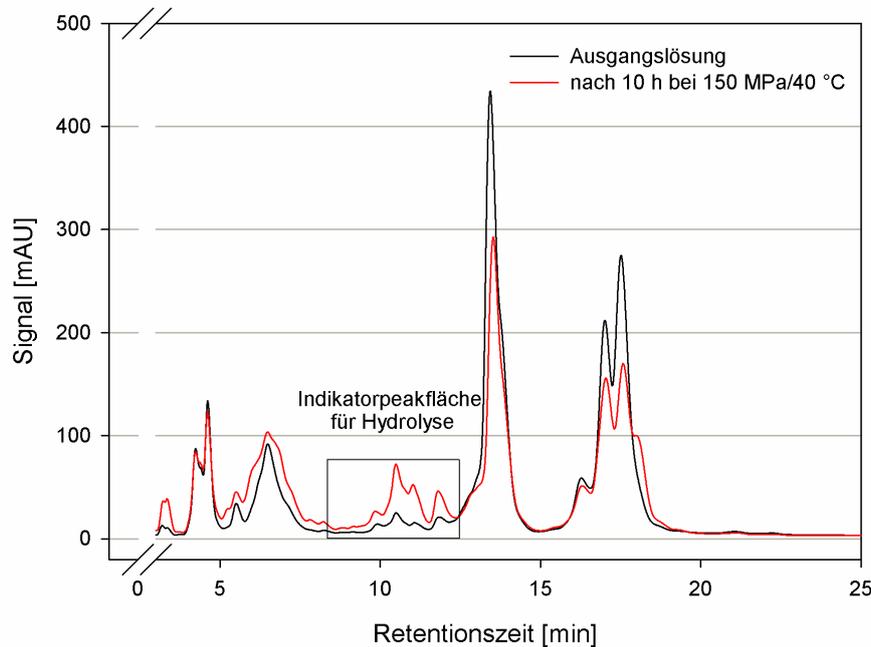


Abb. 6.13: Veränderung des Fingerprints der Ausgangslösung während einer Druckbehandlung bei 150 MPa und 40 °C für 10 h

Während die Peakfläche des κ -Caseins annähernd unverändert bleibt, ist eine deutliche Reduktion des α_{s1} - und β -Casein-Peaks zu erkennen. In dem hermetisch abgeschlossenen System ist diese Verkleinerung der Peakfläche auf eine Abbaureaktion zurückzuführen. Gleichzeitig vergrößert sich die Peakfläche von α_{s2} -Casein. Da kein neues α_{s2} -Casein unter Druck gebildet wird, kann davon ausgegangen werden, dass Teile der Abbauprodukte die gleiche Elutionszeit aufweisen und so ggf. einen α_{s2} -Caseinabbau verschleiern oder vielmehr überkompensieren.

Zuletzt ist bei einer Retentionszeit von 10 bis 12,5 min die Entstehung neuer Peaks zu erkennen. Aus dem Vergleich der Elutionszeiten der reinen Caseinstandards ist bekannt, dass im Bereich von 10 bis 12,5 min keine Caseine eluieren. Die an dieser Stelle im Chromatogramm eluierenden Substanzen stammen demnach wahrscheinlich aus dem Abbau der α_{s1} - und β -Caseine. Da die Peakflächen in der Ausgangslösung an dieser Stelle im Chromatogramm sehr klein sind, fällt deren Beitrag zur Peakflächenänderung bei der Betrachtung des Caseinabbaueffektes an dieser Stelle nicht stark ins Gewicht. Aus diesem Grund wurde zur besseren Erfassung der Chromatogrammveränderung diesem Bereich des Chromatogramms eine Indikatorfunktion für das Ausmaß des Caseinabbaus bzw. einer Hydrolyse zugewiesen.

Wird die Peakfläche auf die Ausgangsfläche bezogen, kann über die Größenverhältnisse das Ausmaß der Veränderung quantifiziert werden. Abb. 6.14 zeigt die relative Indikatorpeakfläche als Vielfaches der Fläche in der frischen Ausgangslösung zu Beginn der Behandlung. Bei zehnstündiger Lagerung bei 40 °C und Atmosphärendruck (0,1 MPa) verdoppelt sich die relevante Fläche, während sie sich bei einer Behandlung bei 40 °C und 150 bzw. 300 MPa innerhalb der gleichen Behandlungsdauer annähernd verdreifacht. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Druckstufen zu verzeichnen. Eine Druckbehandlung für 10 h bei 40 °C und 450 MPa dagegen führt tendenziell sogar zu einer Reduzierung der Fläche im Vergleich zum Parallelversuch bei 0,1 MPa, wobei die Unterschiede auch hier nicht signifikant sind ($p < 0,05$).

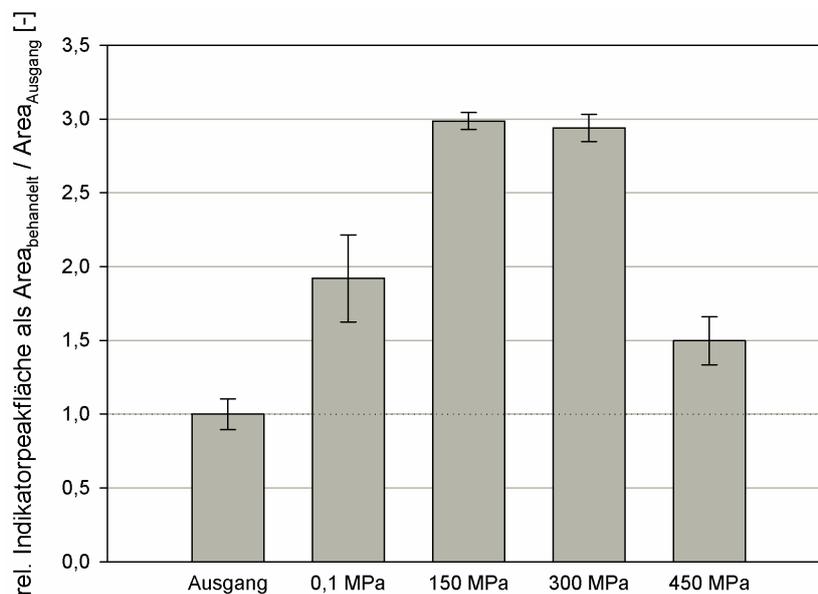


Abb. 6.14: Veränderung der Indikator-Peak-Fläche bezogen auf die Ausgangslösung während einer 10stündigen Behandlung bei 40 °C und variierenden Drücken

Ein chemischer Abbau der Caseine ist aufgrund der Prozessbedingungen auszuschließen. Vielmehr ist der beobachtete Effekt wahrscheinlich eher auf eine enzymatische Reaktion zurückzuführen. Die verwendete Caseinsuspension wurde durch Zentrifugation gewonnen, in UF-Permeat gewaschen und anschließend ein synthetisches Puffersystem (TRIS/MES) überführt. Demensprechend ist die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins serumständiger Proteasen deutlich herabgesetzt. Der Auslöser muss also casein- bzw. mizellassoziert sein. Das Plasminsystem in Milch, bestehend aus dem Enzym Plasmin selbst, seiner inaktiven Vorstufe Plasminogen sowie enzymespezifischen Inhibitoren und Aktivatoren, ist originär komplett caseingebunden (Töpel, 2004) und könnte deshalb sowie wegen des signifikanten β -Caseinabbaus als mögliche Ursache für die Fingerprintveränderung in Frage kommen.

Plasmin wird in der Literatur als überaus druckstabil beschrieben (García-Risco et al., 2003; Huppertz et al., 2004). Sein Wirkoptimum liegt bei neutralem pH und einer Temperatur von 37 °C. Dies würde

erklären, warum die Fingerprintveränderung erst bei einer Prozesstemperatur von 40 °C signifikant verzeichnet wurde. Darüber hinaus beschreiben Moatsou et al. (2008) eine druckbedingte Freisetzung von Plasminogenaktivatoren bei 200 MPa, die bei 40 °C deutlich stärker erfolgt als bei 20°C. Erst bei Drücken über 400 MPa ist diese Freisetzung wieder reduziert. Es ist also nicht auszuschließen, dass es unter Druck zu einer Aktivierung des zunächst noch inaktiven Plasminogens kommt. Demnach wäre eine gesteigerte Hydrolyse, gleichbedeutend mit einer Vergrößerung der Indikatorpeakfläche, bei 150 und 300 MPa durchaus plausibel. Auch der druckbedingte Mizellzerfall würde sich steigend auf die Umsatzrate des Enzyms auswirken, da die Substratverfügbarkeit gesteigert und auch der mizellassozierte Enzymkomplex verstärkt freigesetzt wird. Erst bei 450 MPa wird das Enzym zunehmend inaktiv und verliert seine hydrolytische Aktivität, was sich in einer Reduktion der Indikatorpeakfläche äußert.

Im Anbetracht der Peakveränderungen bei α_{S1} -, α_{S2} - und β -Casein bzw. der annähernd unveränderten κ -Casein-Peaks können die 40 °C-Versuche lediglich für κ -Casein ausgewertet werden. Denn einerseits eluieren die Abbauprodukte der anderen Caseine nicht zu dessen Retentionszeit und andererseits ist κ -Casein resistent gegenüber dem hydrolytischen Abbau durch Plasmin (Töpel, 2004). In Abb. 6.15 ist die Temperaturabhängigkeit der Konzentrationsabnahme von κ -Casein für alle Druckstufen dargestellt. Es wird deutlich, dass die temperaturbedingten Unterschiede bei 150 MPa am deutlichsten ausgeprägt sind und sich mit steigendem Druck verringern.

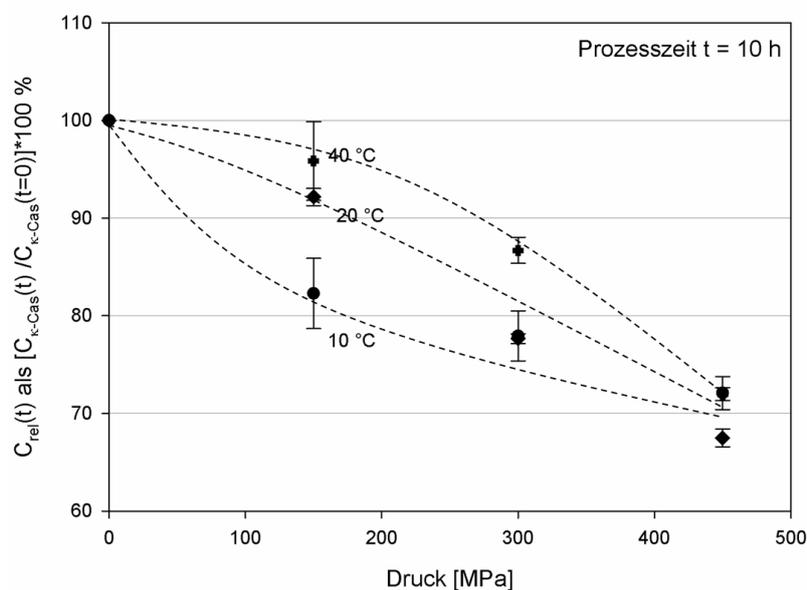


Abb. 6.15: Veränderung der relativen κ -Casein-Konzentration im Membraninnenvolumen bei einer 10stündigen Kompression bei variierenden Temperaturen als Funktion des Behandlungsdruckes

Die Konzentrationsverläufe der unterschiedlichen Prozesstemperaturen bestätigen die Hypothese der auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Einbindung von κ -Casein in die Caseinmizelle.

Da mit steigendem Druck die Ausbildung derartiger Wechselwirkungen per se inhibiert wird, hat die Temperatur mit steigendem Druck einen immer geringeren Beitrag zur Stabilisierung dieser Bindung. Während also bei 150 MPa und 10 °C κ -Casein stärker „solubilisiert“ ist und somit die Membran schnell passieren kann, führt eine Druckerhöhung auf 300 bzw. 450 MPa zwar zu einer weiteren Konzentrationsabnahme. Deren Ausmaß ist aber verglichen mit der Situation bei 150 MPa gering. Bei 150 MPa und 40 °C dagegen ist κ -Casein wesentlich fester in die Zerfallspartikel der Caseinmizelle integriert. Es diffundiert entsprechend langsamer und die Konzentrationsabnahme ist deutlich geringer. Erst durch eine Druckerhöhung auf 300 bzw. 450 MPa werden die hydrophoben Wechselwirkungen stärker gelöst und das κ -Casein diffundiert schneller durch die Membran. Der Druckeffekt ist in diesem Fall größer, was sich in einer im Vergleich zur Kompression von 0,1 auf 150 MPa verstärkten Konzentrationsabnahme bei der weiteren Kompression von 150 auf 300 bzw. 450 MPa äußert.

Nur bei 300 MPa und sonst bei keiner anderen Druckstufe konnte über alle Temperaturen nach der Prozessierung zudem an der unteren Dichtung die Bildung eines dünnen, gelartigen Niederschlags beobachtet werden. Sowohl die Beschaffenheit als auch die Menge des Sediments variierten dabei nicht. Abb. 6.16 zeigt das Aussehen und die Caseinzusammensetzung des Niederschlags im Vergleich zum Caseinspektrum in der Ausgangslösung.

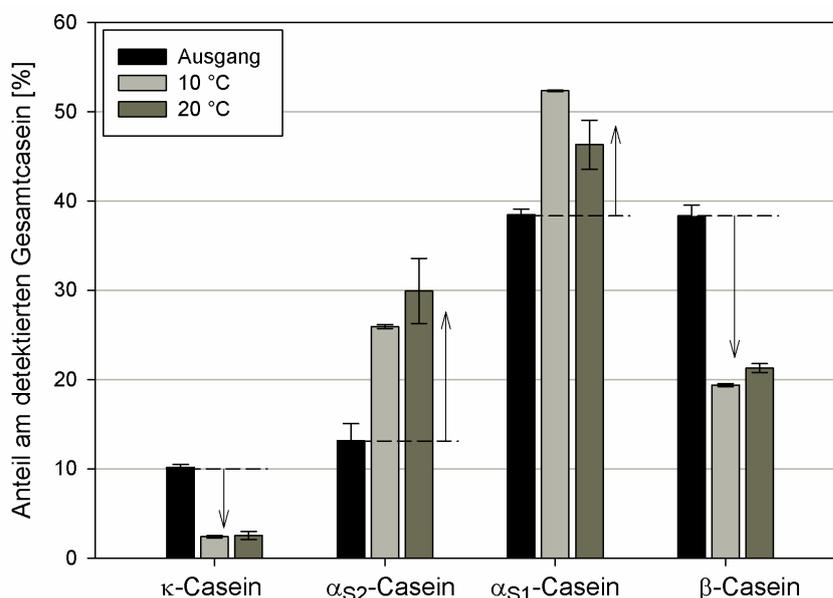


Abb. 6.16: Sedimentzusammensetzung nach einer Behandlung bei 300 MPa und 10 bzw. 20 °C für 10 h im Vergleich der Caseinzusammensetzung der Ausgangslösung

Deutlich ist zu erkennen, dass das Sediment einen erhöhten Anteil an α_s -Caseinen aufweist. Bei einer Temperaturerhöhung von 10 auf 20 °C lässt sich ein leichter Anstieg des β -Caseinanteils beobachten, während sich der κ -Caseinanteil nicht signifikant erhöht. Wird davon ausgegangen, dass bei einem

Druck von 150 MPa Caseinfragmente vorliegen, die an ihrer Oberfläche mit β - bzw. κ - Casein besetzt sind, wären diese gegen eine Ausfällung geschützt.

Werden dann bei einem Druck von 300 MPa die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen κ - bzw. β -Casein und den α_s -Caseinen aufgebrochen, liegen vermehrt Fragmente bestehend aus α_s -Caseinen und Calciumphosphat vor. Diese würden dementsprechend eine geringere kolloidale Stabilität aufweisen und es käme folglich zu einer partiellen Ausfällung dieser Fragmente. Durch die Stärkung hydrophober Wechselwirkungen bei der Temperaturerhöhung von 10 auf 20 °C wäre es möglich, dass β - bzw. κ - Casein intensiver den α_s -Casein-Fragmenten in Wechselwirkung stehen. Da β -Casein hinsichtlich einer Schutzwirkung gegen Sedimentation weniger effektiv ist als das Schutzkolloid κ -Casein (Horne, 2008), wäre der leicht erhöhte β -Casein-Gehalt im Sediment bei 20 °C erklärbar. Die Caseinfragmente, die bei der Temperaturerhöhung mehr κ -Casein enthielten, würden entsprechend nicht oder zumindest langsamer sedimentieren. Bei einem Druck von 450 MPa sind die entstehenden Caseinfragmente letztendlich so klein, dass sie innerhalb der 10stündigen Behandlung nicht sedimentieren.

6.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der membranbasierten Dissoziationsversuche im Hinblick auf die Mizellstabilität

Die vorgestellten Ergebnisse der membranbasierten Diffusionsversuche eröffnen ein detaillierteres Bild des Caseinmizellzerfalls unter Druck. Generell kann bereits bei relativ moderaten Drücken von 150 MPa ein signifikanter Mizellzerfall in kleinere Untereinheiten beobachtet werden.

Eine genauere Beobachtung des zeitabhängigen Membrandurchtritts einzelner Caseinfraktionen legt in der Zusammenschau zudem die Hypothese nahe, dass die bei 150 MPa entstehenden Zerfallsprodukte in erster Linie aus α_s -Caseinen bestehen, in die κ - und β -Caseine locker eingebunden sind. Dort steuern sie aber mengenmäßig nur einen geringen Volumenanteil bei, weshalb deren Konzentration im Vergleich zu den α_s -Caseinen durch die verlangsamte Diffusion nur langsam sinkt. Ein weiteres Aufbrechen dieser α_s -caseinreichen Fragmente durch einen Drucksprung auf 300 MPa steigert die Menge an durch die Membran diffundierten α_s -Caseins nur schwach. Der viel deutlichere Anstieg in der β - und κ -Caseinfraktion dagegen spricht dafür, dass diese Caseinfraktionen herausgelöst werden und jetzt unabhängig vom α_s -Casein diffundieren. Die Druckerhöhung setzt also die schwächer eingebunden Caseine aus den primären Zerfallspartikel frei und erhöht damit deren Diffusionsfähigkeit. Die α_s -Caseine würden demnach wegen ihrer Verknüpfung über hydrophobe Wechselwirkungen und CaP-Nanocluster erst bei höheren Drücken vollständig solubilisiert und entsprechend das stabilisierende Rückgrat der Caseinmizelle bilden. Diese Hypothese wurde bereits von (Gagnaire & Léonil,

1998) bei ihren Versuchen zum tryptischen Verdau einzelner Caseinfraktionen formuliert, fand aber in weiteren Betrachtungen zur Struktur der Caseinmizelle weniger Beachtung.

Auch das bei 300 MPa gebildete Sediment, das hauptsächlich aus α_5 -Casein besteht, untermauert die aus den Konzentrationsveränderungen abgeleiteten Erkenntnisse. Die bei einem Druck von 150 MPa gebildeten Zerfallspartikel aus α -Casein sind an ihrer Oberfläche mit locker eingebundenem β - bzw. κ -Casein besetzt und gegen eine Ausfällung geschützt. Werden dann bei einem Druck von 300 MPa die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen κ - bzw. β -Casein und den α_5 -Caseinen aufgebrochen werden, liegen vermehrt Fragmente vor, die aus über Calciumphosphat stärker vernetzten α_5 -Caseinen bestehen, aus denen die schwächer eingebundenen κ - bzw. β -Caseine herausgelöst wurden. Diese Partikel weisen dann eine geringere kolloidale Stabilität auf und es kommt folglich zu einer partiellen Ausfällung dieser Fragmente.

Niedrige Temperaturen wirken destabilisierend auf die Mizellstruktur, wobei sich eine Temperaturabsenkung vor allem auf die Dissoziation von β - und κ -Casein beschleunigend auswirkt. Diese Tatsache spricht ebenfalls für eine eher lockere und vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Einbindung dieser Caseinfraktionen in die Caseinmizelle. Eine Erhöhung der Prozesstemperatur führte lediglich bei der κ -Caseinfraktion zu auswertbaren Messergebnissen, die aber die Theorie der hydrophoben Einbindung weiter bestätigen. Die anderen Caseinfraktionen wurden bei 40 °C wahrscheinlich durch die Einwirkung mizellar gebundenen Plasmins abgebaut und konnten dementsprechend nicht mehr auf ihr Dissoziationsverhalten ausgewertet werden.

6.2 Enzymatische Modifikation von κ -Casein unter Hochdruck

Nach der Mizelldissoziation soll nun im zweiten Teil der Arbeit der Fokus auf die Vorgänge bei der nach einer Behandlung mit Drücken unterhalb von 300 MPa erfolgenden Mizellreassoziaton gelegt werden. Durch die Kompression und die anschließende Entspannung auf Normaldruck kann, ausgehend vom originären mizellaren Caseinsystem, die Mizellbildung innerhalb gewisser Grenzen mit technischen Mitteln nachgestellt werden.

Aufgrund seiner Schlüsselfunktion in vielen milchtechnologischen Prozessen aber auch wegen seiner zentralen Rolle bei der Mizellbildung und -Stabilisierung, wurde der Fokus dieser Untersuchung auf κ -Casein und seine Rolle bei der Reassoziaton gelegt. Insbesondere seine in vielen Modellen theoretisch beschriebene Rolle als größenlimitierender Faktor bei der Caseinpolymerisierung zur Caseinmizelle sollte so experimentell herausgearbeitet werden.

Dazu wurde der Weg einer chymosinkatalysierten Hydrolyse von κ -Casein unter Druck, also im dissoziierten Zustand der Caseinmizelle, gewählt. Während die Reaktion unter Normaldruck bereits sehr detailliert untersucht und beschrieben ist, existieren nur sehr wenige Arbeiten, die sich mit dem Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf das Enzym und auf die enzymatisch katalysierte Reaktion beschäftigen. In Bezug auf einen definierten Enzymeinsatz unter Druck in Kombination mit einer Beobachtung der mizellaren Reassoziaton musste also zunächst das gewählte Enzym charakterisiert und auf seine Einsatzfähigkeit unter Druck überprüft werden. Darüber hinaus galt es, die enzymatische Reaktion unter Hochdruck soweit zu beschreiben, dass eine entsprechende Ableitung der zu erwartenden Prozesszeiten möglich war. Erst danach war es möglich, die Kombination aus hydrostatischer und enzymatischer Behandlung zur Beurteilung der κ -Casein-Funktionalität bei der Caseinreassoziaton und damit in gewisser Hinsicht auch bei der Mizellbildung heranzuziehen.

6.2.1 Beschreibung der Chymosin-katalysierten Hydrolysereaktion

Die Kinetik der chymosinkatalysierten Hydrolyse von κ -Casein wurde anhand der Veränderung des detektierbaren CMP-Gehaltes in der Versuchslösung untersucht. Diese enzymatische Hydrolyse ist mit einer Bildungsreaktion 1. Ordnung gut zu beschreiben (van Hooydonk et al., 1984). Unter Produktbildung versteht man in diesem Fall die CMP-Freisetzung, bei der je aus einem κ -Casein-Molekül ein CMP-Molekül freigesetzt wird. Die formalkinetische Auswertung der enzymatischen Reaktion anhand von Gl. (41),

$$\left(\frac{CMP_t}{CMP_{max}} = DH = 1 - e^{-kt} \right),$$

wird am Beispiel der enzymatischen Hydrolyse mit nativem Chymosin in unterschiedlichen Enzymkonzentrationen veranschaulicht. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k [min^{-1}] kann durch eine nichtlineare Kurvenanpassung in der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (least square method) ermittelt werden. Abb. 6.17 zeigt die Verläufe der Chymosinreaktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen.

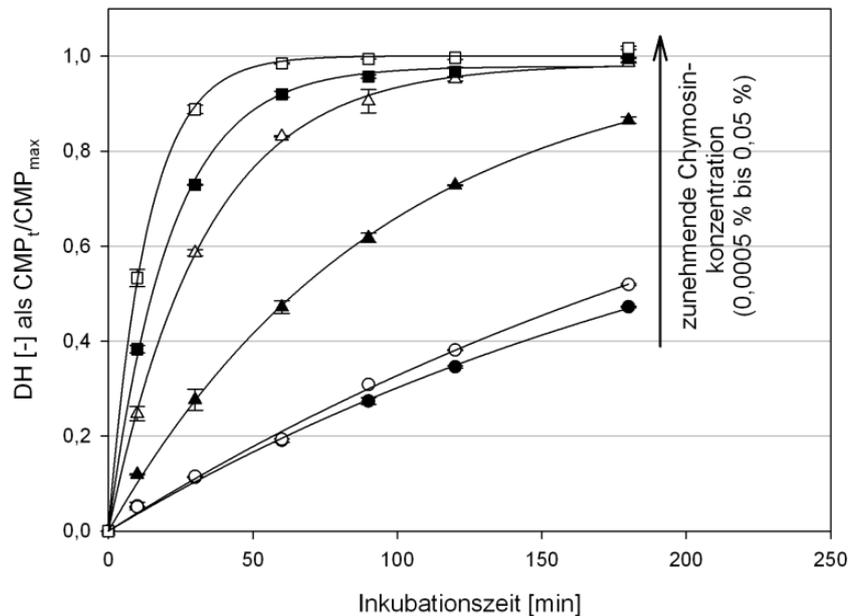


Abb. 6.17: Verlauf der Chymosinreaktion bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen

Die zwischen den Messpunkten interpolierten Linien stellen die gefitteten ($R^2 > 0,99$) Funktionsverläufe für DH, den Hydrolysegrad als Verhältnis aus CMP_t und CMP_{max} , dar. Deutlich ist zu erkennen, dass die Reaktion mit steigender Enzymkonzentration beschleunigt abläuft. Zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit wird in der Literatur oft ein linearer Zusammenhang beschrieben (van Hooydonk et al., 1984; Walstra et al., 1984). Die aus den Reaktionsverläufen ermittelten k -Werte sind in Abb. 6.18 in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration aufgetragen. Es zeigt sich zwar ein linearer Zusammenhang über den gesamten Konzentrationsbereich mit Korrelationswerten größer als 99 %, allerdings in zwei Abschnitten, mit einer Unstetigkeit bei $C_E < 0,005$ % (v/v).

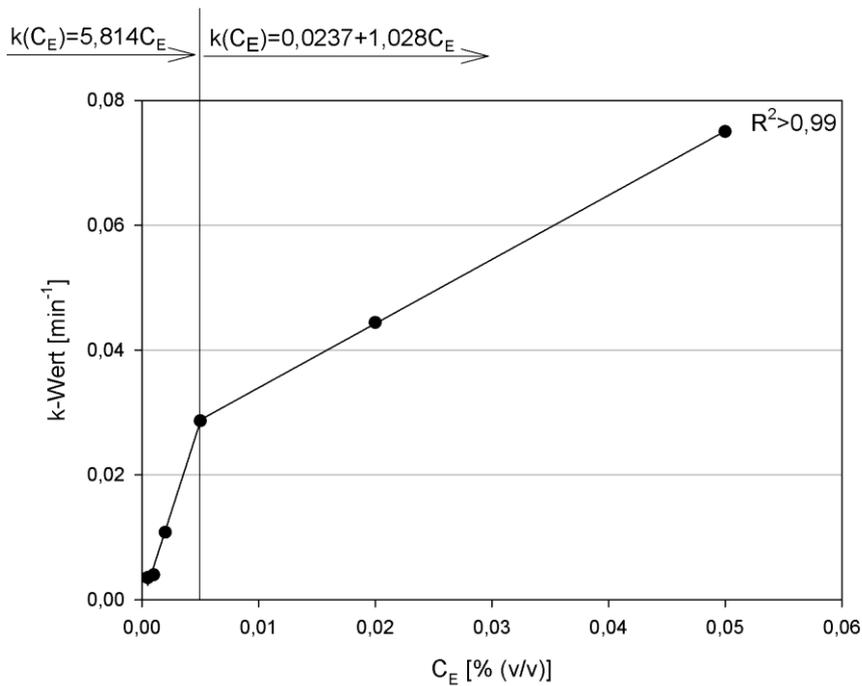


Abb. 6.18: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k und eingesetzter Enzymkonzentration

Wie in Abb. 6.17 ersichtlich ist, verläuft die enzymatische Reaktion innerhalb der ersten Minuten der Inkubationszeit am schnellsten. Um für spätere Versuche eine möglichst breite und dennoch gut definier- und realisierbare Variation in den Hydrolysegraden zu erzielen, musste die eingesetzte Enzymmenge reduziert werden. Dazu wurde die reine Enzymlösung jeweils mit serumproteinfreiem UF-Permeat auf die erforderliche Arbeitskonzentration (0,02 % v/v) verdünnt und anschließend der Caseinsuspension zugesetzt. Durch die Verwendung des UF-Permeats bei der Enzymverdünnung konnte eine Variation des Ionenmilieus in den Caseinproben bei der Enzymzugabe ausgeschlossen werden.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das in der wässrigen Phase verdünnte Enzym seine Aktivität und Spezifität in einem Zeitraum von 9 Tagen nicht signifikant verändert. Abb. 6.19 zeigt die zugehörigen Verläufe der κ -Casein-Hydrolyse durch Chymosin (0,02 %) über einen Untersuchungszeitraum von neun Tagen. Es ist zu erkennen, dass die Lagerung im betrachteten Zeitraum und unter den gewählten Bedingungen die Enzymaktivität nicht signifikant ($p < 0,05$) beeinflusst. Für das weitere Vorgehen kann also davon ausgegangen werden, dass eine Lagerung alleine keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

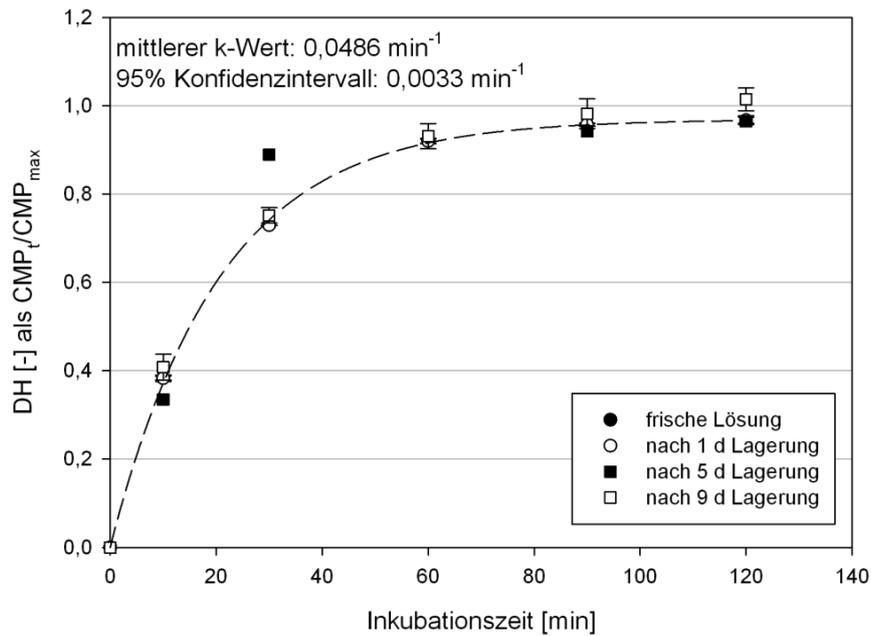


Abb. 6.19: Verlauf der Chymosinreaktion bei 30 °C bei einer zugesetzten Konzentration von 0,02 % (v/v) während einer Lagerdauer von 9 Tagen bei 4 °C

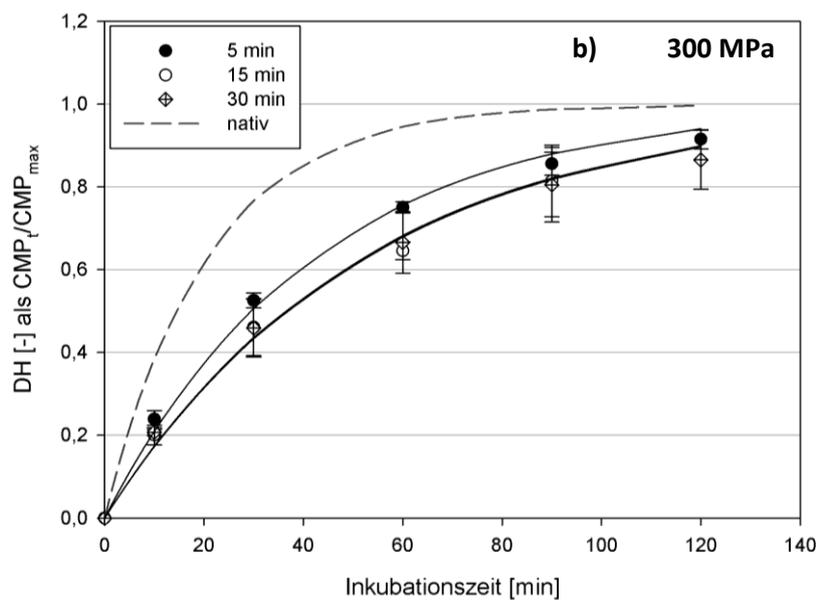
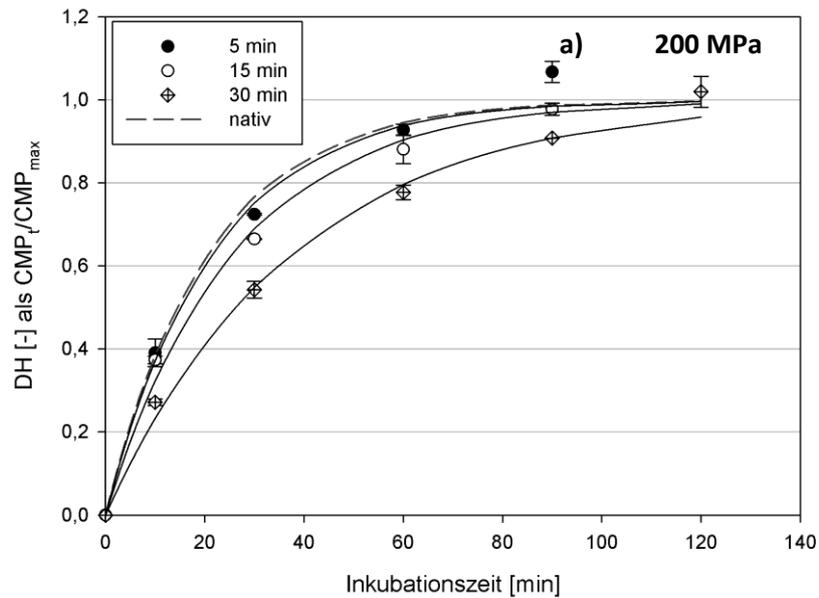
Dies ist vor allem bei der Beurteilung des Druckeffektes auf die Enzymaktivität von Bedeutung. Einerseits kann ausgeschlossen werden, dass druckunabhängige Faktoren zur Inaktivierung des Enzyms beitragen. Andererseits kann so auch die Reversibilität der Enzyminaktivierung bis zu 9 Tage nach der Behandlung über entsprechende Aktivitätsuntersuchungen bestimmt werden.

Nach Gl.35 kann aus den kinetischen Daten die Aktivierungsenergie E_A der Reaktion bestimmt werden. Dazu werden die k -Werte unterschiedlicher Temperaturen logarithmiert und anschließend über die reziproken Werte der zugehörigen absoluten Temperatur aufgetragen. Aus der resultierenden Geradengleichung kann E_A bestimmt werden. Sie stellt ein Maß für die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit dar. Je größer E_A , desto höher ist die Temperaturabhängigkeit. Die Aktivierungsenergie der Chymosinreaktion beträgt 32,2 kJ/mol*K. Die Q_{10} -Werte liegen bei 1,72 (bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur von 10 auf 20 °C) bzw. bei 1,42 (bei Erhöhung der Reaktionstemperatur von 20 auf 30 °C). Damit befinden sie sich im Bereich der in der Literatur geschilderten Größenordnung (van Hooydonk et al., 1984; van Hooydonk et al., 1986) und zeigen, dass die Reaktion zwischen 10 und 30 °C kaum temperaturabhängig ist.

6.2.2 Die Inaktivierung von Chymosin durch hohen hydrostatischen Druck

Nachdem die Rahmenbedingungen der enzymatischen Reaktion abgesteckt waren, sollte nun der Druckeffekt auf die anschließend erfolgende Enzymreaktion und damit die Inaktivierung des Chymosins in der erforderlichen Arbeitskonzentration untersucht werden. Dazu wurde die mit UF-Permeat

verdünnte Chymosinlösung bei unterschiedlichen Druck- (200 bis 400 MPa), Temperatur- (20 °C bis 40 °C) und Zeitbedingungen (5 bis 30 min Haltezeit) prozessiert. Nach einer Equilibrierung bei 4 °C wurde die Enzymlösung temperiert und der Caseinsuspension zugesetzt und der Fortschritt der enzymatischen Reaktion anhand der CMP-Freisetzung bzw. anhand des DH untersucht. Abb. 6.20 zeigt vergleichend die Effekte einer Hochdruckbehandlung bei 20 °C und unterschiedlichen Druckstufen bei Prozesszeiten zwischen 5 und 30 min.



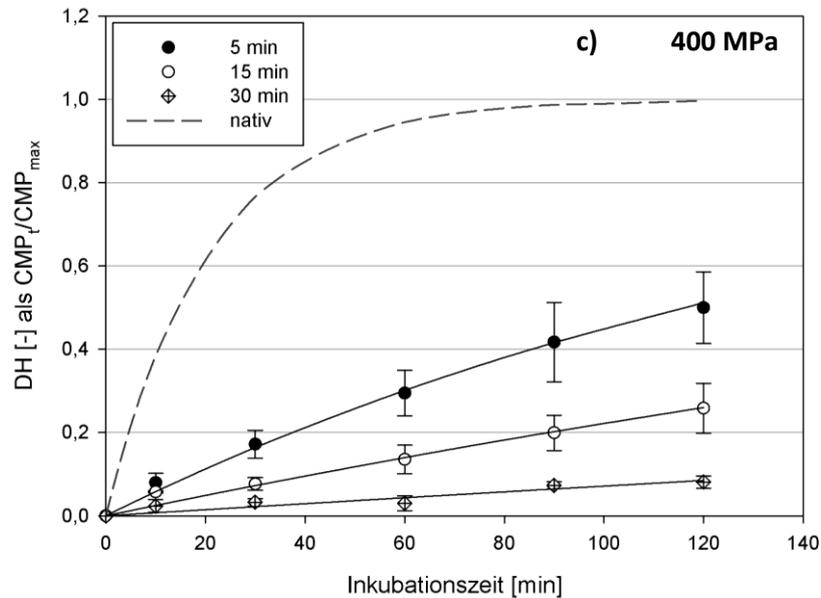


Abb. 6.20: Verlauf der Chymosinreaktion bei 30 °C nach einer Hochdruckbehandlung bei 20 °C und (a) 200 MPa, (b) 300 MPa und (c) 400 MPa.

Je höher der angesetzte Behandlungsdruck war, desto langsamer erfolgte die anschließende Hydrolyse des κ -Caseins, sichtbar an den flacheren Kurvenverläufen der DH-Werte. Darüber hinaus wird deutlich, dass bei 200 MPa und kurzen Behandlungszeiten (5 und 15 min) der Inaktivierungseffekt nur sehr schwach war. Im Vergleich zur nativen, unbehandelten Enzymlösung (DH-Verlauf als gestrichelte Linie) konnte keine signifikante ($p < 0,05$) Verlangsamung der Reaktion beobachtet werden. Bei 300 MPa wurde das Enzym in seiner Reaktivität bei allen Behandlungszeiten beeinträchtigt. Allerdings ist der beobachtete Effekt nicht signifikant von der Prozesszeit abhängig. Tendenziell zeichnete sich eine Verstärkung der Inaktivierung mit zunehmender Prozesszeit ab. Erst bei einem Prozessdruck von 400 MPa war diese Tendenz deutlich und signifikant zu verzeichnen.

Bei längerer Lagerung (bis zu neun Tage bei 4 °C) nach der Hochdruckbehandlung konnte bei den mit 200 MPa/20 °C behandelten Proben bei entsprechenden Haltezeiten von 5 und 15 min und innerhalb der ersten drei Tage ein Aktivitätsabfall auf ein dann konstant bleibendes Niveau beobachtet werden. Bei einer Druckhaltezeit von 30 min sowie bei den anderen Druckstufen war dieses Phänomen nicht zu beobachten. Ein erneutes Ansteigen der Aktivität, ein Indiz für eine reversible Denaturierung, konnte bei allen Behandlungsparametern nicht festgestellt werden. Tabelle 6.3 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der anschließenden Hydrolysereaktion der 200MPa/20°C-Reihe ($t = 5$ und 15 min) bei entsprechenden Lagerzeiten.

Tab. 6.3: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die chymosinkatalysierte κ -Casein-Hydrolyse nach einer Enzymbehandlung bei 200 MPa und 20 °C für 5 und 15 min .

| Druckhaltezeit [min] | Lagerzeit bei 4 °C [d] | k [min ⁻¹] ± σ |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 1 | 0,0464 ± 0,0009 |
| | 3 | 0,0216 ± 0,0030 |
| | 5 | 0,0170 ± 0,0018 |
| | 7 | 0,0172 ± 0,0008 |
| | 9 | 0,0237 ± 0,0086 |
| 15 | 1 | 0,0390 ± 0,0014 |
| | 3 | 0,0222 ± 0,0032 |
| | 5 | 0,0154 ± 0,0035 |
| | 7 | 0,0169 ± 0,0009 |
| | 9 | 0,0159 ± 0,0003 |

Es ist anzunehmen, dass durch die kurze Druckbeaufschlagung im Chymosin ein von der nativen Konformation abweichender Strukturzustand herbeigeführt wird. Diese Umfaltung beeinflusst zunächst die Enzymaktivität nur geringfügig, was sich in einer annähernd unveränderten enzymatischen Reaktion auch nach eintägiger Lagerung äußert. Allerdings scheint diese Konformation thermodynamisch so ungünstig zu sein, dass das Chymosin nach der Entspannung innerhalb eines Zeitrahmens von drei Tagen langsam in eine thermodynamisch stabilere Konformation mit deutlich reduzierter Aktivität übergeht.

Dieses Phänomen lässt sich anhand eines allgemeinen energetischen Ansatzes zur Proteinfaltung erklären. Die Wahrscheinlichkeit, ob ein Protein denaturiert oder nativ vorliegt, wird von den freien Enthalpien der entsprechenden Proteinzustände bzw. von deren Differenz bestimmt. Unter normalen, physiologischen Bedingungen weist der native Zustand einen deutlich niedrigeren Energielevel auf. Werden allerdings Parameter wie Druck oder Temperatur (einschließlich der Einwirkzeit) geändert, kann sich die Lage der Energielevel verschieben. Sehr anschaulich wird dies von Ando (2009) in Abb. 6.21 beschrieben:

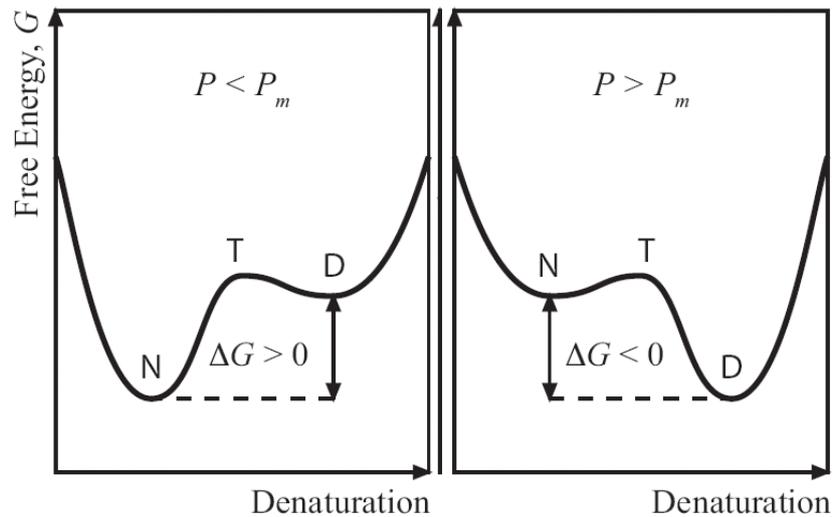


Abb. 6.21: Veranschaulichung einer zweistufigen Denaturierung in einer durch Druck veränderten „Energielandkarte“ nach Ando (2009). N: nativer Zustand, T: Übergangs- (Transition-)Zustand, D: denaturierter Zustand.

N steht dabei für den nativen, T für den Übergangs- und D für den denaturierten Zustand. Während unter Normaldruck ($P < P_m$) die Energiedifferenz $\Delta G = G_d - G_n > 0$ ist, das Protein also von thermodynamischer Seite aufgrund der energetischen Barrieren eher im nativen Zustand bleibt, ist unter bzw. nach der Einwirkung von Hochdruck ($P > P_m$) die Lage der Energielevel vertauscht ($\Delta G < 0$): Das Protein nimmt im denaturierten Zustand die energetisch günstigere Konformation ein. Wie schnell dieser umgefaltete Zustand erreicht wird, hängt davon ab, welcher Faltungsweg dorthin beschritten wird. Wird die „Energielandkarte“ als dreidimensionale Fläche wie in Abb. 6.22 dargestellt, wird deutlich, dass es hier für das Erreichen eines Energielevels mehrere, unterschiedlich lange bzw. schnelle Reaktionswege gibt. Dobson et al. (1998) beschreiben anhand experimenteller Daten die Faltung von Lysozym. Rein phänomenologisch lässt sich deren Darstellung der Faltungswegen für Lysozym (geänderte Darstellung in Abb. 6.22) auch auf das hier vorliegende Verhalten von Chymosin übertragen:

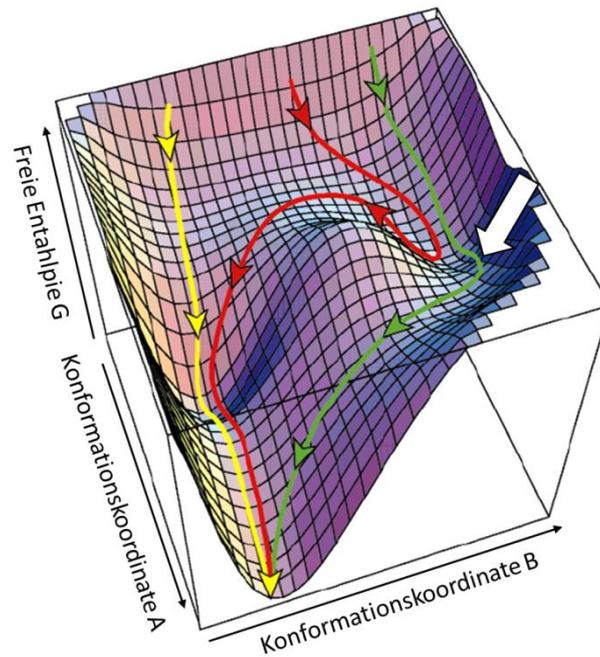


Abb. 6.22: Schematische Darstellung unterschiedlicher Faltungswege in einer Energielandschaft nach Dobson et al. (1998)

Für das Erreichen des Endpunktes der Denaturierung am unteren Energielevel sind unterschiedlich lange Faltungswege (hier gelb, rot und grün dargestellt) möglich. Der grün dargestellte Verlauf könnte schematisch dem Denaturierungsverhalten des Chymosins in den vorliegenden Experimenten entsprechen. Während bei langen Prozesszeiten und/oder höheren Drücken und Temperaturen der direkte, gelbe Reaktionsweg beschriftet wird, vollzieht sich die Umfaltung im Fall der 200 MPa / 20 °C für 5 bzw. 15 min entlang des grünen Pfeils. Nach der Druckbehandlung ist der mit dem weißen Pfeil gekennzeichnete Punkt im Pfad erreicht, dem dann der Abfall auf den Endzustand bei entsprechender Lagerung folgt. Für eine weitere Beurteilung der Inaktivierung sowie zur Bestimmung der Inaktivierungskinetik wurden dementsprechend die Mittelwerte des erreichten Plateaus nach 3 Tagen Lagerung einschließlich der Standardabweichungen zugrunde gelegt.

In Abb. 6.23 ist die Temperaturabhängigkeit der Druckinaktivierung bei einer Prozesszeit von 30 min und Druckhöhen von (a) 200 MPa, (b) 300 MPa und (c) 400 MPa in Form des Fortschrittes der chymosinkatalysierten CMP-Freisetzung in einer Caseinsuspension dargestellt. Es wird deutlich, dass eine Erhöhung der Behandlungstemperatur von 30 auf 40 °C bei allen Druckstufen einen deutlicheren Effekt auf die Chymosinaktivität nach sich zieht als eine Temperatursteigerung von 20 auf 30 °C. Darüber hinaus wird deutlich, dass bei einem Prozessdruck von 200 bzw. 300 MPa bei allen Behandlungstemperaturen nach der Behandlung deutliche Enzymrestaktivitäten zu verzeichnen sind, während das Enzym nach einer Behandlung mit 400 MPa fast keine Aktivität mehr aufweist.

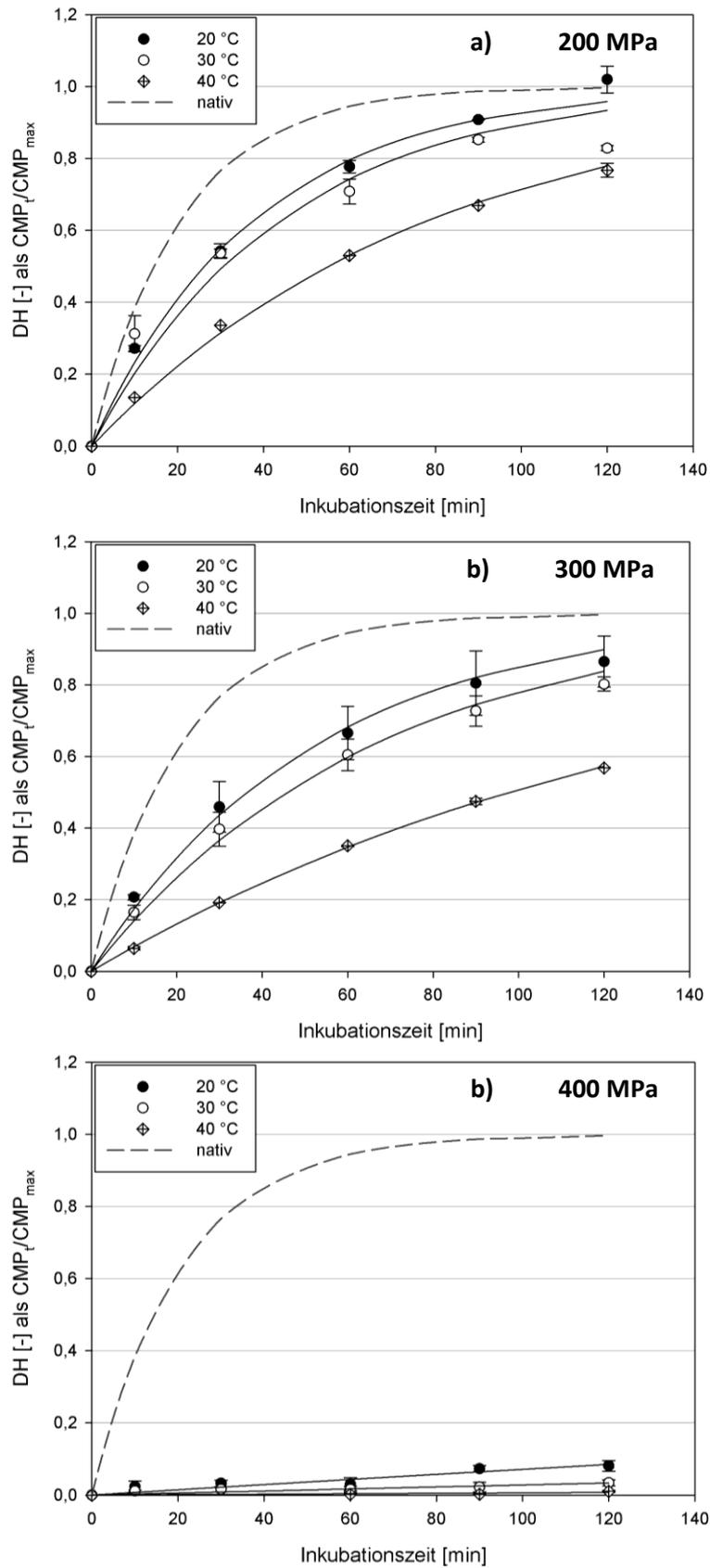


Abb. 6.23: Verlauf der Chymosinreaktion bei 30 °C nach einer Hochdruckbehandlung für 30 min bei (a) 200 MPa, (b) 300 MPa und (c) 400 MPa.

Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Druck und Temperatur auf Enzymaktivität beobachteten Trujillo et al. (2000) und Juan et al. (2007) bei der Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Kälberlab bei der Käsereifung nach entsprechender Hochdruckbehandlung. Auch hier wurde eine deutliche Inaktivierung bei einer Behandlung mit 400 MPa verzeichnet, wobei der Inaktivierungseffekt bei einer Temperaturerhöhung von 2 auf 10 °C gesteigert werden konnte. Allerdings lagen die Aktivitätswerte wegen der insgesamt niedrigen Prozesstemperatur von maximal 10 °C höher als in den hier vorgestellten Experimenten. Darüber hinaus wurden deutlich höhere Enzymkonzentrationen eingesetzt, wobei in den o. g. Studien das Hauptaugenmerk auf dem Verhalten des Enzyms bei der Käsereifung, also in einer veränderten Matrix, lag.

In Tab. 6.4 sind zusammenfassend die k-Werte der Hydrolyse-Reaktion nach vorangegangener Hochdruckbehandlung dargestellt. Durch den Bezug der k- Werte auf die Geschwindigkeitskonstante, die beim Einsatz der nativen Enzymlösung ermittelt wurde, ist zusätzlich eine relative Reaktionsgeschwindigkeit in % angegeben.

Tab. 6.4: k-Werte für die Chymosinreaktion nach Behandlung der Enzymlösung mit Drücken von 200 bis 400 MPa bei 20 bis 40 °C für 5 bis 30 min

| Prozessdruck | | 200 MPa | | | 300 MPa | | | 400 MPa | | |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------|----------------------|---------------------------|---------------|----------------------|---------------------------|---------------|----------------------|
| T [°C] | Prozess- zeit [min] | k [min ⁻¹] | 95 % Konf. | k _{rel} [%] | k [min ⁻¹] | 95 % Konf. | k _{rel} [%] | k [min ⁻¹] | 95 % Konf. | k _{rel} [%] |
| 20 | 5 | 0,0199 | 0,0032 | 40,94 | 0,0224 | 0,0015 | 46,09 | 0,006 | 0,0005 | 12,35 |
| | 15 | 0,0176 | 0,0031 | 36,21 | 0,0184 | 0,0007 | 37,86 | 0,002 | 0,0002 | 4,12 |
| | 30 | 0,0195 | 0,0031 | 40,12 | 0,0183 | 0,0012 | 37,65 | 0,0007 | 0,0001 | 1,44 |
| 30 | 5 | 0,0291 | 0,0027 | 59,88 | 0,0235 | 0,0028 | 48,35 | 0,002 | 0,0002 | 4,12 |
| | 15 | 0,0144 | 0,0013 | 29,63 | 0,0187 | 0,0001 | 38,48 | 0,0006 | 0,0001 | 1,23 |
| | 30 | 0,0181 | 0,0039 | 37,24 | 0,015 | 0,0003 | 30,86 | 0,0004 | 0,0001 | 0,82 |
| 40 | 5 | 0,0152 | 0,0001 | 31,28 | 0,0152 | 0,0003 | 31,28 | 0,0032 | 0,0004 | 6,58 |
| | 15 | 0,0144 | 0,0001 | 29,63 | 0,0107 | 0,0001 | 22,02 | 0,0003 | 0,0001 | 0,62 |
| | 30 | 0,0128 | 0,0003 | 26,34 | 0,0071 | 0,0001 | 14,61 | 0,0001 | 0,0001 | 0,21 |

Anhand dieser kinetischen Daten der Hydrolysereaktion wurde dann rechnerisch eine virtuelle Konzentration nativen Chymosins bzw. dessen relative Konzentration im Bezug auf die ursprünglich eingesetzten Enzymkonzentration bestimmt. Dazu wurde der ermittelte k-Wert in Verbindung mit dem

in Abb. 6.18 dargestellten formellen Zusammenhang in eine Enzymkonzentration umgerechnet. Der Bezug aus $\frac{C_{beh}}{C_{nat}} = C_{rel}$ beschreibt so die relative Enzymkonzentration. Der Verlauf dieser relativen Konzentration als Funktion der Behandlungszeit wurde anschließend für die betrachteten Druck-Temperaturkombinationen ermittelt. Die entsprechende Ermittlung der Reaktionsordnung gemäß des in Kessler (1996) angegebenen Vorgehens ergab ein n von 1,5. Die Veränderung der relativen Chymosinkonzentration kann also für die einzelnen Druck-/ Temperaturparameter nach Gl. (49) beschrieben werden:

$$(C_{rel})^{-0,5} = 1 + (k_i \cdot t) \quad (49)$$

Die Größe k_i beschreibt dabei die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierungsreaktion. In Tab. 6.5 sind die k_i -Werte für die unterschiedlichen Druck- und Temperaturbedingungen mit dem jeweiligen Korrelationskoeffizienten der Bestimmung angegeben.

Tab. 6.5: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Chymosininaktivierung durch Drücke zwischen 200 und 300 MPa bei 10 °C, 20 °C und 30 °C sowie einer Reaktionsordnung von $n = 1,5$

| Temperatur [°C] | 200 MPa | | 300 MPa | | 400 MPa | |
|--------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | k_i | R^2 | k_i | R^2 | k_i | R^2 |
| 20 | 0,1189 | 0,6210 | 0,1215 | 0,7063 | 0,7963 | 0,9942 |
| 30 | 0,1097 | 0,6250 | 0,1348 | 0,8448 | 1,2289 | 0,7543 |
| 40 | 0,1566 | 0,7775 | 0,2243 | 0,9079 | 2,6419 | 0,9876 |

Anhand dieser Werte lassen sich sowohl das Aktivierungsvolumen als auch die Aktivierungsenergie der Chymosininaktivierung nach Gl. (34) und Gl. (35) ermitteln. Diese Größen erlauben es, die Aussagen über die Druck- und Temperaturabhängigkeit der Reaktion bzw. der Inaktivierung von Chymosin zu quantifizieren.

Aus den in Tab. 6.6 dargestellten Werten wird ersichtlich, dass die Aktivierungsenergie mit steigendem Druck immer größer wird. Dabei bewegt sie sich mit Werten zwischen 10 und 50 kJ/mol in der Größenordnung diffusionslimitierter Reaktionen. Es kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass der thermische Einfluss auf die Chymosininaktivierung mit steigendem Druck zunimmt.

Tab. 6.6: Aktivierungsenergien für die Chymosininaktivierung bei Behandlungsdrücken von 200 MPa, 300 MPa und 400 MPa

| | 200 MPa | 300 MPa | 400 MPa |
|----------------|---------|---------|---------|
| E_a [kJ/mol] | 10,32 | 23,22 | 45,61 |

Bei der Betrachtung der in Tab. 6.7 aufgeführten Werte des Aktivierungsvolumens, das die Druckempfindlichkeit widerspiegelt, fällt auf, dass über alle Temperaturen hinweg ein negatives Reaktionsvolumen für die Inaktivierung bestimmt wurde. Das bedeutet, dass die Inaktivierung durch Druck erfolgen kann. Größer werdende Beträge des Volumens mit steigender Temperatur verdeutlichen eine zunehmende Druckempfindlichkeit mit steigender Temperatur.

Tab. 6.7 Aktivierungsvolumina für die Chymosininaktivierung bei Behandlungstemperaturen von 20 °C, 30 °C und 40 °C

| | 20 °C | 30 °C | 40 °C |
|------------------------------|--------|--------|--------|
| ΔV^\ddagger [ml/mol] | -23,15 | -30,50 | -36,71 |

Es kann also festgehalten werden, dass mit sinkender Temperatur der Druckeinfluss bzw. mit sinkendem Druck der Temperatureinfluss auf die Chymosininaktivierung minimiert werden kann. Alles in allem spricht dieses Verhalten für eine rein synergistische Wirkung von Druck und Temperatur bei der Inaktivierung des Enzyms.

6.2.3 Bestimmung der Reaktionskinetik von Chymosin unter Druck

Gerade bei 200 und 300 MPa waren bei Behandlungstemperaturen von 20 und 30 °C nach der Hochdruckbehandlung vergleichsweise hohe Restaktivitäten bzw. hohe relative Hydrolysegeschwindigkeiten ($30\% < k_{\text{rel}} < 60\%$) zu detektieren. Ferner war der Einfluss der Behandlungszeit vor allem bei den niedrigeren Prozesstemperaturen (bei 20 und 30 °C) in diesem Druckbereich gering. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass Chymosin unter Druck auch proteolytisch aktiv sein könnte. Da das Chymosin auch unter Druck aktiv sein sollte, wurden die Prozesstemperaturen reduziert, so dass die Reaktion bei 10, 20 und 30 °C untersucht wurde. In der Literatur wird nur einmal vom Einsatz von Kälberlab unter Hochdruck berichtet. Ohmiya et al. (1987) setzten reines Kälberlab bei Prozessdrücken bis 130 MPa ein und beurteilten die Geleigenschaften der resultierenden Milchgalerte. Aussagen hinsichtlich Spezifität und Enzymkinetik fehlen allerdings. Dementsprechend sollte im Folgenden die Einsatzfähigkeit und insbesondere die Enzymkinetik für die Hydrolysereaktion unter Druck ermittelt werden.

Die Chymosinreaktion unter Druck sollte im Anschluss für eine Untersuchung der Reassoziationsreaktion von Casein nach einer Hochdruckbehandlung herangezogen werden. Dementsprechend ist vor allem der Druckbereich von Interesse, der von einer reversiblen Mizelldissoziation begleitet wird: García-Risco et al. (2003), Huppertz et al. (2004), Gebhardt et al. (2006), Huppertz & de Kruif, (2006), und Lopez-Fandino (2006) beschreiben dies ohne Ausnahme nur für Drücke unter 300 MPa.

Aufgrund des Versuchsaufbaus war es nicht möglich, Chymosin erst nach Erreichen des Arbeitsdruckes zur Probe zu geben. Vielmehr erfolgte die Enzymzugabe unmittelbar vor dem Verpacken der Proben für die Behandlung. Entsprechende Vorlaufzeiten von $6,71 \text{ min} \pm 0,727 \text{ min}$ bei Atmosphärendruck waren unvermeidbar. In dieser Vorlaufzeit findet bereits zu einem gewissen Teil eine enzymatische Hydrolyse statt. Bei der Bestimmung der Enzymkinetik muss also zwischen einer drucklosen Hydrolyse (DH_{ini}) und einer Hochdruckhydrolyse (DH_p) von κ -Casein unterschieden werden. Abb. 6.24 zeigt den Verlauf der chymosinkatalysierten Hydrolysereaktion einmal durchgehend unter Normaldruck und bei einer Inkubation mit einem Drucksprung nach o.g. Vorlaufzeit auf 150 bzw. 200 MPa und 20°C .

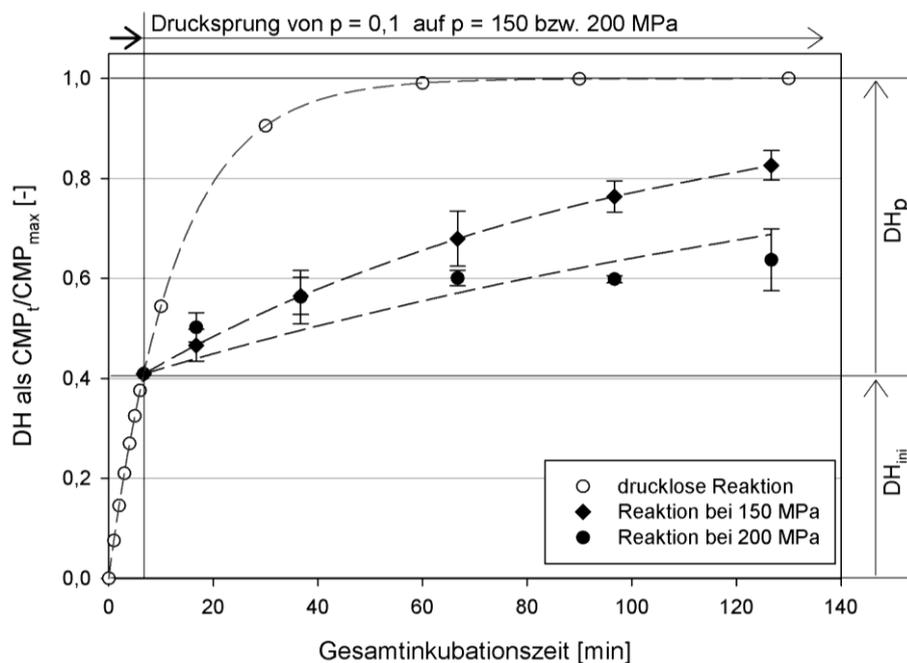


Abb. 6.24: Verlauf des Hydrolysegrades DH in Abhängigkeit der anliegenden Druckverhältnisse

Innerhalb der ersten 6 min verlaufen die Reaktionen identisch. Mit beginnendem Druckaufbau ist ein deutlicher Knick im Verlauf des Gesamthydrolysegrades DH zu verzeichnen. Danach steigt die CMP-Konzentration aber je nach Druckhöhe deutlich verlangsamt. Die bis zum Druckaufbau erfolgte Hydrolyse wird im DH_{ini} erfasst, während die Druckhydrolyse durch DH_p widerspiegelt wird. Die Summe beider Hydrolysegrade ergibt den Gesamthydrolysegrad DH.

Um zu ermitteln, ob die nach der Druckbehandlung gemessenen ansteigenden CMP-Gehalte in den Proben tatsächlich auf die Wirkung von Chymosin zurückzuführen ist, wurden Blindproben ohne Enzymzugabe unter gleichen Prozessbedingungen behandelt.

Wie in Abb. 6.25 zu erkennen ist, erfolgte durch die Druckbehandlung keine unspezifische CMP-Freisetzung. Die CMP-Konzentration stimmt innerhalb des 95 %igen Konfidenzintervalls mit der Konzentration in den unbehandelten Blindproben überein.

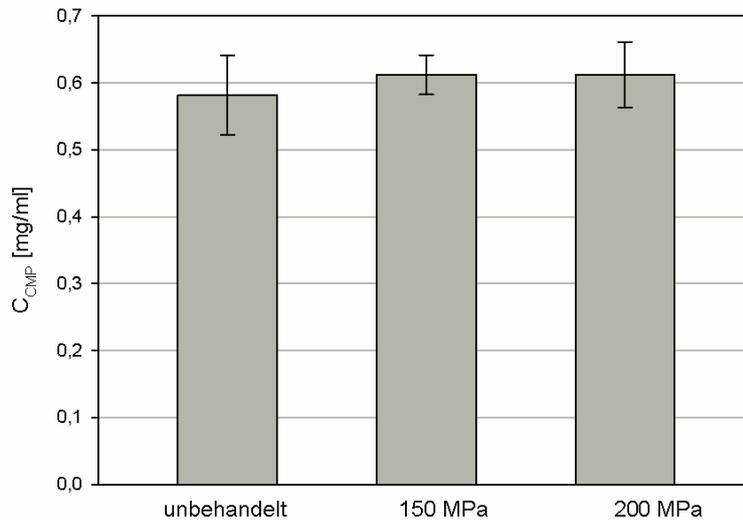


Abb. 6.25: Mittlere CMP-Gehalte in den unbehandelten und 120 min Hochdruckbehandelten Blindproben ohne Chymosinzugabe

Eine druckinduzierte Freisetzung von CMP ist von thermodynamischer Seite erwartungsgemäß eher unwahrscheinlich. Eine Hochdruckbehandlung bis 1000 MPa bei neutralem Milieu führt nicht zu einer Spaltung von kovalenten Bindungen (Mozhaev et al., 1996). Durch den Dissoziations- und Reassoziationsprozess der Caseinmizelle wurde der CMP-Gehalt in den Proben also nicht signifikant verändert. Ein Anstieg der messbaren CMP-Konzentration in den Proben, die mit Chymosin hochdruckbehandelt wurden, ist also auf die Enzymwirkung zurückzuführen.

Darüber hinaus änderte sich bei einer anschließenden Inkubation der hochdruckbehandelten Caseinsuspensionen mit nativem Chymosin auch die Menge des maximal freisetzbaren CMP nicht. Auch wenn die Caseinmizellen nach der Hochdruckbehandlung eine leicht veränderte, kompaktere interne Struktur aufweisen, ist doch die Lage des κ -Caseins und damit des CMP unverändert. Demzufolge gelangten bei der Reassoziierung weder zusätzliche Mengen κ -Casein an die Mizelloberfläche noch wurden signifikante Mengen ins Mizellinnere eingelagert, wo sie für das Chymosin schlechter zugänglich sind.

Für die Bestimmung der Kinetik der Chymosinreaktion unter Druck musste zunächst eine Koordinatenverschiebung vorgenommen werden, bei der die initiale Hydrolyse aus der Gesamthydrolyse herausgerechnet wird. Dazu wird die in der Vorlaufzeit bis zum Druckaufbau freigestzte CMP-Menge (DH_{ini}) ermittelt und abgezogen. Auch die Zeitachse verschiebt sich entsprechend um die drucklose Vorlaufzeit, so dass der neue Koordinatenursprung zu Beginn des Druckaufbau bei $DH_p = 0$ bzw.

DH = DH_{ini} zu liegen kommt. Nach dieser Messwerttransformation, die in Abb. 6.26 dargestellt ist, erfolgte die Bestimmung der k-Werte bei einer Reaktionsordnung von n = 1 wiederum durch eine nichtlineare Kurvenanpassung in der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (least square method).

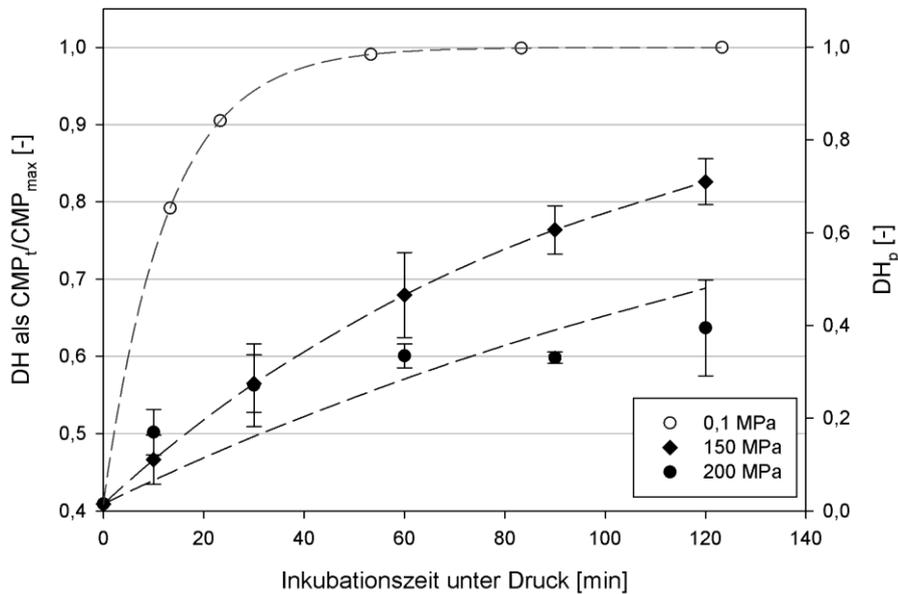


Abb. 6.26: Verläufe von DH und DH_p nach der Koordinatenverschiebung zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Chymosinreaktion unter Druck

Eine Variation der Reaktionsordnung bei der Bestimmung der k-Werte führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der Korrelationswerte, weshalb für die Beschreibung der Hydrolysereaktion unter Druck auch die Reaktionsordnung 1 angenommen wurde. In Tab. 6.8 sind die ermittelten k-Werte zusammen mit ihrem 95 %igen Konfidenzintervall und dem Bestimmtheitsmaß R² bei der Kurvenanpassung angegeben.

Tab. 6.8: Geschwindigkeitskonstanten der Chymosinreaktion bei Drücken bis zu 200 MPa und Behandlungstemperaturen von 10, 20 und 30 °C

| Druck | 0,1 MPa | | 150 MPa | | 200 MPa | |
|--------|--|----------------|--|----------------|--|----------------|
| | k·[10 ⁻³ min ⁻¹] ± Konf. | R ² | k·[10 ⁻³ min ⁻¹] ± Konf. | R ² | k·[10 ⁻³ min ⁻¹] ± Konf. | R ² |
| T [°C] | | | | | | |
| 10 | 45,36 ± 3,72 | 0,98 | 6,99 ± 0,87 | 0,84 | 2,64 ± 0,34 | 0,88 |
| 20 | 78,44 ± 4,31 | 0,99 | 10,20 ± 1,50 | 0,90 | 5,33 ± 0,66 | 0,88 |
| 30 | 111,68 ± 2,64 | 0,96 | 8,87 ± 0,77 | 0,90 | 2,32 ± 0,37 | 0,93 |

Es ist zu erkennen, dass mit steigendem Prozessdruck die Reaktion verlangsamt abläuft. Schon bei einem Behandlungsdruck von 250 MPa konnte keine CMP-Freisetzung mehr beobachtet werden. Der DH stieg während der Hochdruckbehandlung nicht signifikant über DH_{ini} an. Es fällt auf, dass die k -Werte unter Druck bei einer Behandlungstemperatur von 20 °C höher liegen als jeweils bei 10 und 30 °C. Während bei 150 MPa dieser Trend noch nicht signifikant ist, liegt bei 200 MPa die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei 20 °C deutlich oberhalb der Werte von 10 und 30 °C.

Werden die zugehörigen Aktivierungsenergien berechnet, so wird ersichtlich, dass der thermische Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Druck geringer wird (Tab. 6.9). Der Betrag von E_a fällt von 32,2 kJ/mol auf rund 8 kJ/mol ab.

Tab. 6.9: Aktivierungsenergien der chymosinkatalysierten κ -Casein-Hydrolyse bei 0,1, 150 und 200 MPa

| | 0,1 MPa | 150 MPa | 200 MPa |
|----------------|---------|---------|---------|
| E_a [kJ/mol] | 32,22 | 8,71 | 7,35 |

Dass die Reaktion durch die Druckapplikation verlangsamt wird, ist auch an den in Tab. 6.10 dargestellten Aktivierungsvolumina ersichtlich. Bei allen untersuchten Temperaturen ist ein positiver Wert zu verzeichnen, was einer druckbedingten Hemmung der Reaktion entspricht. Zusätzlich zeigte sich, dass mit steigender Temperatur der Betrag größer wird, die Druckempfindlichkeit also zunimmt. Auch die hydrostatische Inaktivierung von Chymosin zeigte mit zunehmender Prozessstemperatur eine steigende Druckempfindlichkeit.

Tab. 6.10: Aktivierungsvolumina der chymosinkatalysierten κ -Casein-Hydrolyse bei 10, 20 und 30 °C

| | 10 °C | 20 °C | 30 °C |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| ΔV^\ddagger [ml/mol] | 32,49 | 32,91 | 44,36 |

Durch den Bezug der k -Werte der Reaktion unter Druck auf die drucklosen Ausgangswerte bei entsprechender Temperatur kann bei angenommener konstanter Substratverfügbarkeit indirekt auf die Enzymaktivität unter Druck geschlossen werden. Bei der Auftragung von konstantem $k_{rel} = \frac{k_{p,T}}{k_{atm,T}}$ als Funktion von Druck und Temperatur kann das Phasenverhalten von Chymosin grafisch wie in Abb. 6.27 dargestellt werden. Die roten Bereiche kennzeichnen Bereiche höherer Hydrolyseraten und damit höherer Enzymaktivität, während die Enzymaktivität zu den blauen Bereichen hin abfällt.

Die relative Aktivität beträgt im Bereich von 10 und 20 °C bei 150 MPa ca. 14 %, für 30 °C 7 %. Die relative Aktivität sinkt bei einem Druck von 200 MPa auf 2 % bei 30 °C und ca. 6 % bei 10 und 20 °C.

Es ist daher anzunehmen, dass Chymosin durch niedrige Temperaturen unter Druck stabilisiert wird, bei höheren Drücken und niedrigen Temperaturen jedoch wieder instabiler ist.

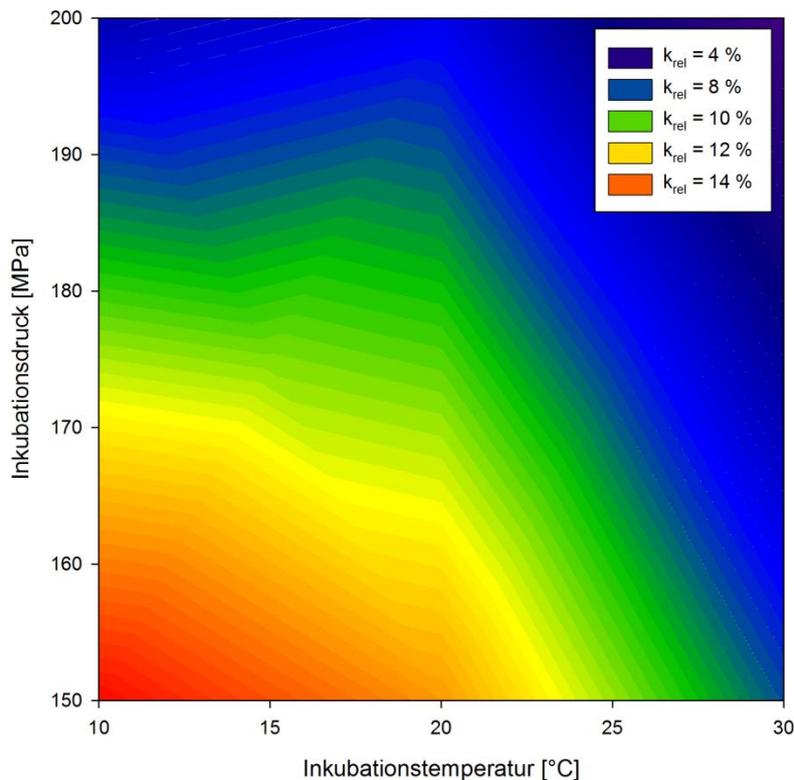


Abb. 6.27: Relative Reaktionsgeschwindigkeitswerte k_{rel} [%] der κ -Casein-Hydrolyse im Druckbereich von 150 bis 200 MPa bei 10, 20 und 30 °C

Der Verlust der enzymatischen Aktivität unter Druck kann verschiedene Ursachen haben und soll im Folgenden etwas näher beleuchtet werden. Im Allgemeinen ist die katalytische Funktion von Enzymen von ihrer Raumstruktur abhängig und kann somit durch Druck beeinflusst werden. Die Reduzierung der Enzymaktivität kann also einerseits auf eine Inaktivierung des Enzyms in Folge seiner Denaturierung zurückzuführen sein. Da aber die CMP-Freisetzung als Indiz für die Enzymaktivität herangezogen wurde, wäre auch eine Änderung der Enzymspezifität denkbar. Das Enzym würde dann anstelle von CMP andere Reaktionsprodukte liefern und die Menge detektierten CMP's reduzieren. Würde dies der Fall sein, würden sich die aus HPLC-Analytik erhaltenen Chromatogramme in ihrem Fingerprint verändern. In Abb. 6.28 sind die HPLC-Chromatogramme von für 120 min sowohl bei 0,1 als auch bei 150 und 200 MPa mit Chymosin-inkubierten Caseinsuspensionen vergleichend dargestellt. Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Peakmuster lediglich in der Höhe der markanten Peaks, die mit steigendem Inkubationsdruck abnehmen. Es wird also immer weniger CMP freigesetzt. Da keine neuen Peaks als Indizien für neue Spaltprodukte detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass sich die Spezifität von Chymosin unter Druck nicht signifikant ändert.

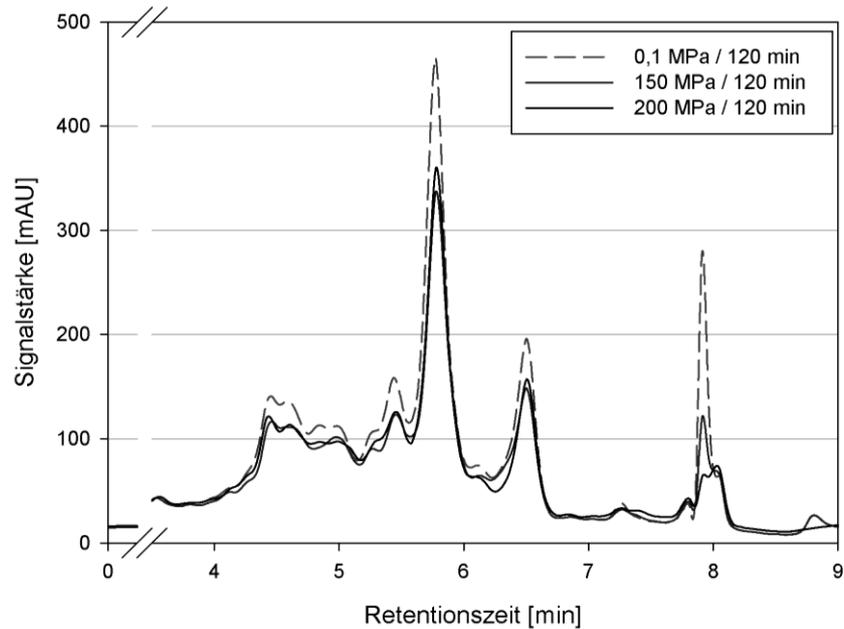


Abb. 6.28: RP-HPLC-Chromatogramme für CMP aus für 120 min bei 0,1, 150 und 200 MPa und 20 °C inkubierten Caseinsuspensionen

Auch Veränderungen der Versuchslösung könnten die Ursache für die mit steigendem Druck abnehmenden CMP-Gehalte sein. Da für Milch bzw. für Caseinsuspensionen unter Druck keine Literaturwerte hinsichtlich Viskositäts- oder pH-Veränderungen vorliegen, wird vereinfachend angenommen, dass sich die Versuchslösung unter Druck wie Wasser verhält. Ein wichtiger Parameter für die beobachtete Reaktion ist die Änderung der Viskosität, die damit verbundenen Änderung des Diffusionskoeffizienten und damit die Kollisionswahrscheinlichkeit von Enzym und Substrat. Die Viskosität von Wasser bei den entsprechenden Drücken und Temperaturen ändert sich nur in einem sehr geringen Maß und würde eigentlich beschleunigend auf die diffusiv limitierte hydrolytische Reaktion wirken. So besitzt Wasser beispielsweise bei 150 MPa und 10 °C eine niedrigere Viskosität als unter Normaldruck (eine detaillierte Auflistung der thermophysikalischen Parameter von Wasser nach der NIST-Datenbank ist im Anhang in Abb. 10.6 und Tab. 10.6 angegeben).

Der der Hydrolyse zugrunde liegende Reaktionsmechanismus wird in der Literatur als protonenabhängig beschrieben. Neben der Enzym- und Substratkonformation beeinflusst der pH-Wert also auch direkt die Hydrolysereaktion (Chitpinyol & Crabbe, 1998). Druckbedingt ist in wässrigen, ungepufferten Medien aufgrund der Elektrostriktion eine pH-Absenkung zu verzeichnen. Ausgehend von einem neutralen pH-Wert würde eine moderate Absenkung des pH-Wertes unter Druck eher zu einer Aktivitätssteigerung führen, da das Optimum der Hydrolyse bei pH 6,0 liegt. Da die Absenkung des pH-Wertes im untersuchten Druckbereich theoretisch bei etwa 0,1 - 0,3 pH-Einheiten liegt und die Suspension eine Vielzahl puffernder Substanzen enthält, ist anzunehmen, dass sich der pH-Wert unter Druck nicht oder nur in geringem Maße ändert.

Ungeachtet der pH-Veränderung des Mediums kann die katalysierte Reaktion direkt durch den Druck gehemmt werden. Da mit der Hydrolyse aus einem κ -Casein-Molekül zwei Moleküle, CMP und para- κ -Casein, freigesetzt werden, erhöht sich im betrachteten System die Teilchenzahl. Das gilt auch für κ -Casein im Mizellverband, nur dass dann die Teilchenzahl im System mit der Hydrolyse nicht so stark ansteigt, da das para- κ -Casein im Mizellverband verbleibt und nur das freigestzte CMP zur Erhöhung der Teilchenzahl beiträgt. Nach dem Prinzip von LeChatelier werden derartige Reaktionen unter Druck verlangsamt ablaufen.

Wegen der Überlagerung dieser Effekte ist die genaue Ursache für Verlangsamung der Enzymreaktion kaum auszumachen. Wahrscheinlich spiegelt die reduzierte CMP-Freisetzung einerseits eine Enzyminaktivierung unter Druck und eine generelle Verzögerung der Reaktion selbst wieder. In Anbetracht der erzielten Umsatzraten bzw. der relativen k-Werte wurden für die folgenden Versuche zur enzymatischen Modifikation von κ -Caseine und deren Auswirkung auf das Reassoziationsverhalten der Caseinmizellen die Parameter von 150 und 200 MPa bei 20 °C ausgewählt. Der erzielbare Hydrolysegrad lässt sich nach Gl. (50) berechnen, was zur Bestimmung für definierte DH-Werte herangezogen wurde.

$$DH(t, t_V) = \begin{cases} DH_{ini}(t_V), & t \leq t_V \\ DH_{ini}(t_V) + (1 - DH_{ini}(t_V)) \cdot DH_p(t - t_V), & t > t_V \end{cases} \quad (50)$$

mit

$$DH_{ini}(t) = 1 - e^{(-k_{atm,T} \cdot t)}$$

$$DH_p(t) = 1 - e^{(-[k_{atm,T} \cdot k_{rel}] \cdot t)} \text{ und}$$

$$t = t_V + t_p$$

Dabei stehen DH_{ini} für die initiale drucklose Hydrolyse während der Vorlaufzeit t_V unter Atmosphärendruck und DH_p für die Hydrolyse während der Inkubationszeit unter Druck t_p . Der gesamte Hydrolysegrad DH beschreibt den Verlauf während der Gesamtprozesszeit t . Die Geschwindigkeitskonstanten k_{atm} oder k_{rel} entsprechen den experimentell ermittelten Werten.

6.2.4 Auswirkungen einer partiellen Hydrolyse von κ -Casein auf das Reassoziationsverhalten druckdissozierter Caseinmizellen

Für die Versuche zum druckinduzierten Dissoziations- und Reassoziationsverhalten von Caseinmizellen unter dem Einfluss einer unter Druck vollzogenen partiellen κ -Casein-Hydrolyse sollten möglichst native Caseinmizellen verwendet werden.

Die hier verwendeten Caseinmizellen wurden durch Ultrazentrifugation aus pasteurisierter Magermilch gewonnen und nicht wie bei der Bestimmung von Enzyminaktivierung bzw. Enzymaktivität und Enzymkinetik unter Druck durch Trocknung, um eine möglichst geringe Vorprozessierung zu gewährleisten.

Probengewinnung und -Charakterisierung

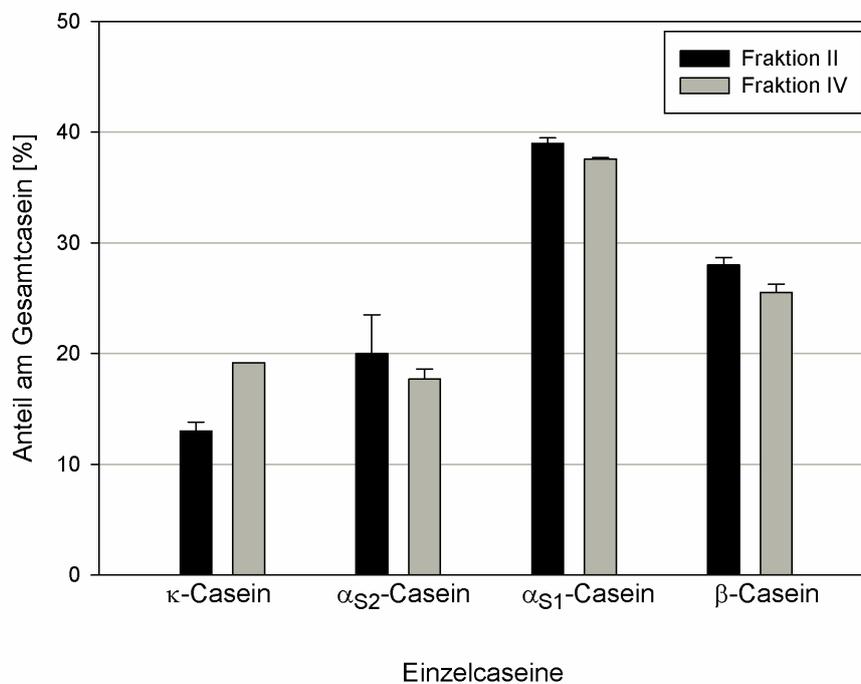
Zur Reduzierung des Einflusses von Molkenproteinen sowie zur Visualisierung kleinerer Veränderungen in den polydispersen Partikelgrößenverteilungen der Caseinproben wurden Caseinmizellen durch Ultrazentrifugation bei 71000 g_a für 65 min aus Magermilch sedimentiert und anschließend in serumproteinfreiem UF-Permeat resuspendiert. Die so gewonnene Roh-Caseinsuspension wurde anschließend durch schrittweise Ultrazentrifugation mit ansteigenden g_a -Zahlen in sechs Fraktionen aufgeteilt, wobei der Zentrifugationsüberstand des einen Schrittes die Suspension für den folgenden Zentrifugationsschritt darstellt. Die erhaltenen sedimentierten Pellets wurden wiederum in UF-Permeat resuspendiert und für die weiteren Versuche bei 4 °C gelagert. Bei diesem Vorgang erhöht sich mit kleiner werdendem Mizelldurchmesser, wie von Dalgleish et al. (1989) und Marchin et al. (2007) beschrieben, der relative κ -Casein-Anteil am Gesamtcasein, während die Anteile von α_{s1} - und α_{s2} -Casein annähernd unabhängig von der Mizellgröße sind. Durch die Mizellgrößenfraktionierung könnte es demnach möglich sein, die Rolle des κ -Caseins bei der Mizellreassoziaton deutlicher herauszustellen, in dem das Verhalten unterschiedlicher Größenfraktionen eingehender untersucht wird.

Die Partikelgrößenverteilung in Milch wird in der Literatur als Log-normalverteilt beschrieben (de Kruif, 1998; Gebhardt et al., 2011). Auch die nach der Zentrifugation erhaltenen Suspensionen wiesen Log-normalverteilte Partikelgrößen auf: Durch die Kurvenanpassung der gemessenen Partikelgrößenverteilungen an eine 3-parametrische Log-Normalverteilung wurden die vorliegenden Verteilungen geprüft. Alle Fits lieferten R^2 -Werte $> 0,97$, was als Bestätigung für das Vorliegen entsprechender Verteilungen gewertet wurde. Tab. 6.11 zeigt die an die Verteilungen angepasste Funktion, die zugehörigen Funktionsparameter, sowie die entsprechenden Korrelationswerte. Der x_0 -Wert steht dabei für den Partikeldurchmesser am Peakmaximum, während b die Verteilungsbreite beschreibt. Der Faktor a ist ein Anpassungsfaktor. Kleiner werdende b -Werte veranschaulichen die Erhöhung der Verteilungsschärfe, während die abnehmenden x_0 -Werte die Verkleinerung der mittleren Partikeldurchmesser in den einzelnen Zentrifugations-Fraktionen verdeutlicht. Durch die entsprechende Umformung $Q_1(x) = \int_0^x q_1(x) dx$ kann die Anzahldichteverteilung $q_1(x)$ in die anzahlgewichtete Summenverteilung $Q_1(x)$ überführt werden.

Tab. 6.11: Ergebnisse der Kurvenanpassung an die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der DLS-Messung nach der Berechnungsmethode von de Kruif (1998) und Gebhardt et al. (2011)
$$q_1(x) = \frac{a}{x} \cdot e^{\left[-0,5 \cdot \left(\frac{\ln \frac{x}{x_0}}{b}\right)^2\right]}$$

| Fraktion | a | b | x_0 | R | R ² |
|----------|---------|------|--------|------|----------------|
| MM | 2413,88 | 0,34 | 150,28 | 0,99 | 0,98 |
| I | 2978,27 | 0,36 | 198,87 | 0,99 | 0,98 |
| II | 2655,86 | 0,34 | 168,72 | 0,99 | 0,98 |
| III | 2409,44 | 0,31 | 138,29 | 0,99 | 0,97 |
| IV | 2322,00 | 0,26 | 109,79 | 0,99 | 0,99 |
| V | 1586,76 | 0,25 | 70,52 | 0,99 | 0,99 |
| VI | 1110,81 | 0,24 | 47,65 | 0,99 | 0,99 |

Da Fraktion I aufgrund der Zentrifugation neben Caseinmizellen und Mizellaggregaten auch die Hauptfracht an Mikroorganismen und somatischen Zellen enthält, wurde sie verworfen und für weitere Versuche nicht verwendet. Fraktion V und VI schieden aufgrund der niedrigen Caseingehalte bzw. der zu geringen Ausbeuten ebenfalls aus. Für die weiteren Versuche wurden daher die Fraktionen II und IV ausgewählt. Abb. 6.29 zeigt die mittlere Caseinzusammensetzung dieser Fraktionen.

**Abb. 6.29:** Mittlere Caseinzusammensetzung der Caseinmizellfraktionen II und IV

Fraktion II weist einen mittleren Partikeldurchmesser von 175,9 nm auf, während der von Fraktion IV mit 114,3 nm deutlich darunter liegt. Wie bei Marchin et al. (2007) beschrieben, sind die Gehalte der α_s -Caseine annähernd größenunabhängig, während der Gehalt an κ -Casein mit abnehmender Mizellgröße zunimmt. Auch hier scheint die Zunahme des relativen κ -Caseingehaltes innerhalb des Gesamtcaseins weitestgehend durch eine Abnahme beim β -Casein kompensiert zu werden. Trotz des erhöhten κ -Caseingehaltes unterschieden sich die Proben von Fraktion II und IV nicht signifikant hinsichtlich ihres Zetapotentials bei pH 6,8. Auch bei Titrationskurven über einen pH-Bereich von pH 2 bis pH 9 konnte kein signifikant abweichendes Verhalten im Zetapotentialverlauf der beiden Caseinfraktionen festgestellt werden.

Die Caseinsuspensionen wurden bis zu den Versuchen bei 4 °C gelagert und innerhalb von 5 Tagen aufgebraucht. Während dieser Zeit konnten keine signifikanten Veränderungen in den Größenverteilungen festgestellt werden. Erst bei einer Lagerung darüber hinaus war besonders bei Fraktion II eine deutliche Veränderung der Partikelgrößen zu verzeichnen, weshalb für die Verwendbarkeit der Suspensionen eine Frist < 5 d angesetzt wurde.

Auswirkung der reinen Druckbehandlung bei 150 und 200 MPa

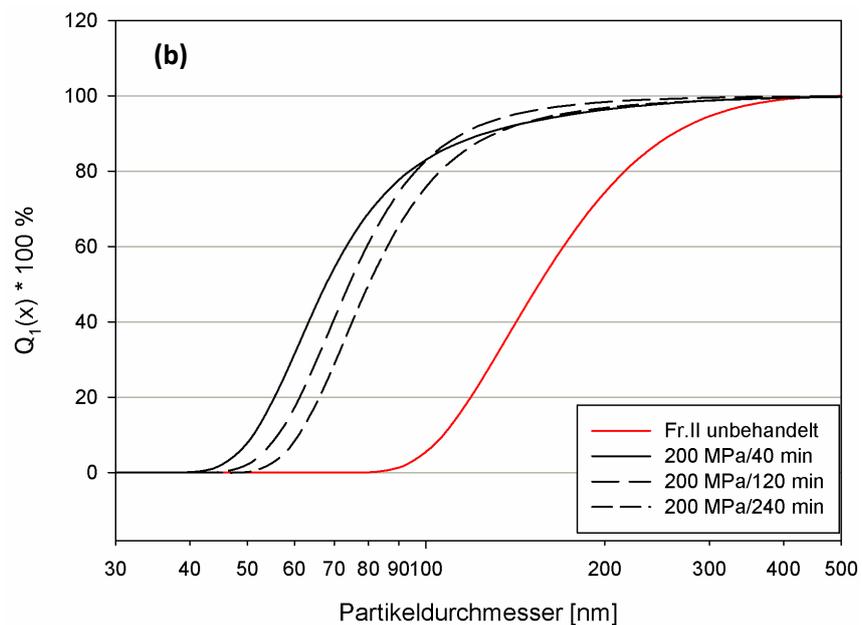
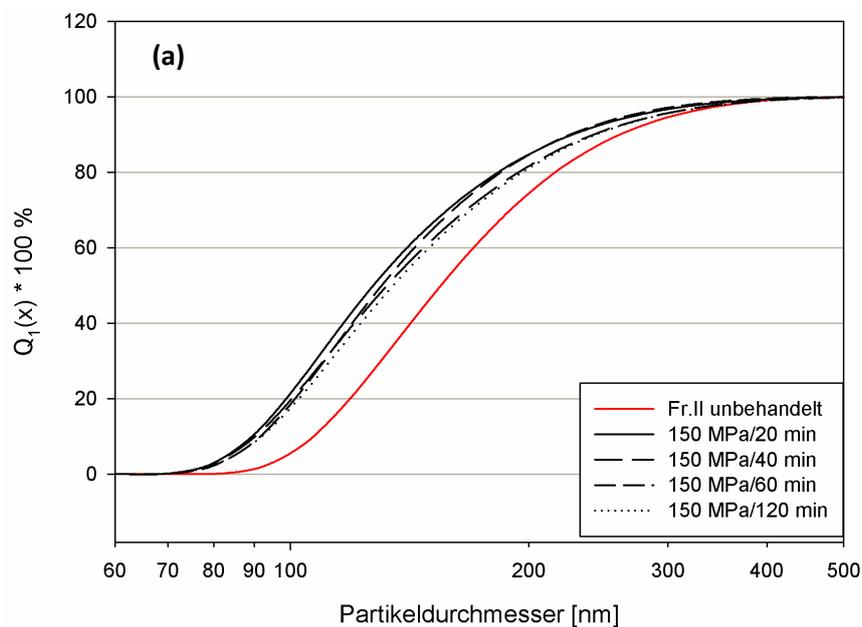
Wie bereits in Abschnitt 6.2.3 beschrieben, wurden die Versuchsparameter von der verbliebenen Enzymrestaktivität unter Druck bestimmt. Oberhalb von 200 MPa konnte keine Enzymaktivität unter Druck detektiert werden. Auch eine Temperaturerhöhung oder -absenkung reduzierte die Enzymaktivität deutlich.

Auf Basis der Untersuchungen von Gebhardt et al. (2006) und Lopez-Fandino (2006) sowie der membranbasierten Untersuchung der Zerfallsprodukte (Abschnitt 6.1) kann, entgegen der Aussagen von Huppertz et al. (2006), bereits von einem signifikanten Mizellzerfall ausgegangen werden. Gebhardt et al. (2006) beschreiben auf der Basis von in-situ Lichtstreuemessungen bei Drücken von 150 bis 200 MPa einen Casein-Assoziationsgrad von 0,3 bis 0,4 (bei intakten Mizellen beträgt der Assoziationsgrad 1). Das entspricht Zerfallspartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 20 nm und darunter. Auch bei den membranbasierten Untersuchungen wurden, wie beschrieben bei 150 MPa bereits Zerfallsprodukte detektiert, die eine keramische Membran mit einer mittleren Porengröße von 50 nm diffusiv passieren konnten.

Der Maximaldruck dieser Experimente von 200 MPa führte also einerseits zu einer deutlich zu verzeichnenden Dissoziation der Caseinmizellen, wobei andererseits das eingesetzte Enzym noch genügend Restaktivität und Substratspezifität besaß, sodass κ -Casein-Hydrolysegrade bis 80 % realisiert werden konnten. Höhere Drücke würden die Caseinmizellen zwar vollständig bis auf die Ebene der

Monomere dissoziieren, allerdings auch gleichzeitig das Chymosin denaturieren und damit inaktivieren. Nach Gl. (43) müssen für eine Variation der Hydrolysegrade Behandlungszeiten zwischen 20 und 300 min veranschlagt werden. Um Hydrolysegrade von etwa $DH = 1$ bzw. 100 % erreichen zu können, wären rein rechnerisch Prozesszeiten über 800 min (13 h) notwendig.

Abb. 6.30 (a) – (d) zeigt die Größenverteilungen der Caseinsuspensionen II und IV nach einer Hochdruckbehandlung bei 150 und 200 MPa für unterschiedliche Prozesszeiten (ohne Enzymzusatz). Die angegebenen Zeiten zwischen 20 und 240 min leiten sich aus den Druckhaltezeiten ab, die nötig waren, um die später gewünschten Hydrolysegrade zu erzielen. Wie zu erkennen, führte eine Druckbehandlung der Blindproben (ohne Chymosinzugabe) mit steigendem Prozessdruck sukzessive zu einer Partikelverkleinerung.



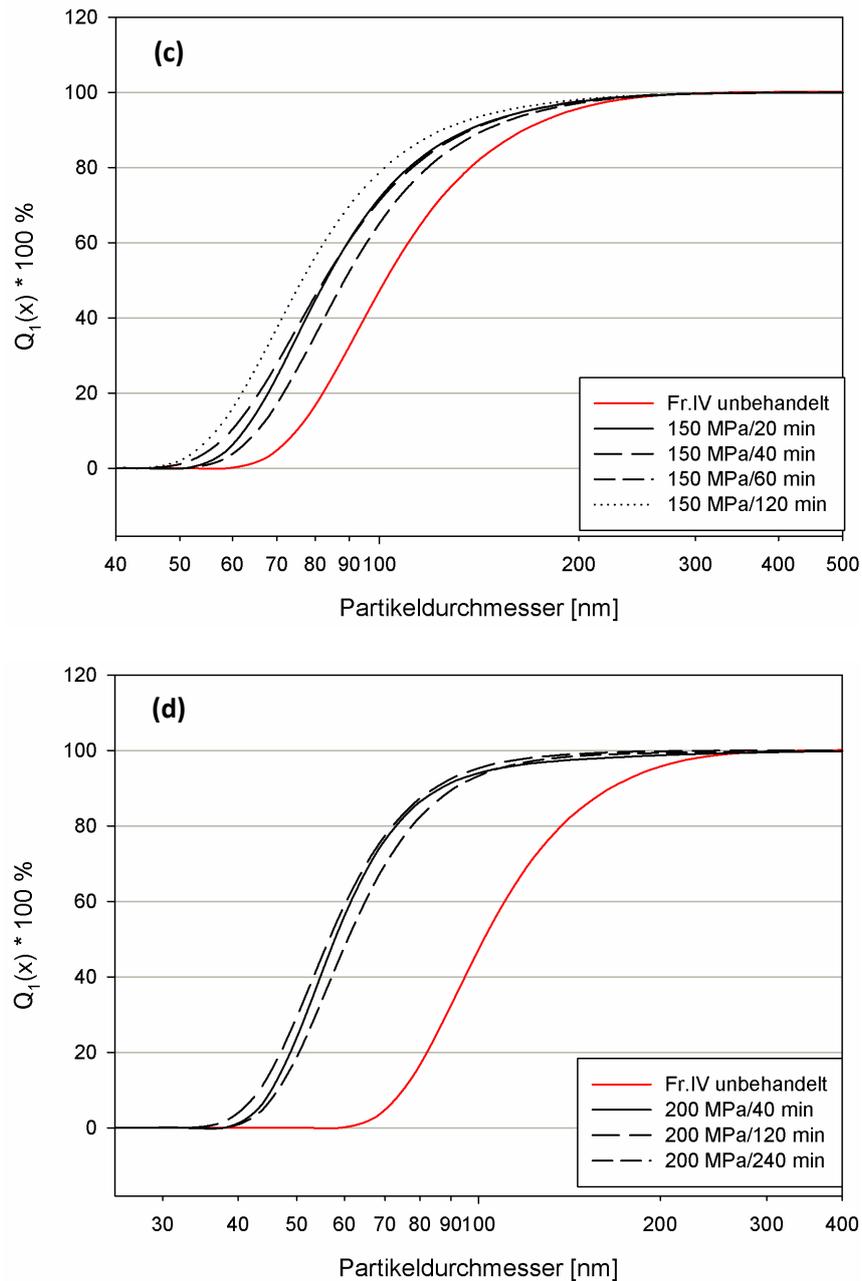


Abb. 6.30: Partikelgrößenentwicklung in den Größenfraktionen II ((a),(b)) und IV ((c),(d)) als Folge einer Hochdruckbehandlung bei 150 MPa ((a), (c)) bzw. 200 MPa ((b), (d))

Die mittleren Partikeldurchmesser nach einer Druckbehandlung sind zusätzlich in Tab. 6.12 angegeben. Deutlich ist eine Verschiebung der Verteilung hin zu kleineren Partikeldurchmessern zu erkennen. Dabei hat die Dauer der Druckwirkung keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der nach der Hochdruckbehandlung detektierten Partikeln. Die Schwankungen zwischen den Prozesszeiten bewegten sich innerhalb des 95 %igen Signifikanzniveaus.

Tab. 6.12: Anzahlgewichtete Medianwerte der Caseinfraktionen II und IV vor und nach einer Hochdruckbehandlung bei 150 bzw. 200 MPa ohne Chymosinzugabe in Abhängigkeit der Prozesszeit

| Fraktion | Druck [MPa] | Behandlungszeit [min] | D _{50,1} [nm] ± σ |
|----------|-------------|-----------------------|------------------------------|
| II | 0.1 | -- | 175,9 ± 11,9 ^c |
| IV | | | 114,3 ± 4,4 ^{b,d,e} |
| II | 150 | 20 | 137,4 ± 11,6 ^{d,f} |
| IV | | | 91,2 ± 11,1 ^{b,g,h} |
| II | 150 | 40 | 151,2 ± 7,6 ^{c,f} |
| IV | | | 97,7 ± 8,0 ^{e,g} |
| II | 150 | 120 | 153,8 ± 14,4 ^{c,f} |
| IV | | | 82,0 ± 17,5 ^{e,g,h} |
| II | 200 | 40 | 94,3 ± 10,6 ^{e,h} |
| IV | | | 63,6 ± 7,1 ^a |
| II | 200 | 120 | 89,2 ± 10,9 ^{a,b,e} |
| IV | | | 62,7 ± 6,8 ^a |
| II | 200 | 240 | 99,7 ± 11,8 ^{e,h} |
| IV | | | 66,5 ± 7,6 ^a |

^{a,b,c} Werte ohne gemeinsamem Index unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

In Fraktion II und Fraktion IV reduzierte eine Druckbehandlung bei 150 MPa für 20 bzw. 40 min die mittlere Mizellgröße auf etwa 80 % des Ausgangswertes. Längere Prozesszeiten änderten die resultierenden Partikelgrößen nach der Hochdruckbehandlung nicht signifikant. Eine Erhöhung des Druckes auf 200 MPa jedoch reduzierte die mittleren Partikeldurchmesser weiter auf etwa 50 % (Fraktion II) bzw. 65 % (Fraktion IV) des Ausgangswertes. Auch bei dieser Druckstufe konnte keine weitere signifikante Partikelgrößenänderung bei verlängerter Prozesszeit festgestellt werden.

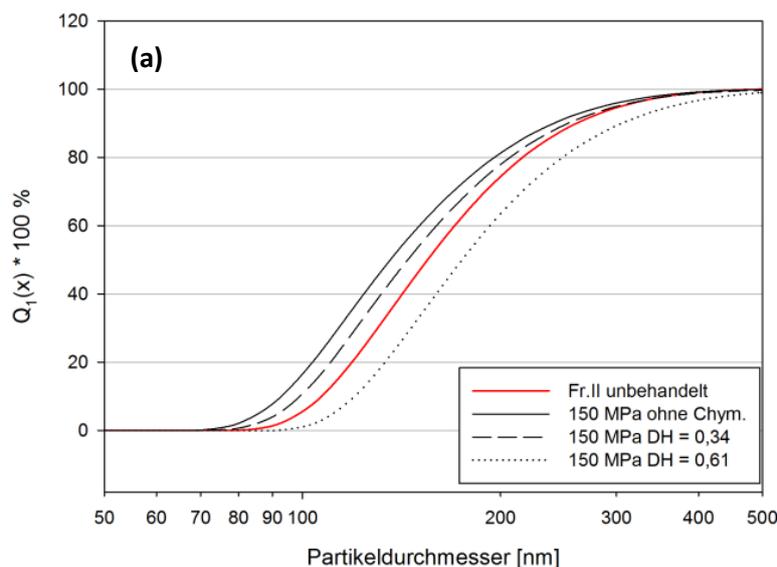
Diese Ergebnisse stimmen gut mit den in-situ- und ex-situ bestimmten Werten von Gebhardt et al., (2006), Lopez-Fandino (2006) und Gebhardt & Kulozik (2011) überein. Sie scheinen allerdings auf den ersten Blick den Ergebnissen von Huppertz et al. (2006) oder Merel-Rausch (2006) zu widersprechen. Letztere beschreiben in einem Druckbereich von 200 bis 350 MPa eine lösungsmittelabhängige, wahrscheinlich auf hydrophober Interaktion beruhende Assoziation von Caseinen bereits unter Druck. Neben anderen Einflussfaktoren ist diese Assoziation unter Druck jedoch sehr stark konzentrationsabhängig (Huppertz & de Kruif, 2006). Während eine Konzentrationserhöhung um den Faktor 1,5 bis 2 den Effekt verstärkt, führt eine Verdünnung der Caseinsuspension zu einer Abschwächung des Effektes. Bei einem Konzentrationsfaktor von 0,5 bis 0,7 ist eine Assoziation der Caseine unter

Druck nicht mehr zu verzeichnen. Darüber hinaus konnten Huppertz & de Kruif (2006) mit abnehmender Caseinmizellkonzentration eine schnellere Dissoziation verzeichnen, was die hier vorgestellten Ergebnisse hinsichtlich der Caseindissoziation bei niedrigeren Druckstufen zusätzlich untermauert. Dadurch, dass die Proben mit UF-Permeat ohne Chymosin versetzt wurden (Blindproben für die spätere Partikelbeurteilung), ergibt sich für die hier beschriebenen Experimente ein Konzentrationsfaktor von rund 0,7 ($c_{\text{Casein}} = 2 \text{ g/L}$). Das würde die unverändert reduzierten Partikeldurchmesser nach der Hochdruckbehandlung erklären und eine lösungsmittelbedingte Assoziation der Caseine während der langen Prozesszeiten kann daher ausgeschlossen werden.

Auswirkung der kombinierten Enzym- und Druckbehandlung bei 150 und 200 MPa

Durch die Zugabe von Chymosin und die anschließende enzymatische Reaktion unter Druck wurde der Gehalt an intaktem κ -Casein in den dissoziierenden oder teilweise dissoziierten Casein-Mizellen reduziert. Somit konnten, abhängig von der Druckhöhe und der Inkubationszeit unter Druck, Hydrolysegrade zwischen 30 und etwa 80 % realisiert werden. Im Gegensatz zur reinen Hochdruckbehandlung bei 150 bzw. 200 MPa (siehe Abb. 6.29) führte eine enzymatische Behandlung in diesem Druckbereich bei der anschließenden Entspannung zu einer zunehmenden Partikelvergrößerung mit steigendem Hydrolysegrad des κ -Casein.

Abb 6.31 zeigt exemplarisch die resultierenden Partikelgrößenverteilungen in den Mizellgrößenfraktionen II ((a),(b)) und IV ((c),(d)) nach einer Hochdruckinkubation mit Chymosin bei 150 und 200 MPa im Vergleich zu einer reinen Hochdruckbehandlung. Dabei wurden Hydrolysegrade zwischen 0,33 und 0,68 realisiert.



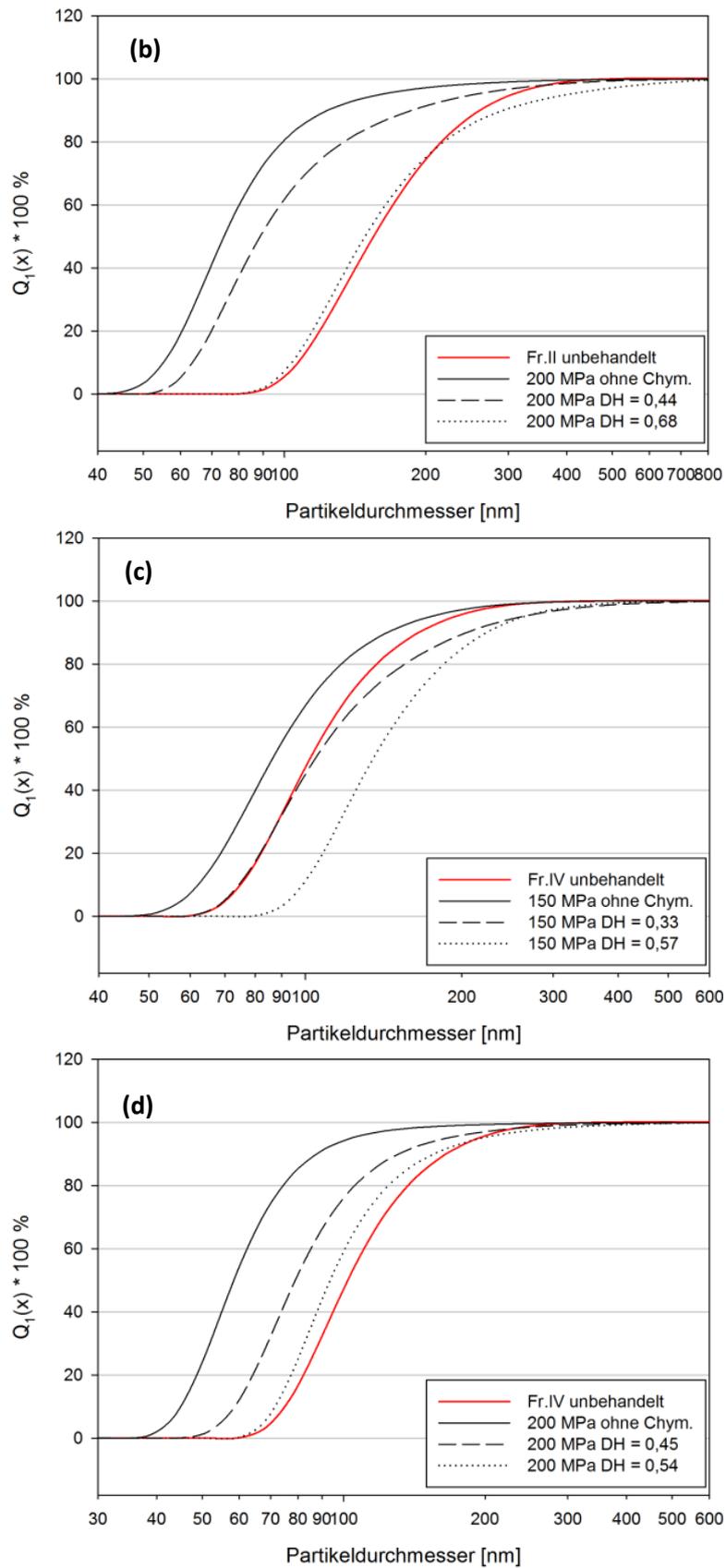


Abb. 6.31: Partikelgrößenentwicklung in den Größenfraktionen II ((a),(b)) und IV ((c),(d)) als Folge einer Hochdruckbehandlung bei 150 (links) bzw. 200 MPa (rechts) bei variierender κ -Casein-Hydrolyse unter unter Druck

In allen Proben sind mit steigendem Hydrolysegrad größer werdende Partikel nach der Hochdruckbehandlung zu detektieren. Auch nahm die Verteilungsbreite mit steigendem Hydrolysegrad zu. Eine Überprüfung der Verteilungsform ergab dennoch auch nach der kombinierten Enzym- und Hochdruckbehandlung noch Log-normalverteilte Partikelgrößen ($R^2 > 0,95$). An dieser Stelle muss zusätzlich erwähnt werden, dass die resultierenden Partikelgrößen in den bei 150 MPa behandelten Proben mit Hydrolysegraden von etwa 0,5 bis 0,6 oberhalb der Werte der nativen Proben lagen, während die bei 200 MPa inkubierten Proben bei vergleichbaren Hydrolysegraden die Partikelgrößen der nativen Proben kaum überschritten. Das könnte an der vollständigeren Dissoziation der Casein-Mizellen bei 200 MPa liegen. Das in diesem Druckbereich stärker solubilisierte mizellare Calciumphosphat könnte für diesen Effekt ausschlaggebend sein.

Bei Hydrolysegraden oberhalb von 0,8 konnten die Proben aufgrund von Flokkulation nicht mehr mit dynamischer Lichtstreuung vermessen werden. Abb. 6.32 zeigt die Casein-Ausgangslösungen der Fraktionen II und IV sowie die zugehörigen druckbehandelten Proben bei 200 MPa mit einem Hydrolysegrad unterhalb und oberhalb von 0,8. Deutlich ist die Flokkulation zu erkennen, weshalb in diesen Proben nicht mehr von mizellähnlichen, stabilen Proben ausgegangen werden kann. Bei niedrigeren Hydrolysegraden war selbst bei längerer Lagerung keine Flokkulation zu verzeichnen.

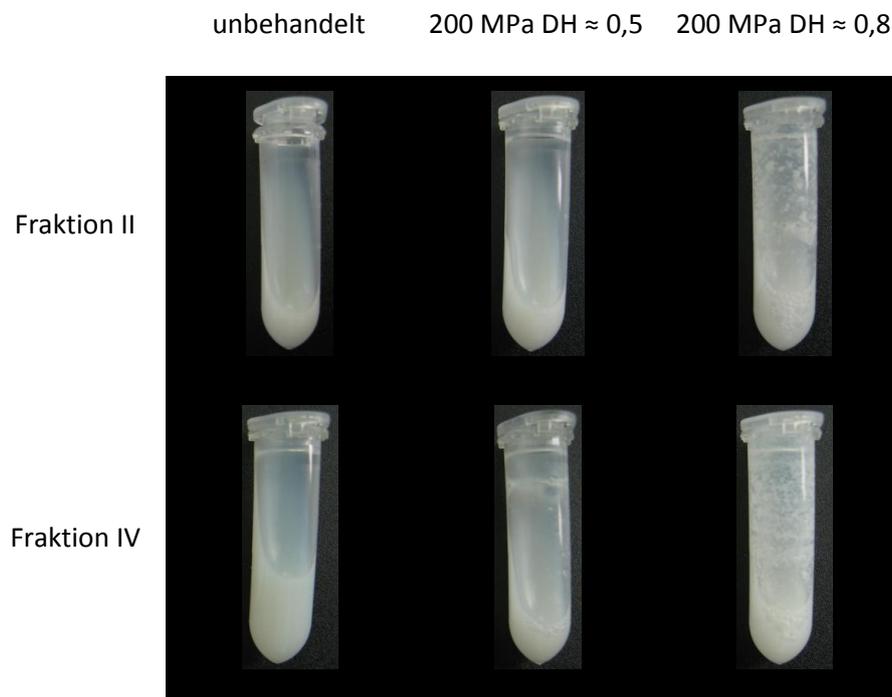


Abb. 6.32: Probenvergleich der Ausgangslösung mit Proben nach der Druckhydrolyse bei 200 MPa mit DH \approx 0,5 bzw. DH \approx 0,8

Somit kann festgehalten werden, dass eine hydrolytische Spaltung von κ -Casein unter Druck (bis 200 MPa), also in dem Bereich, in dem die Mizelle in kleinere Untereinheiten zerfallen ist, bei der

Entspannung größere Reassoziante erzeugt. Offenbar besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Hydrolysegrad und resultierender Partikelgröße. Damit wurde gezeigt, dass auch bei der Reassoziaton nach einer Hochdruckbehandlung das κ -Casein hinsichtlich der Mizellstabilisierung aber auch im Zusammenhang mit der Größenlimitation bei der Caseinpolymerisierung von zentraler Bedeutung ist.

Bei der Probenvorbereitung für die Partikelgrößenbestimmung werden die Suspensionen zur Inaktivierung des Chymosins mit ethanolischer Pepstatin-Lösung versetzt. Dieses mikrobielle Pentapeptid hemmt Aspartatproteasen selektiv durch Komplexbildung, ohne dass die Lösung erhitzt oder angesäuert werden muss. Dabei weist die Caseinsuspension nach der Zugabe der Lösung einen Ethanolgehalt von etwa 10 % (v/v) auf. In diesem Konzentrationsbereich hat Ethanol keinen signifikanten Effekt auf die Stabilität von Casein-Mizellen (Fox, 2006a). Minimale Effekte auf die mizellare Struktur können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um den reinen Effekt der kombinierten Hochdruck- und Enzymbehandlung unabhängig von der Probenvor- und Aufbereitung zu erfassen, wurde ein relativer Partikeldurchmesser PD_{rel} (Gl. (51)) definiert, der die kombiniert enzym- und hochdruckbehandelte Probe ($D_{50,1\text{ HP+Hydrolysis}}$) in Relation zur rein hochdruckbehandelten Probe ($D_{50,1\text{ HP}}$) setzt. Dabei wurde die Blindprobe ohne Enzym nach der Hochdruckbehandlung ebenfalls mit Ethanol versetzt.

$$PD_{rel} = \frac{D_{50,1\text{HP+Hydr.}}}{D_{50,1\text{HP}}} \quad (51)$$

In Abb. 6.32 sind die Verläufe der relativen Partikeldurchmesser in Abhängigkeit des Hydrolysegrades für alle Proben dargestellt. Für Hydrolysegrade zwischen 0,35 und 0,75 ist bei beiden Caseinmizellfraktionen eine Zunahme des PD_{rel} zu verzeichnen.

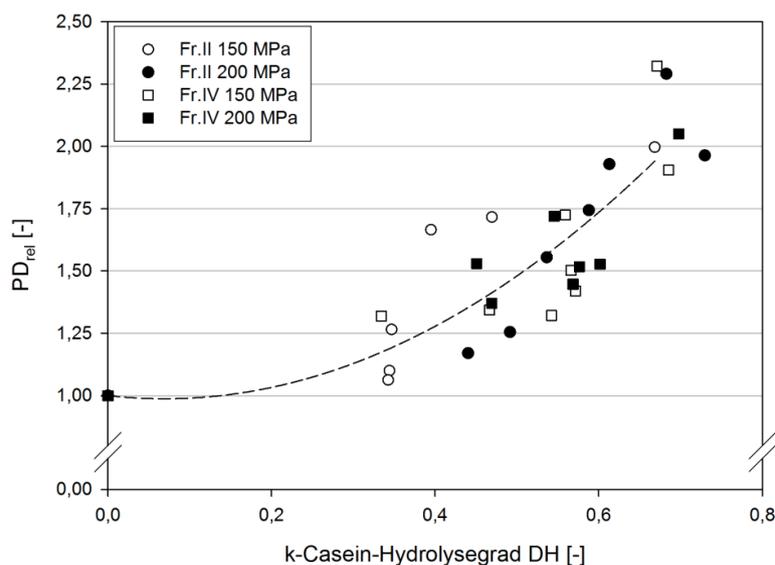


Abb. 6.33: Entwicklung von PD_{rel} als Funktion des Hydrolysegrades in den Größenfraktionen II und IV bei kombinierter Enzym-Hochdruckbehandlung bei 150 bzw. 200 MPa

Dabei kann nicht unterschieden werden, auf welchem Drucklevel die Proben mit Chymosin inkubiert wurden. Auch können in dieser Darstellung die Proben von Fraktion II und IV in ihrem Reassoziationsverhalten nach enzymatischer Hochdruckhydrolyse nicht mehr differenziert werden. DH-Werte bis 0,35 waren aufgrund des Versuchsaufbaus und den entsprechenden Vorlaufzeiten von 6.71 ± 0.71 min nicht möglich. Die Proben wurden dosiert, verpackt, vakuumiert und in die Autoklavenkammer eingebracht. Anschließend wurde die Anlage versiegelt und entlüftet, bevor der Druck aufgebaut wurde. Obwohl die Enzymlösung vor der Zugabe der Caseinsuspensionen eingefroren war, ließen sich Vorhydrolysegrade von 0,3 bis zum Druckaufbau nicht vermeiden.

Es stellt sich nun die Frage, ob die beobachtete Veränderung im relativen Partikeldurchmesser auf ein längeres Partikelwachstum bei der Entspannung zurückzuführen ist. Andererseits könnte es sich um eine beginnende Mizellaggregation ähnlich der Sekundärphase der Labgelbildung handeln, in der die Para-k-Casein-Mizellen aggregieren und langsam ein kohärentes Netzwerk ausbilden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die gleichen Versuche bei Atmosphärendruck durchgeführt und die resultierenden Partikelgrößen beobachtet. Entsprechend ergibt sich bei den drucklosen Experimenten PD_{rel} zu:

$$PD_{rel} = \frac{D_{50,1Hydr.}}{D_{50,1nativ}} \quad (52)$$

In Abb. 6.34 sind die relativen Partikeldurchmesser in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad am κ -Casein aufgetragen. Zum einen wurden die Proben unter Druck (150 und 200 MPa) inkubiert, zum anderen wurde im gleichen Versuchsaufbau eine Inkubation mit Chymosin bei Atmosphärendruck (0,1 MPa) durchgeführt.

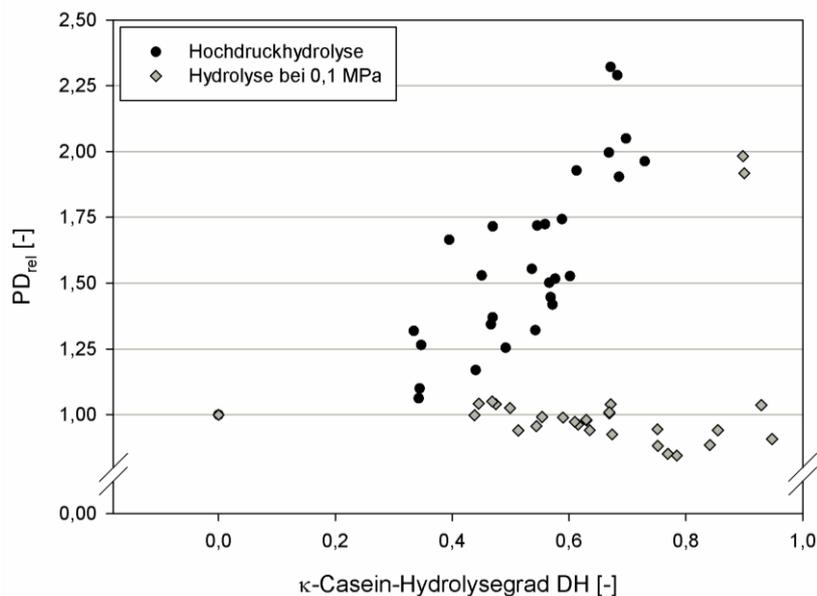


Abb. 6.34: PD_{rel} als Funktion des Hydrolysegrades bei der Hochdruckhydrolyse von κ -Casein im Vergleich zur Casein-Inkubation bei 0,1 MPa

Im Falle der Inkubation bei Atmosphärendruck wurde keine Zunahme des PD_{rel} bis zu einem Hydrolysegrad von ca. 0,8 festgestellt. Im Gegenteil, tendenziell scheint sich die Partikelgröße hier in Folge der Labwirkung zunächst zu verkleinern, bevor dann ein sprunghaftes Ansteigen zu verzeichnen ist. Dies stimmt sehr gut mit den Beobachtungen von Walstra et al. (1984), de Kruif (1998) und Dalgleish (2011) überein. Die Dicke der haarigen CMP-Schicht an der Mizelloberfläche wird übereinstimmend mit etwa 7 bis 12 nm beschrieben. Die Abnahme des PD_{rel} kann demnach einer zunehmenden Abspaltung dieser CMP-Schicht durch Chymosin zugeordnet werden. Auch der Grenz-DH für die Aggregation von Caseinmizellen wird übereinstimmend mit etwa 80 % beschrieben, was sich ebenfalls in den hier beschriebenen Messwerten widerspiegelt. Ab diesem Hydrolysegrad waren die Proben wegen der teilweise einsetzenden Flokkulation nicht mehr mittels DLS auszuwerten. Dabei konnte kein Unterschied zu den druckinkubierten Proben verzeichnet werden. Beim Verlauf des PD_{rel} zwischen Hydrolysegraden von 0,3 und 0,75 ist jedoch ein deutlicher Unterschied in den druckinkubierten Proben zu verzeichnen. Hier ist ein kontinuierlicher Anstieg im PD_{rel} mit steigendem DH zu verzeichnen.

Eine mögliche Erklärung kann im Dual-Binding Modell von Horne (Horne, 1998, Horne, 2008) bzw. auch in den Modellvorstellungen von Dalgleish (2011) gefunden werden. Dieses grundlegende Modell zur Selbstassoziation diente als Basis für die vorgestellten Experimente zur kombinierten Hochdruck- und Enzymbehandlung bei bis zu 200 MPa. Während Horne (2008) gewisse Zweifel über die Tauglichkeit seines Modell für die druckbedingte Dissoziation und Reassoziation hegt, scheint es für die Erklärung der größer werdenden mizellaren Partikel nach einer enzymtischen Hydrolyse von κ -Casein bei 150 bzw. 200 MPa geeignet zu sein.

Nachdem die Suspensionen durch die Enzymzugabe um den Faktor 0,7 verdünnt wurden und das Drucklevel unterhalb von 250 MPa lag, kann die von Huppertz et al. (2006) und Merel-Rausch (2006) beschriebene, Lösungsmittel-Induzierte Aggregation unter Druck quasi ausgeschlossen werden. Darüber hinaus werden Lösungsmittelleffekte durch die Definition des PD_{rel} ausgeglichen. Durch die Definition des PD_{rel} wird deutlich, dass die mittlere Partikelgröße nach kombinierter Enzym- und Hochdruckbehandlung stark von der Hydrolyse des κ -Caseins im Sinne einer gezielten funktionellen Modifikation abhängt.

Schlussfolgerungen aus der Untersuchungen zur partiellen κ -Caseinhydrolyse und deren Auswirkung auf das Reassoziationsverhalten von Caseinmizellen

Wie in Abschnitt 2 und 3 beschrieben und dargestellt, weist κ -Casein einen amphoteren Charakter in seiner Molekülstruktur auf. Es besitzt sowohl eine stark hydrophobe Moleküldomäne als auch einen polaren, stark geladenen Molekülteil. Aufgrund der AS-Sequenz kann es mit diesem Molekülteil nicht an Calciumphosphatcluster anbinden. Somit kann die Ladung nicht kompensiert werden. Außerdem können so auch keine Ca-Brücken ausgebildet werden. Darüber hinaus ist das hydrophile CMP zum Teil stark glycosyliert, was hier die negative Ladung sogar noch verstärkt (die O-glycosidischen Bindestellen beispielsweise für die Sialinsäure sitzen wie in Abschnitt 2.4.2 dargestellt ausschließlich auf diesem Molekülteil). So wird diesem Casein auch die wachstumslimitierende Rolle bei Polymerisierung der Caseine zur Mizelle zugeschrieben.

Der polare und stark geladene Teil des κ -Casein, das CMP, lässt sich durch den Einsatz von Chymosin gezielt abspalten. Die interne Mizellstruktur wird dabei aber nicht verändert. Die Veränderung der Caseinmizellen erfolgt an der Oberfläche. Wie Abb. 6.35 dargestellt, reduziert sich so der hydrodynamische Durchmesser der Caseinmizelle und sie verliert ihre kolloidale Stabilität. Ab einem Hydrolysegrad von etwa 0,8 aggregieren die so modifizierten para- κ -Caseinmizellen. Dabei können aus den para- κ -Caseinmizellen anschließend abhängig von der Casein-Mizellkonzentration größere Aggregate oder kohärente Netzwerkstrukturen entstehen.

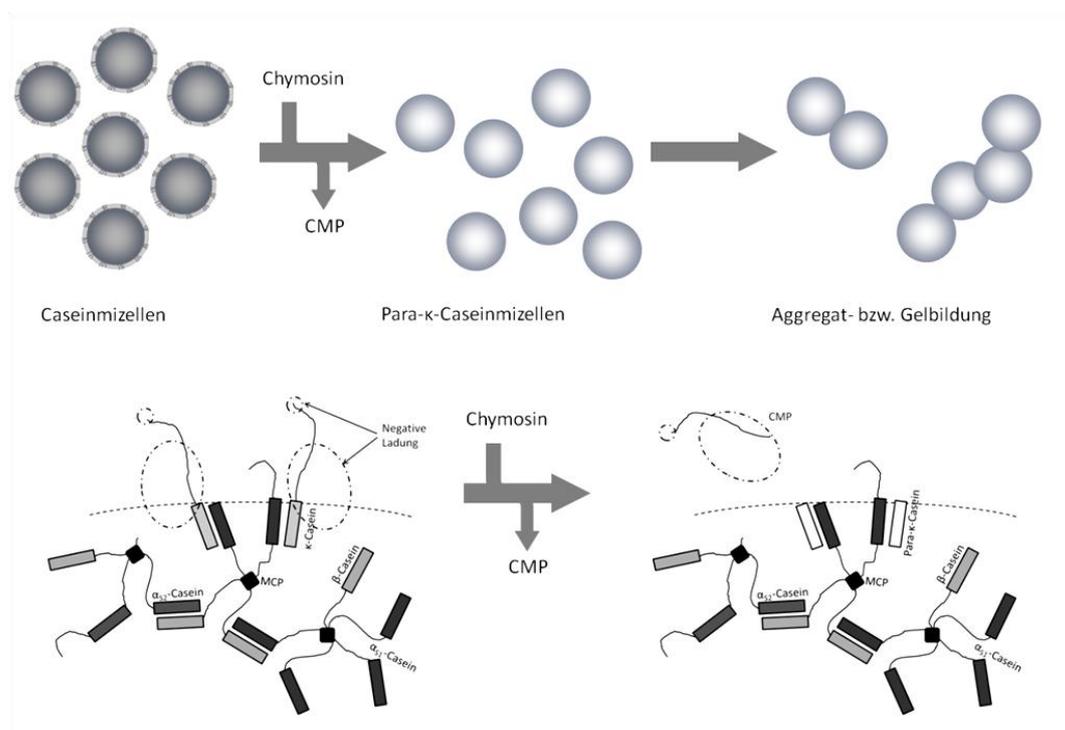


Abb. 6.36: Verhalten der Caseinmizellsuspension bei der Inkubation mit Chymosin bei 0,1 MPa

Durch die Beaufschlagung mit hydrostatischen Drücken bis zu 200 MPa werden die Caseinmizellen durch die zunehmende Ca-Solubilisation partiell dissoziiert (Hubbard et al., 2002; Huppertz & de Kruif, 2007a). Außerdem werden hydrophobe Wechselwirkungen ebenfalls geschwächt (Boonyaratanakornkit et al., 2002) was zu einer weiteren Auflockerung und Dissoziation der mizellaren Struktur führt. Die Ca-Solubilisierung ist aber in diesem Druckbereich noch nicht vollständig abgeschlossen, sodass genügend Polymerisationskeime für Caseinreassoziaton zu mizellaren Partikeln nach der Entspannung auf Atmosphärendruck vorhanden sind (Needs et al., 2000; Huppertz & de Kruif, 2007a; Gebhardt et al., 2011). Durch die Wirkung von Chymosin unter Druck wird das CMP abgespalten. Das führt, wie in Abb. 6.36 schematisch dargestellt zum Auflösen der mizellaren Struktur durch den Druck und gleichzeitig zu einem Ablösen der abschirmenden und wachstumslimitierenden negativen Ladungswolke am CMP. Während und nach der Entspannung auf Atmosphärendruck, wenn Salzbrücken ausgebildet und hydrophobe Molekülkontakte neu geknüpft werden, kann das verbleibende para- κ -Casein über hydrophobe Wechselwirkungen in den wachsenden Molekülverband der Caseinmizelle inkorporiert werden, ohne einen Abbruch der Polymerisierungsreaktion hervorzurufen.

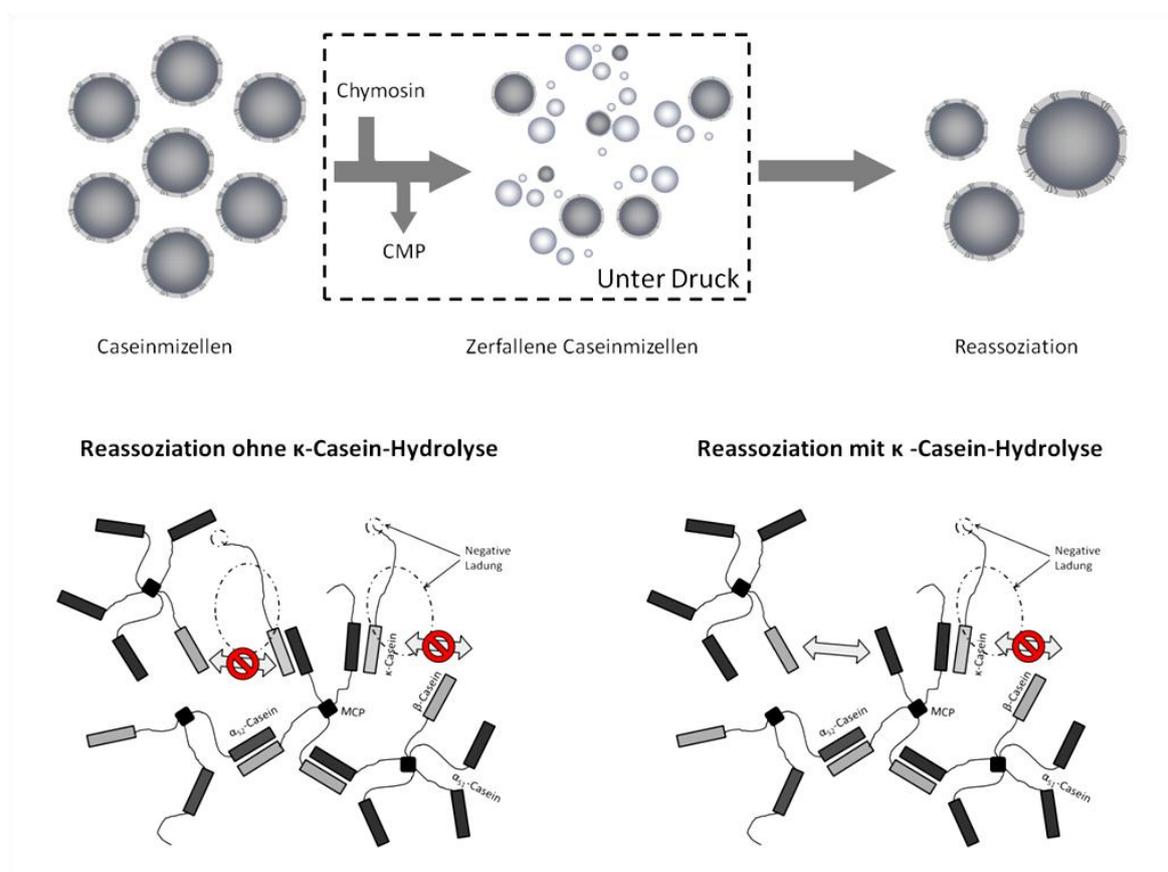


Abb. 6.37: Verhalten der Caseinmizellsuspension mit der Entspannung nach der Hochdruckbehandlung mit und ohne partieller κ -Casein-Hydrolyse

Erst wenn ein noch intaktes κ -Caseinmolekül - als Monomer oder in einem Molekülverband aus dem Mizellzerfall - an die wachsende Proteinkette andockt, wird das Wachstum des Partikels gemäß den Vorgaben des Dual-Binding-Modells abgebrochen. So lässt sich die Zunahme des relativen Partikeldurchmessers mit steigendem Hydrolysegrad nach der kombinierten Hochdruck- und Enzymbehandlung erklären. Die Partikel werden solange größer, bis das verbleibende, intakte κ -Casein die Oberfläche besetzt und stabilisiert. Ist der Hydrolysegrad zu hoch ($DH > 0,7 - 0,8$), können sich keine isolierten und stabilen Partikel mehr ausbilden. Vielmehr polymerisieren die Caseine ständig weiter, bis die in Abb. 6.32 dargestellte Flocken zu erkennen sind. Wäre die Proteinlösung höher konzentriert, entstünde so ein homogenes Gelnetzwerk, das die gesamte Probe durchzieht.

Durch die enzymatische κ -Caseinhydrolyse mit Chymosin unter Druck konnte ein verändertes Reassoziationsverhalten von Caseinmizellen bei der Entspannung aufgezeigt werden. Durch die enzymatische Spaltung nehmen die resultierenden Partikelgrößen mit steigendem Hydrolysegrad zu: der relative Partikeldurchmesser in den Proben stieg von etwa 1,1 bei einem DH von 0,3 auf etwa 2,0 bei einem DH von 0,75, unabhängig von der Druckhöhe oder der untersuchten Caseinmizellgröße. Dieses Verhalten kann anhand des im Dual-Binding-Modells vorgestellten Mechanismus der Casein-Polymerisation erklärt werden, die sich deutlich von der Partikelgrößenentwicklung bei mizellarer Aggregation bei alleiniger Chymosinbehandlung unterscheidet. Durch die kombinierte Chymosin- und Hochdruckbehandlung konnte also die Rolle des κ -Caseins als Kettenterminator bei der Polymerisation der Caseine zur Mizelle und damit als größenlimitierender Faktor auch von technologischer Seite herausgestellt werden.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse können hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Vorstellungen zur inneren mizellaren Struktur folgendermaßen bewertet werden: die α_s -Caseine stellen wegen ihrer Bifunktionalität bei der Vernetzung mit anderen Caseinen das stabilisierende Rückgrat oder Gerüst der Caseinmizelle dar. Sie können aufgrund Ihrer Molekülstruktur wie von Horne (1998) beschrieben sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen als auch über CaP-Brücken verlinkt sein. In dieses Geflecht aus α_s -Caseinen sind dann die β - und κ -Caseine weitestgehend über hydrophobe Wechselwirkungen lockerer und eingebunden. Als größenlimitierender Faktor bei der Mizellbildung fungiert dabei das κ -Casein, wobei dafür das stark geladene, hydrophile CMP von zentraler Bedeutung ist. Mit der Entfernung dieses Molekülteils verliert das κ -Casein seine Funktion als Schutzkolloid und das Partikelwachstum, wie im Dual-Binding-Modell beschrieben, schreitet fort. Aus den Versuchen zur κ -Casein-Hydrolyse unter Druck kann darüber hinaus postuliert werden, dass κ -Casein eigentlich ausschließlich an der Mizelloberfläche lokalisiert ist. Es konnten in einer Caseinsuspension sowohl unter Druck als auch nach der Hochdruckbehandlung keine signifikant höheren Hydrolysegrade erzielt werden als bei einer unbehandelten, nativen Caseinsuspension.

Für die Druckdissoziation kann festgehalten werden, dass bereits bei relativ moderaten Drücken von 150 MPa ein signifikanter Mizellzerfall detektiert werden konnte. Die dabei entstehenden primären Zerfallspartikel bestehen weitestgehend aus α_s -Caseinen, die über CaP-Brücken noch relativ stabil miteinander verknüpft sind und geringere Anteile an hydrophob eingebundenen β - und κ -Caseinen enthalten. Mit zunehmendem Druck und damit zunehmender Ca-Solubilisierung lösen sich die primären Partikel weiter auf, bis ab 400 bis 450 MPa alle Caseinfraktionen nur noch als Monomere in der Lösung vorliegen. Die geringere Temperaturempfindlichkeit der α_s -Caseine bei der Mizelldissoziation unter Druck bestätigt deren intensivere Verknüpfung über CaP. Zusammen mit dem hohen α_s -Casein-Anteil in den primären Zerfallspartikeln kann so deren Rolle als stabilisierendes Rückgrat der Caseinmizelle weiter gestützt werden. Die β - und κ -Caseinfraktionen zeigen eine wesentlich stärkere Temperaturabhängigkeit bei der Mizelldissoziation, was für eine hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Einbindung schließen lässt.

Die vorgestellten Methoden der Kombination der Hochdruckbehandlung mit entsprechenden anderen Techniken wie der enzymatischen Modifikation oder dem Einbau einer keramischen Diffusionsbarriere (Membran) erwiesen sich als wirkungsvolle Tools zur Beleuchtung des mizellaren Verhaltens. So waren indirekt auch Rückschlüsse auf die mizellare Struktur möglich, was das Bild dieser sehr komplexen Proteinpartikel weiter abrundet.

In der nächsten Stufe wäre es denkbar, die membranbasierte Untersuchung des Mizellzerfalls mit in-situ-Messtechniken, wie Lichtreuung oder IR- bzw. Fluoreszenzspektroskopie zu kombinieren. Dazu muss die Halterung der Membranen allerdings so modifiziert werden, dass das Dialysatvolumen eine optische Zugänglichkeit besitzt. So könnten die durch die Membran diffundierenden Mizellfragmente hinsichtlich ihrer Größe erfasst werden. Gleichzeitig ist darüber hinaus die spektroskopische Untersuchung des durchgetretenen Materials möglich, was eine Separation des spektroskopischen Signals von noch intakten oder größeren Mizellfragmenten erlaubt. Abb. 7 soll abschließend eine mögliche Konfiguration des Membranmoduls zeigen, die eine Kombination des Membransetups zur Untersuchung des druckbedingten Mizellzerfalls mit optischen und spektroskopischen in-situ-Messtechniken erlauben könnte.

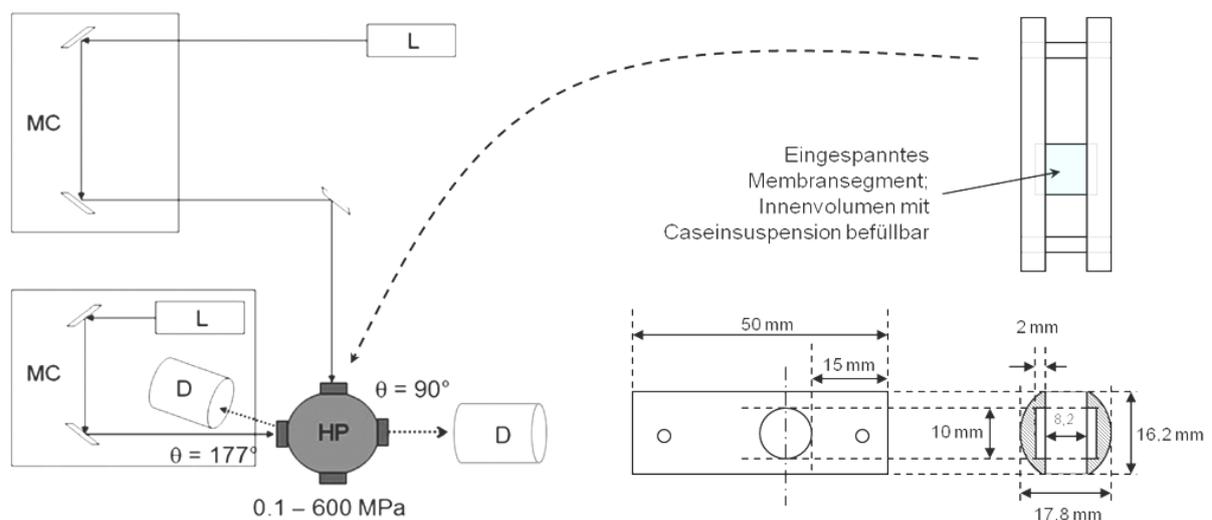


Abb. 7: Modifizierter Membransetup zur Kombination mit optischen in-situ-Messtechniken (links im Bild: exemplarische Darstellung der Lichtstreuapparatur von Gebhardt & Kulozik (2011))

8 Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Casein stellt mit einem Anteil von rund 80 % die Hauptfraktion des in Kuhmilch vorkommenden Proteins dar. Dabei ist Casein kein einzelnes Protein, sondern es steht vielmehr für eine Gruppe von vier Phosphoproteinen, die über nicht kovalente Wechselwirkungen meist größere Proteinaggregate, die Caseinmizellen bilden. Diese Caseinmizellen sind in der Lage, große Menge an Calcium stabil in Lösung zu halten. Aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung bei der Herstellung zahlreicher Milchprodukte, aber eben auch wegen der besonderen Eigenschaften und Fähigkeiten der Caseinmizellen als Nähr- und Mineralstoffträger sind die Funktion und das Verhalten von Caseinen, insbesondere das der Caseinmizellen, seit langem Gegenstand der Forschung. Trotz intensiver Untersuchungen mit den unterschiedlichsten Methoden herrscht noch keine vollständige Klarheit über die genaue innere Mizellstruktur und die Vorgänge bei der Mizellbildung. Es existieren bis dato „nur“ unterschiedliche Modelle zur Mizellstruktur, die mehr oder weniger gut die Eigenschaften dieser Proteinkomplexe und deren Reaktion auf Milieuveränderungen erklären und vorhersagen können.

Die Beaufschlagung von Caseinmizellen mit hohem hydrostatischen Druck stellt eine vielsprechende Möglichkeit dar, tieferen Einblick in die Mizellstruktur zu gewinnen, da durch den Druck die nicht-kovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Mizelle aufgebrochen werden. Das Verhalten der Caseinmizellen bei einer Druckbehandlung – bestehend aus Kompression, Haltephase und Dekompression – kann demnach Rückschlüsse auf die stabilisierenden Interaktionen und deren Intensität ermöglichen, wenn es gelingt die Zerfallsprodukte qualitativ zu erfassen. Ferner haben zahlreiche Untersuchungen anderer Wissenschaftler gezeigt, dass die Mizelldissoziation unterhalb von 280 bis 300 MPa reversibel erfolgt und die Mizellbildung so ausgehend vom originären System mit technischen Mitteln nachgestellt werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, den druckbedingten Mizellzerfall genauer zu beschreiben und die bei unterschiedlichen Druckstufen entstehenden Zerfallspartikel für eine ex-situ Analytik qualitativ zugänglich zu machen. Dabei kamen Membranen zum Einsatz, die eine diffusive Trennung von intakten und zerfallenen Caseinmizellen unter Druck ermöglichten.

Wider Erwarten erwiesen sich flexible Polymermembranen aufgrund ihrer druckbedingten Verdichtung als gänzlich ungeeignet für die angestrebten Untersuchungen. Besser geeignet waren keramische Einkanalmembranen, die aber mit sinkender nomineller Trenngrenze immer druckempfindlicher wurden.

Diese Membranen waren für intakte Mizellen nicht durchlässig. Erst die unter Druck gebildeten Fragmente waren in der Lage, diese Diffusionsbarriere zu passieren, wobei kleinere Fragmente oder Casein-Monomere die Membran schneller passieren können als größere Aggregate. Eine Konzentrationsabnahme der Caseine im Inneren der Membranröhrchen ist also direkt auf einen Mizellzerfall zurückzuführen. Bereits bei relativ moderaten Drücken von 150 MPa war ein signifikanter Mizellzerfall zu detektieren. Die dabei entstehenden primären Zerfallspartikel bestehen weitestgehend aus α_5 -Caseinen, die über CaP-Brücken noch relativ stabil miteinander verknüpft sind und geringere Anteile an hydrophob eingebundenen β - und κ -Caseinen enthalten. Mit zunehmendem Druck und damit zunehmender Ca-Solubilisierung lösen sich diese primären Partikel weiter auf, bis ab 400 bis 450 MPa alle Caseinfraktionen nur noch als Monomere in der Lösung vorliegen. Das spricht für eine Funktion der α_5 -Caseine als stabilisierendes Rückgrat der Caseinmizelle in das β - und κ -Casein eher über hydrophobe Wechselwirkungen eingeflochten sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Vorgänge bei der Mizellreassoziaton nach der Hochdruckbehandlung näher beleuchtet werden. Vor allem die Rolle des κ -Caseins als Schutzkolloid und größenlimitierender Faktor bei der Mizell(rück)bildung sollte messbar gemacht und so verdeutlicht werden. Auch in diesem Fall wurde die Hochdruckbehandlung nicht isoliert angewendet, sondern mit einer enzymatischen Modifikation des Zielproteins unter Druck kombiniert. Wegen seiner hohen Spezifität kam rekombinantes Chymosin (EC 3.4.23.4) zum Einsatz, das κ -Casein genau an der Grenze zwischen dem hydrophoben und dem hydrophilen Moleülteil in para- κ -Casein (AS¹-AS¹⁰⁵) und CMP (AS¹⁰⁶ bis AS¹⁶⁹) spaltet.

Im Vorfeld der Versuche musste jedoch zunächst das Enzym eingehend auf seine Druckempfindlichkeit und auf seine Einsatzfähigkeit unter Druck untersucht werden. Ferner galt es, die Enzymkinetik und Substratspezifität des Enzyms unter Druck zu kennen, um genaue und verlässliche Aussagen aus den Ergebnissen zu ziehen. Durch die enzymatische κ -Caseinhydrolyse mit Chymosin unter Druck konnte ein verändertes Reassoziationsverhalten von Caseinmizellen bei der Entspannung aufgezeigt werden. Durch die enzymatische Spaltung nehmen die resultierenden Partikelgrößen mit steigendem Hydrolysegrad zu: der relative Partikeldurchmesser in den Proben stieg von etwa 1,1 bei einem DH von 0,3 auf etwa 2,0 bei einem DH von 0,75, unabhängig von der Druckhöhe oder der untersuchten Caseinmizellgröße. Dieses Verhalten konnte anhand des im Dual-Binding-Modell vorgestellten Mechanismus der Casein-Polymerisation erklärt werden, die sich deutlich von der Partikelgrößenentwicklung bei mizellarer Aggregation bei alleiniger Chymosinbehandlung unterscheidet. Ferner wurde bestätigt, dass κ -Caseine ausschließlich an der Mizelloberfläche lokalisiert sind. Es konnten in einer Caseinsuspension sowohl unter Druck als auch nach der Hochdruckbehandlung keine signifikant höheren Hydrolysegrade erzielt werden als bei einer unbehandelten, nativen Caseinsuspension.

Summary

Making up to 80 % (w/w) of the total protein content, casein represents the main protein component in cows' milk. Casein is not a single protein but represents a group of four phosphoproteins. These proteins form colloidal protein particles (casein micelles) via non-covalent linkages like hydrophobic interactions or salt bridges. Casein micelles are able to keep large amounts of calcium in a stable solution. Due to their economic relevance in numerous processes during the manufacture of dairy products, in addition to their unique properties as a carrier system for minerals and nutrients, casein micelles have been extensively studied in the past. However, no explicit data exists concerning the inner micellar structure. The numerous existing models are more or less well-suited to describe and predict the inner or outer micellar properties. Therefore these models need to be constantly reviewed, refined and deepened.

Due to the dissociating effect of high hydrostatic pressure on non-covalently linked protein-complexes, it is possible to gain deeper insights into micellar structure by submitting suspensions of casein micelles to this treatment. If it was possible to assess the casein composition of the dissociating micellar fragments at different pressure levels by ex-situ analytical techniques, it would be possible to draw conclusions on the nature and stability of the interactions involved.

Apart from that, numerous experiments have shown the micellar disintegration to be a reversible process below pressures of 280 to 300 MPa. In this way the process of micelle formation among caseins could be simulated by technical means starting from an original system.

The first objective of this work was therefore to assess the process of micellar dissociation in terms of detection of the composition of the fragments built at different pressure levels. This was realized by means of ceramic membranes, separating dissociated micelles from intact ones by diffusion. Flexible polymer membranes were not suited for the experiments due to their pressure induced compaction. Ceramic single-channel membranes were better suited. However, these types of membranes showed increasing pressure sensitivity with lower MWCO.

Soon after the casein micelle was dissociated into smaller subunits under pressure these fragments were able to pass through the membrane. In fact smaller particles diffused faster through the porous barrier. A reduced casein-concentration in the inner volume of the hermetically sealed membrane segments can therefore be directly attributed to micellar dissociation.

Significant micellar disintegration or dissociation was detectable even at quite a low pressure of 150 MPa. The resulting primary fragments consisted mainly of α_s -caseins, being still intensively crosslinked by CaP. In these particles β - and κ -caseins are more weakly linked mainly by hydrophobic interactions.

With increasing pressures and therefore enhanced Ca-solubilisation, the primary fragments tend to disintegrate further until, at a pressure level of 400 to 450 MPa, the micelle is completely dissociated resulting in single casein-monomers. This could be interpreted in terms of α_s -caseins representing the stable backbone of the micelle, held together by hydrophobic interactions and Ca-bridges. The β - and κ -caseins are integrated in this backbone mainly by hydrophobic interactions, being mainly located on the inner and outer surface of the casein micelle.

In the second part of this work, it was aimed to highlight the processes during micelle reformation after high-pressure processing. Especially, the role of κ -casein as the protective colloid and size-limiting factor during micelle-(re)formation should be elucidated. For this, the high-pressure processing was not conducted alone but in combination with an enzymatic modification of the target-protein. Due to its high substrate-specificity, recombinant chymosin (EC 3.4.23.4) was chosen for the experiments: it cleaves κ -casein at AA-position Met¹⁰⁵-Phe¹⁰⁶ into the hydrophobic para- κ -casein (AA 1-105) and the hydrophilic CMP (AA 106-169), destroying its functional properties. Before determining the effect of κ -casein hydrolysis on particle reformation, the enzyme had to be well characterized concerning its pressure-sensitivity and, therefore, suitability for pressure-hydrolysis experiments. Furthermore, enzyme-kinetics as well as substrate-specificity had to be elaborated, to draw exact and reliable conclusions from the results.

By hydrolysing κ -casein under pressure the reassociation of casein micelles becomes altered in terms of particle sizes after the high pressure treatment. Higher DH-values of κ -casein led to larger resulting particles. When the DH increased from about 0.30 to about 0.75 the PD_{rel} increased from about 1.10 to about 2.0, irrespective of the treated size-fraction of casein micelles or the applied pressure level. This phenomenon could be explained by applying the dual-binding model of casein polymerisation and differed from micellar aggregation upon chymosin action alone. Therefore in this novel approach of combining functional modification of κ -casein with pressure treatment, the crucial role of κ -casein as chain terminating and growth-limiting factor in micellar reformation after high pressure treatment was highlighted. Furthermore, it can be assumed that κ -casein is completely located on the micellar surface. The achievable DH-values of casein before and after high pressure treatment did not differ significantly. In addition during pressure treatment the maximum DH did not change.

9 Literatur

- Ando, N. (2009): Biomacromolecules under high hydrostatic pressure.
- Anema, S.G.; Lowe, E.K.; Stockmann, R. (2005): Particle size changes and casein solubilisation in high-pressure-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*. 19 (2): 257–267.
- Atkins, P.W.; Höpfner, A.; Schleitzer, A. (2001): *Physikalische Chemie*. 3., korrigierte Aufl. Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH.
- Balny, C. (2004): Pressure effects on weak interactions in biological systems. *Journal of Physics-Condensed Matter*. 16 (14): S1245.
- Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (1992): *High pressure and biotechnology = Haute pression et biotechnologie*. Paris: INSERM.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2008): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Bonfatti, V.; Grigoletto, L.; Cecchinato, A.; Gallo, L.; Carnier, P. (2008): Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*. 1195 (1-2): 101–106.
- Bonizzi, I.; Buffoni, J.; Feligini, M. (2009): Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. *Journal of Chromatography A*. 1216 (1): 165–168.
- Boonyaratanakornkit, B.B.; Park, C.B.; Clark, D.S. (2002): Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1595 (1-2): 235–249.
- Bulca, S. (2007): *Hitzebedingte Veränderungen an der Caseinmicelle unter UHT-Bedingungen und deren Auswirkungen auf die Käsertechnologie*. Dissertation, TUM.
- Chitpinitiyol, S.; Crabbe, M.J.C. (1998): Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*. 61 (4): 395–418.
- Considine, T.; Patel, H.A.; Anema, S.G.; Singh, H.; Creamer, L.K. (2007): Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8 (1): 1–23.
- Dalgleish, D.G. (1998): Casein micelles as colloids: Surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*. 81 (11): 3013–3018.
- Dalgleish, D.G.; Spagnuolo, P.A.; Goff, H.D. (2004): A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 14 (12): 1025–1031.
- Dalgleish, D.G.; Horne, D.S.; Law, A.J.R. (1989): Size-Related Differences in Bovine Casein Micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 991 (3): 383–387.
- Dalgleish, D.G. (1984): Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research*. 51 (03): 425.
- Dalgleish, D.G. (2011): On the structural models of bovine casein micelles – review and possible improvements. *Soft Matter*. 7 (6): 2265.

- Darling, D.F.; Dickson, J. (1979): The determination of the zeta potential of casein micelles. *Journal of Dairy Research*. 46 (02): 329.
- Desiraju, G.R. (2011): A Bond by Any Other Name. *Angewandte Chemie International Edition*. 50 (1): 52–59.
- Dobson, C.M.; Šali, A.; Karplus, M. (1998): Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie*. 110 (7): 908–935.
- Donato, L.; Alexander, M.; Dalgleish, D.G. (2007): Acid Gelation in Heated and Unheated Milks: Interactions between Serum Protein Complexes and the Surfaces of Casein Micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (10): 4160–4168.
- Dumas, B.R.; Garnier, J. (1970): Structure of the casein micelle. The accessibility of the subunits to various reagents. *Journal of Dairy Research*. 37 (02): 269.
- Eyring, H. (1935): The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics*. 3 (2): 107.
- Famelart, M.H.; Le Graet, Y.; Raulot, K. (1999): Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal*. 9 (3-6): 293–297.
- Farrell, H.M.; Wickham, E.D.; Unruh, J.J.; Qi, P.X.; Hoagland, P.D. (2001): Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of [beta]-casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*. 15 (4-6): 341–354.
- Farrell, H.M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G.T.; Brown, E.M.; Butler, J.E.; Creamer, L.K.; Hicks, C.L.; Hollar, C.M.; Ng-Kwai-Hang, K.F.; Swaisgood, H.E. (2004): Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 87 (6): 1641–1674.
- Farrell, H.M.; Malin, E.L.; Brown, E.M.; Qi, P.X. (2006): Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11 (2-3): 135–147.
- Fischer, S. (2005): Einfluss der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die Filtrierbarkeit von Bier und das Verhalten von β -Glucan-Gel. Dissertation, TUM.
- Fox, P. F. (2006a): *Advanced dairy chemistry*. 3rd. New York: Kluwer Academic.
- Fox, P.F. (2006b): Milk proteins: General and historical review. In: Fox, P. F., (Hrsg.). *Advanced dairy chemistry*. 3rd. New York: Kluwer Academic.
- Fox, P.F.; Brodtkorb, A. (2008): The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*. 18 (7): 677–684.
- Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. (1998): *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st. London ; New York: Blackie Academic & Professional.
- Gagnaire, V.; Léonil, J. (1998): Preferential sites of tryptic cleavage on the major bovine caseins within the micelle. *Le Lait*. 78 (5): 471–489.
- García-Risco, M.R.; Recio, I.; Molina, E.; López-Fandiño, R. (2003): Plasmin Activity in Pressurized Milk. *Journal of Dairy Science*. 86 (3): 728–734.
- Garía-Risco, M.R.; Olano, A.; Ramos, M.; López-Fandiño, R. (2000): Micelar Changes Induced by High Pressure. Influence in the Proteolytic Activity and Organoleptic Properties of Milk. *Journal of Dairy Science*. 83 (10): 2184–2189.

- Gaspar, A.M.; Appavou, M.-S.; Busch, S.; Unruh, T.; Doster, W. (2008): Dynamics of well-folded and natively disordered proteins in solution: a time-of-flight neutron scattering study. *European Biophysics Journal*. 37 (5): 573–582.
- Gaucheron, F. (2005): The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*. 45 (4): 473–483.
- Gaucheron, F.; Famelart, M.H.; Mariette, F.; Raulot, K.; Michela, F.; Le Graeta, Y. (1997): Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*. 59 (3): 439–447.
- Gebhardt, R.; Doster, W.; Friedrich, J.; Kulozik, U. (2006): Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 35 (6): 503–509.
- Gebhardt, R.; Doster, W.; Kulozik, U. (2005): Pressure-induced dissociation of casein micelles: size distribution and effect of temperature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38 (8): 1209–1214.
- Gebhardt, R. (2005): Gebhard Zur Druckdissoziation von Proteinkomplexen: Lichtstreuung und thermodynamische Analyse am Beispiel von Anthropoiden-Hämocyaninen und Kasein-Mizellen Micellen. Dissertation, TUM.
- Gebhardt, R.; Kulozik, U. (2011): High pressure stability of protein complexes studied by static and dynamic light scattering. *High Pressure Research*. 31 (1): 243–252.
- Gebhardt, R.; Takeda, N.; Kulozik, U.; Doster, W. (2011): Structure and Stabilizing Interactions of Casein Micelles Probed by High-Pressure Light Scattering and FTIR. *The Journal of Physical Chemistry B*. 115 (10): 2349–2359.
- Gilliland, G.L.; Winborne, E.L.; Nachman, J.; Wlodawer, A. (1990): The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 8 (1): 82–101.
- Gottwald, W. (1993): *RP-HPLC für Anwender*. Weinheim ;, New York ;, Basel ;, Cambridge ; Tokyo: VCH.
- Greuling, S.; Seeger, T.; Vormwald, M. (2006): Autofrettage innendruckbelasteter Bauteile. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 37 (3): 233–239.
- Gross, M.; Jaenicke, R. (1994): Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*. 221 (2): 617–630.
- Heremans, K. (1982): High-Pressure Effects on Proteins and Other Biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 11: 1–21.
- Hinrichs, J. (2000): *Ultrahochdruckbehandlung von Lebensmitteln mit Schwerpunkt Milch und Milchprodukte*. Habilitationsschrift. Düsseldorf: VDI-Verl.
- Holland, J.W. (2008): Post-translational modifications of caseins. In: Abby Thompson; Mike Boland; Harjinder Singh, (Hrsg.). *Milk Proteins*: 107–132. San Diego: Academic Press.
- Holt, C. (1998): Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science*. 81 (11): 2994–3003.
- Holt, C.; Sawyer, L. (1993): Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β - and κ -caseins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 89 (15): 2683.

- Horne, D.S. (2006): Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11 (2-3): 148–153.
- Horne, D.S. (1998): Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*. 8 (3): 171–177.
- Horne, D.S. (2002): Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 7 (5-6): 456–461.
- Horne, D.S. (2003): Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. 213 (2-3): 255–263.
- Horne, D.S.; Davidson, C.M. (1986): The Effect of Environmental-Conditions on the Steric Stabilization of Casein Micelles. *Colloid and Polymer Science*. 264 (8): 727–734.
- Horne, D.; Dalgleish, D. (1985): A photon correlation spectroscopy study of size distributions of casein micelle suspensions. *European Biophysics Journal*. 11 (4):
- Horne, D.S. (2008): Casein micelle structure and stability. In: Abby Thompson; Mike Boland; Harjinder Singh, (Hrsg.). *Milk Proteins*: 133–162. San Diego: Academic Press.
- Hubbard, C.D.; Caswell, D.; Lüdemann, H.-D.; Arnold, M. (2002): Characterisation of pressure-treated skimmed milk powder dispersions: application of NMR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82 (10): 1107–1114.
- Huppertz, T.; Kruif, C.G. de (2006): Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: Influence of milk serum composition and casein micelle concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (16): 5903–5909.
- Huppertz, T.; Kelly, A.L.; Kruif, C.G. de (2006): Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *Journal of Dairy Research*. 73 (3): 294–298.
- Huppertz, T.; Fox, P.F.; Kelly, A.L. (2004): Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. *Food Chemistry*. 87 (1): 103–110.
- Huppertz, T.; Kruif, C.G. de (2007a): High pressure-induced solubilisation of micellar calcium phosphate from cross-linked casein micelles. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. 295 (1-3): 264–268.
- Huppertz, T.; Fox, P.F.; Kruif, K.G. de; Kelly, A.L. (2006): High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 1764 (3): 593–598.
- Huppertz, T.; Fox, P.F.; Kelly, A.L. (2004): Plasmin activity and proteolysis in high pressure-treated bovine milk. *Le Lait*. 84 (3): 297–304.
- Huppertz, T.; Kruif, C.G. de (2007b): Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey proteins. *Journal of Dairy Research*. 74 (02): 194.
- Jegouic, M.; Grinberg, V.Y.; Guingant, A.; Haertlé, T. (1996): Thiol-induced oligomerization of α -lactalbumin at high pressure. *Journal of Protein Chemistry*. 15 (6): 501–509.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Buffa, M.; Guamis, B.; Trujillo, A. (2007): Effects of High Pressure on Proteolytic Enzymes in Cheese: Relationship with the Proteolysis of Ewe Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*. 90 (5): 2113–2125.
- Keim, S.; Hinrichs, J. (2004): Influence of stabilizing bonds on the texture properties of high-pressure-induced whey protein gels. *International Dairy Journal*. 14 (4): 355–363.

- Kessler, H. (1996): Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik. 4. überarbeitete. und erweiterte Auflage. München: Kessler.
- Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. (2010): High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*. 119 (1): 202–208.
- Kreuß, M.; Strixner, T.; Kulozik, U. (2009): The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*. 23 (7): 1818–1826.
- Kruif, C.G. de (1992): Casein Micelles - Diffusivity As A Function of Renneting Time. *Langmuir*. 8 (12): 2932–2937.
- Kruif, C.G. de; Zhulina, E.B. (1996): kappa-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. 117 (1-2): 151–159.
- Kruif, C.G. de (1998): Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*. 81 (11): 3019–3028.
- Kruif, C.G. de; Zhulina, E.B. (1996): [kappa]-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 117 (1-2): 151–159.
- Kruif, C.G. de; Grinberg, V.Y. (2002): Micellisation of [beta]-casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 210 (2-3): 183–190.
- Kühnl, W. (2010): Kolloidale Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Zusammenspiel mit fluid-dynamischen Kräften an der Grenzfläche von Filtrationsmembranen – gezeigt am Beispiel der Fraktionierung von Milchproteinen mittels Mikrofiltration. Dissertation, TUM.
- La Fuente, M.A. de (1998): Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science & Technology*. 9 (7): 281–288.
- Läpple, V. (2006): Einführung in die Festigkeitslehre. Wiesbaden: Vieweg.
- Lemmon, E.W.; McLinden, M.O.; Friend, D.G. (2011): Thermophysical properties of fluid systems Lindstrom, P. J. & Mallard, W. G. (Hg.). URL: <http://webbook.nist.gov>.
- Lopez-Fandino, R. (2006): High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal*. 16 (10): 1119–1131.
- Lopez-Fandino, R.; La Fuente, M.A. de; Ramos, M.; Olano, A. (1998): Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. *Journal of Dairy Research*. 65 (01): 69–78.
- Lown, D.A.; Thirsk, H.R.; Wynnejon, L (1968): Effect of Pressure on Ionization Equilibria in Water at 25 Degrees C. *Transactions of the Faraday Society*. 64 (548P): 2073–&.
- Marchin, S.; Putaux, J.L.; Pignon, F.; Leonil, J. (2007): Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *Journal of Chemical Physics*. 126 (4):
- McMahon, D.J.; Oommen, B.S. (2008): Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*. 91 (5): 1709–1721.
- McMahon, D.J.; McManus, W.R. (1998): Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science*. 81 (11): 2985–2993.
- McMahon, D.J.; Brown, R.J. (1984): Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. *Journal of Dairy Science*. 67 (3): 499–512.

- Merel-Rausch, E.; Duma, I.P.; Hinrichs, J. (2006): Pressure-induced modification of casein micelles – influence of pressure built-up rate, pressure level, release rate and temperature on viscosity and particle size. *Milchwissenschaft - Milk Science International* (61): 255–259.
- Merel-Rausch, E. (2006): Hydrostatic high pressure treatment of casein to generate defined particle and gel structures. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Merel-Rausch, E.; Kulozik, U.; Hinrichs, J. (2007): Influence of pressure release rate and protein concentration on the formation of pressure-induced casein structures. *Journal of Dairy Research*. 74 (03): 283.
- Messens, W.; VanCamp, J.; Huyghebaert, A. (1997): The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science & Technology*. 8 (4): 107–112.
- Moatsou, G.; Bakopoulos, C.; Katharios, D.; Katsaros, G.; Kandarakis, I.; Taoukis, P.; Politis, I. (2008): Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research*. 75 (03):
- Morr, C. (1967): Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles¹. *Journal of Dairy Science*. 50 (11): 1744–1751.
- Mozhaev, V.V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C. (1996): High pressure effects on protein structure and function. *Proteins-Structure Function and Genetics*. 24 (1): 81–91.
- Needs, E.C.; Stenning, R.A.; Gill, A.L.; Ferragut, V.; Rich, G.T. (2000): High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*. 67 (01): 31–42.
- Nelson Jr, L.S.; Holt, C.; Hukins, D.W.L. (1989): The EXAFS spectra of poorly crystalline calcium phosphate preparations from heated milk. *Physica B: Condensed Matter*. 158 (1-3): 103–104.
- Nelson, D.L. (2009): *Lehninger biochemie*. [S.l.]: Koch Neff & Volckmar GmbH.
- O'Connell, J.E.; Grinberg, V.Y.; Kruif, C.G. de (2003): Association behavior of beta-casein. *Journal of Colloid and Interface Science*. 258 (1): 33–39.
- Ohmiya, K.; Fukami, K.; Shimizu, S.; Gekko, K. (1987): Milk Curdling by Rennet Under High-Pressure. *Journal of Food Science*. 52 (1): 84–87.
- Ono, T.; Obata, T. (1989): A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*. 56 (03): 453.
- Pace, C.N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 4 (11): 2411–2423.
- Paquin, P.; Britten, M.; Laliberté, M.-F.; Boulet, M. (1987): Interfacial Properties of Milk Casein Proteins. In: Brash, Horbett (Hg.) – *Proteins at interfaces*: 677–686.
- Parry, R.M., JR.; Carroll, R.J. (1969): Location of [kappa]-casein in milk micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 194 (1): 138–150.
- Payens, T.A.J. (1966): Association of Caseins and their Possible Relation to Structure of the Casein Micelle¹. *Journal of dairy science*. 49 (11): 1317–1324.
- Payens, T.A.J.; Heremans, K. (1969): Effect of pressure on the temperature-dependent association of β -casein. *Biopolymers*. 8 (3): 335–345.
- Phadungath, C. (2005): Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* (27): 201–212.

- Philippe, M.; Le Graet, Y.; Gaucheron, F. (2005): The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry*. 90 (4): 673–683.
- Philippe, M.; Gaucheron, F.; Le Graet, Y.; Michel, F.; Garem, A. (2003): Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Le Lait*. 83 (1): 45–59.
- Quinlan, R.J.; Reinhart, G.D. (2005): Baroresistant buffer mixtures for biochemical analyses. *Analytical Biochemistry*. 341 (1): 69–76.
- Regnault, S.; Thiebaud, M.; Dumay, E.; Cheftel, J.C. (2004): Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 degrees C or 20 degrees C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*. 14 (1): 55–68.
- Regnault, S.; Dumay, E.; Cheftel, J.C. (2006): Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: effects on the distribution of minerals and proteins between colloidal and soluble phases. *Journal of Dairy Research*. 73 (01): 91.
- Richter, T. (2011): Der Einfluss hohen hydrostatischen Drucks auf polymere thermoplastische Lebensmittelverpackungen. Dissertation, TUM.
- Rose, D. (1969): A proposed model of micelle structure in bovine milk. *Dairy Science Abstracts* (31): 171.
- Sawamura, S.; Kitamura, K.; Taniguchi, Y. (1989): Effect of pressure on the solubilities of benzene and alkylbenzenes in water. *The Journal of Physical Chemistry*. 93 (12): 4931–4935.
- Schrader, K.; Buchheim, W.; Morr, C.V. (1997): High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Food / Nahrung*. 41 (3): 133–138.
- Schubert, H. (1973): Kapillardruck und Zugfestigkeit von feuchten Haufwerken aus körnigen Stoffen. *Chemie Ingenieur Technik - CIT*. 45 (6): 396–401.
- Singh, H. (2004): Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 57 (2-3): 111–119.
- Slattery, C.W.; Evard, R. (1973): A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 317 (2): 529–538.
- Snoeren, T.H.M.; van Markwijk, B.; van Montfort, R. (1980): Some physicochemical properties of bovine [alpha]₂-casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 622 (2): 268–276.
- Swaigood, H.E. (2006): Chemistry of the Caseins. In: Fox, P. F., (Hrsg.). *Advanced dairy chemistry*. 3rd edition.: 139–201. New York: Kluwer Academic.
- Thomä, C.; Krause, I.; Kulozik, U. (2006): Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International Dairy Journal*. 16 (4): 285–293.
- Tolkach, A.; Kulozik, U. (2005): Fractionation of whey proteins and caseinomacropptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*. 67 (1-2): 13–20.
- Töpel, A. (2004): *Chemie und Physik der Milch*. 1. Hamburg: Behr.
- Torres, J.A.; Velazquez, G. (2005): Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*. 67 (1-2): 95–112.

- Trujillo, A.J.; Guamis, B.; Carretero, C. (2000): A procedure for the manufacture of goat milk cheese with controlled-microflora by means of high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*. 69 (1): 73–79.
- Tuinier, R.; Kruif, C.G. de (2002): Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*. 117 (3): 1290–1295.
- Udabage, P.; McKinnon, I.R.; Augustin, M.-A. (2000): Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. *Journal of Dairy Research*. 67 (03): 361–370.
- Udabage, P.; McKinnon, I.R.; Augustin, M.A. (2003): The use of sedimentation field flow fractionation and photon correlation spectroscopy in the characterization of casein micelles. *Journal of Dairy Research*. 70 (04): 453.
- Vaia, B.; Smiddy, M.A.; Kelly, A.L.; Huppertz, T. (2006): Solvent-Mediated Disruption of Bovine Casein Micelles at Alkaline pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (21): 8288–8293.
- van Hooydonk, A.C.M.; Boerrigter, I.J.; Hagedorn, H.G. (1986): pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* (40): 297–313.
- van Hooydonk, A.C.M.; Olieman, C.; Hagedorn, H.G. (1984): Kinetics of the chymosin-catalysed proteolysis of kappa-casein in Milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* (37): 207–222.
- Visser, H. (1992): *Protein interactions*. Weinheim, Germany ; New York: VCH.
- Visser, J.; Minihan, A.; Smits, P.; Tjan, S.; Heertje, I. (1986): Effects of pH and temperature on the milk salt system. *Netherlands Milk and Dairy Journal* (40): 351–368.
- Walstra, P. (1999): Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*. 9 (3-6): 189–192.
- Walstra, P.; Jenness, R.; Badings, H.T. (1984): *Dairy chemistry and physics*. New York: Wiley.
- Waugh, D.F. (1958): The interactions of Alpha-s-, beta- and kappa-caseins in micelle formation. *Discussions of the Faraday Society*. 25: 186.
- Waugh, D.F.; Noble, R.W. (1965): Casein Micelles. Foramtion and Structure II. *Journal of the American Chemical Society*. 87 (10): 2246–2257.
- Wedler, G. (2004): *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Werner, M. (2007): *Thermische Diffusion in Hochdruckprozessen*. Dissertation, TUM.
- Wiles, P.G.; Gray, I.K.; Kissling, R.C. (1998): Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *Journal of AOAC International*. 81 (3): 620–632.
- Winter, R.; Noll, F. (1998): *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Stuttgart: Teubner.
- Woolf, L.A. (1974): Self-diffusion in water to 2100 bar at 25 °C. *The Journal of Chemical Physics*. 61 (4): 1600.
- Woolf, L.A. (1975): Tracer diffusion of tritiated water (THO) in ordinary water (H₂O) under pressure. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 71 (1): 784

10 Anhang

Tab. 10.1: Chemikalien und Hilfsstoffe

| Substanz | Anwendung | Hersteller |
|---|--|---|
| Acetonitril (C ₂ H ₃ N) | Laufmittel, RP-HPLC, Casein-Analytik | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Puffer für Caseinsuspension | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Chymosin EC 3.4.23.4 | Enzymatische Hydrolyse von κ-Casein | DSM Food Specialties, Delft, Niederlande |
| Diesel | Druckübertragungsmedium in der Hochdruckanlage | Esso, Deutschland |
| Dinatrium- hydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Reinheitsbestimmung der Caseinstandards | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Ethanol (99,9 %), LiChroSolv | Lösen von Pepstatin | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Guanidinhydrochlorid (CH ₅ N ₃ ·HCl) | Reinheitsbestimmung der Caseinstandards | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Harnstoff (CH ₄ N ₂ O) | Probenpuffer RP-HPLC-Analytik | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| MES-Monohydrat (2-(N- Morpholino)- ethansulfonsäure) | Puffer für Caseinsuspension | Sigma Aldrich, St.Louis, USA |
| Na-Citrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) | Probenpuffer RP-HPLC-Analytik | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumazid (NaN ₃) | Mikrobielle Stabilisierung von Enzym- und Proteinlösungen | Sigma Aldrich, St.Louis, USA |
| Natrium- Dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Reinheitsbestimmung der Caseinstandards | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Natronlauge (NaOH) | pH-Einstellung | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Pasteurisierte Mager- milch | Caseinextraktion, Gewinnung von UF- Permeat | Weihenstephaner Molkerei, Unternehmensgruppe Theo Müller, Deutschland |
| Pepstatin | Abbruch der Chymosin-katalysierten Hydrolyse | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |

| | | |
|--|--|--|
| Perchlorsäure (HClO ₄) | Reaktionsabbruch bei enzymatischer Hydrolyse | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Petroleum | Druckübertragungsmedium in der Hochdruckanlage | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Reinigungslauge P3 Ultrasil 14 | Membranreinigung | Ecolab, Düsseldorf, Deutschland |
| Reinstwasser aus Milli- Q Integral3 | Pufferlösungen, Verdünnungen | Millipore GmbH, Schwalbch, Deutschland |
| Salpetersäure (53 %) (HNO ₃) | Membranreinigung | Staub & Co. Chemiehandels-gesellsch., München, Deutschland |
| Salzsäure (HCl) | pH-Einstellung | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Trifluoressigsäure (C ₂ HF ₃ O ₂) | Laufmittel RP-HPLC | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Tris-Base | Puffer für Caseinsuspension | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| Univis | Druckübertragungsmedium in der Hochdruckanlage | Esso, Deutschland |
| α _s -Casein (Reinheit > 70 %) | Casein-Analytik | Sigma Aldrich, St.Louis, USA |
| β-Casein (Reinheit >70 %) | Casein-Analytik | Sigma Aldrich, St.Louis, USA |
| β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS) | Probenpuffer RP-HPLC-Analytik | Merck, Darmstadt, Deutsch- land |
| κ-Casein (Reinheit ≥ 80 %) | Casein-Analytik | Sigma Aldrich, St.Louis, USA |

Tab. 10.2: Materialien

| Material | Anwendung | Hersteller |
|---|--|---|
| Einmalfilter, Chromafil, 0,45µm | Probenvorbereitung HPLC | Machery Nagel, Düren, Deutschland |
| Gummistopfen groß (Naturgummi) | Verpackung der Proben für die Hochdruckbehandlung | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Gummistopfen klein (Naturgummi) | Verpackung der Proben für die Hochdruckbehandlung | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Indikatorstreifen, pH Fix 6,0 – 10,0 | pH-Kontrolle bei der Membranreinigung | Machery Nagel, Düren, Deutschland |
| Küvetten „Folded capillary cells DTS1060“ | Messung des Zeta-Potentials in Caseinsuspensionen | Malvern Instruments GmbH, Herrenbrecht, Deutschland |
| LDPE-Schlauchfolie (0560/300-100) | Verpackung der Proben für die Hochdruckbehandlung | Gropack Verpackung GmbH, Gräfelfing, Deutschland |
| Parafilm | Verpackung der Proben für die Hochdruckbehandlung und für die Lagerung | American National Can, Greenwich, USA |
| Pasteurpipetten (Glas) | Probenentnahme, Probeneinwaage | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Pasteurpipetten (Plastik) | Probenentnahme, Probeneinwaage | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| PP Probengefäße 60 ml | Hochdruckbehandlung | Vitlab GmbH, Großostheim, Deutschland |
| PP-Kryoröhrchen 3 ml | Hochdruckbehandlung | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| PP-Probengefäße 30 ml | Hochdruckbehandlung | Vitlab GmbH, Großostheim, Deutschland |
| Probengefäße mit Schraubverschluss 15 ml | Probenlagerung | Sarstedt Laborbedarf, Nümbrecht, Deutschland |
| Probengefäße mit Schraubverschluss | Probenlagerung | Sarstedt Laborbedarf, Nümbrecht, Deutschland |

Anhang

| | | |
|--|---|---|
| 45 ml | | |
| PS-Einmalküvetten, 10 mm x 10 mm | Partikelgrößenbestimmung | Sarstedt Laborbedarf, Nümbrecht, Deutschland |
| Quarzglasküvetten 10 mm x 10 mm | Reinheitsbestimmung der Caseinstandards | PG-Instruments, Wibtoft, UK |
| Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml | Probenentnahme, Probeneinwaage | Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| UF-Röhrenmembranen | Dissoziationsversuche mit Casein unter Hochdruck | atech innovations, Gladbeck, Deutschland |
| Vials, Braunglas (Klemmdeckel) | HPLC-Analytik | Krayem GmbH, Ingolstadt, Deutschland |
| Vials, Klarglas (Schraubverschluss) | HPLC-Analytik | Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland |

Tab. 10.3: Geräte und Anlagen

| Gerät | Anwendung | Hersteller |
|--|---|---|
| Analysenwaage Mettler PM 4600 Delta Range | Einwaagen | Mettler Toledo, Giessen, Deutschland |
| Diverse Pipetten | Probendosierung | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Feinwaage Precisa 205 ASCS | Probeneinwaage, Tarierung der Zentrifugengefäße | Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz |
| Flammenphotometer ELEX 6381 | Mineralienbestimmung | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Hochdruckanlage | Hochdruckversuche | Bolenz & Schäfer, Biedenkopf, Deutschland |
| HPLC-Säule PLRP-S | CMP-Analytik | Latek, Eppenheim, Deutschland |
| HPLC-Säule Zorbax 300 SB C-18 | Caseinanalytik | Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland |
| HPLC-System 1100 Series mit UV-Detektor und Chemstation® | HPLC-Analytik | Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland |
| Magnetrührer IKAMAG Ret | Probendurchmischung | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| Magnetsiegelgerät SMS350-500-700-1000 | Verpackung der Proben für die Hochdruckbehandlung | Almere, Niederlande |
| pH-Meter 766 Calimatic | pH-Einstellung | Knick, Berlin, Deutschland |
| Photometer T80 UV/VIS Spectrometer | Reinheitsbestimmung der Caseinstandards | PG-Instruments, Wibtoft, UK |
| Stickstoffanalysator LECO FP-528 | Stickstoffbestimmung | LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach, Deutschland |
| Thermo-Cycler HTML 133 | Erhitzung und Inkubation | Harp Labor Consult, Bovenden, Deutschland |

| | | |
|---|--|--|
| Thermometer Ni-Cr-Ni Typ K | Temperaturkontrolle | Ahlborn, Holzkirchen, Deutschland |
| Tischzentrifuge Z233-M-2 | Probenvorbereitung für die HPLC- Analytik | Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland |
| Ultrafiltrationsanlage DSS Silkeborg AS 10000 Da Cutoff | Gewinnung von UF-Permeat | DSS, Nakskov, Dänemark |
| Ultrafiltrationsanlage DDS 25000 Da Cutoff | Gewinnung von Caseinpulver | |
| Ultrazentrifuge L7 | Caseinextraktion und –Fraktionierung | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| Vakkumierer A300/16 | Verpackung der Proben für die Hoch- druckbehandlung | Multivac, Wolfertschwenden, Deutschland |
| Vortex, VF2 | Probendurchmischung | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| Wasserbad WB22 | Probentemperierung, Inkubation | Memmert, Schwabach, Deutschland |
| Wasserbad Haake F3 | Temperierung der Hochdruckanlage | Haake, Karlsruhe, Deutschland |
| Zetasizer Nano ZS ZEN- 3600 | Messung von Partikelgröße und Zetapotential | Malvern Instruments GmbH, Herrenbrecht, Deutschland |
| Mikrofiltrationsmodul (Trenngrenze 100 nm) | Gewinnung von mizellarem Caseinpulver | APV, Silkeborg, Dänemark |

A Reinigung und Regeneration der Membranen

Die verwendeten Membransegmente wurden in einem eigens dafür konzipierten Modul gereinigt und entsprechend konditioniert. Im Folgenden sind sowohl eine Schnittzeichnung des Reinigungsmoduls (Abb. 10.1) sowie ein entsprechendes Fließschema der gesamten Reinigungsanlage (Abb. 10.2) dargestellt.

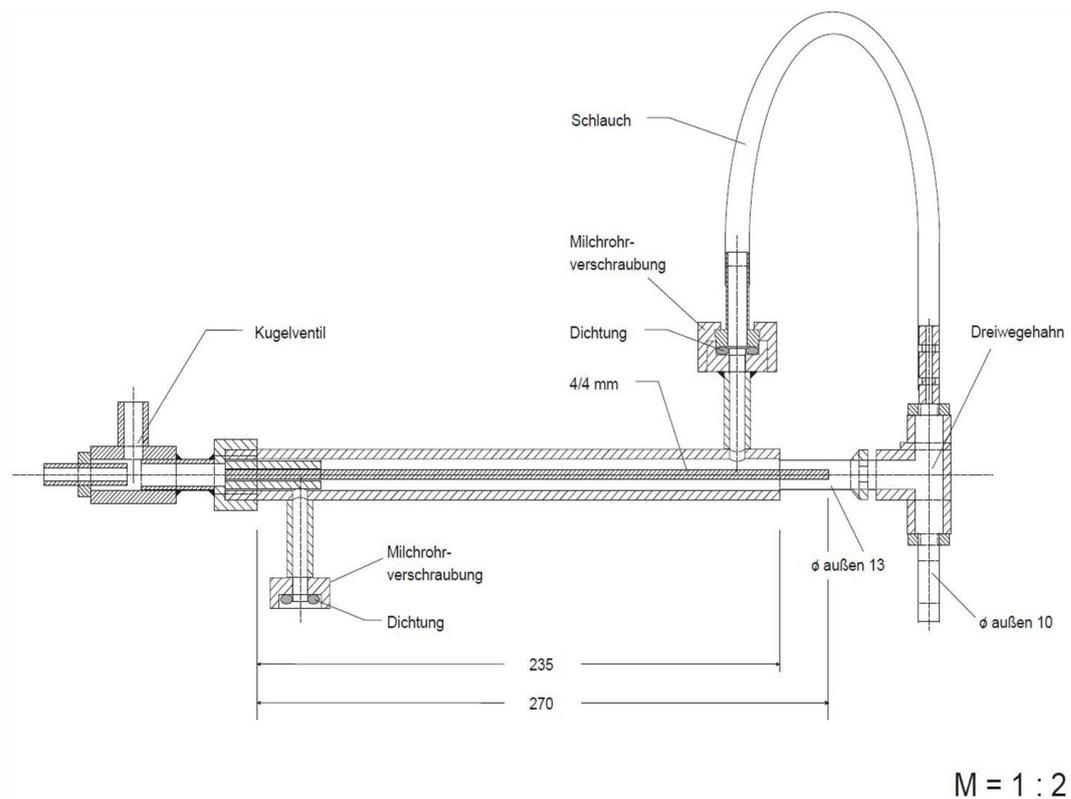


Abb. 10.1: Schnittzeichnung des Membranreinigungsmoduls

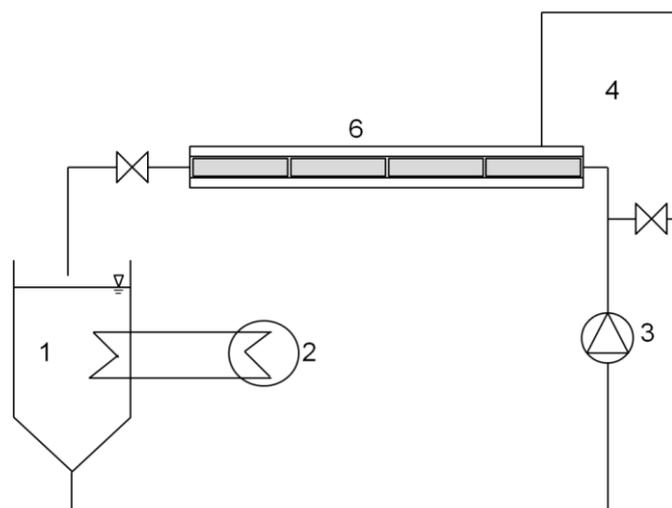


Abb. 10.2: Anlagenschema der Membranreinigungsanlage

In das Vorlaufgefäß (1) werden die jeweiligen Reinigungsmittel gegeben und mit Hilfe eines Wasserbads (2) auf die gewünschte Temperatur erhitzt. Über eine Schlauchpumpe (3) wird das Reinigungsmittel durch das System gepumpt. Um beim Spülen mit Wasser sofort einen Großteil der Reinigungsflüssigkeit auszutragen, ist ein Bypass (4) integriert. Im Reinigungsmodul (5) werden die Membranen fixiert. Um den Druck auf die Membranen bzw. die Permeation zu steuern, wurde am Austritt ein Drosselventil eingefügt.

Die Membranen werden für die Reinigung auf die Edelstahlstange in der Mitte des Moduls aufgefädelt. Zwischen jedes Membranstück sowie zwischen Membran und Gehäuse wird ein Gummiring eingefügt. Die Gummiringe dienen dem Schutz der Membranen und der Abdichtung der einzelnen Membransegmente und des Gehäuses. Anschließend werden die beiden Modulteile fest verschraubt, wodurch die Membranen fixiert und durch Verpressung der Gummiringe abgedichtet werden

Zur Entfernung der Proteinrückstände wird eine 1 %ige Reinigungslauge verwendet. Da die Membranen sehr empfindlich gegenüber großen Temperatursprüngen sind, wird die Reinigung bei Umgebungstemperatur gestartet und die Lauge in 30 min langsam auf 50 °C erhitzt und dabei im Reinigungsmodul zirkuliert. Sobald die Zieltemperatur erreicht ist, wird die Lauge bei konstanter Temperatur für 30 min weiter im Kreislauf gefahren. Nach diesem Schritt wird die Lauge mit 5-10 l, 50 °C heißem, enthärtetem Wasser ausgefahren.

Zur Entfernung möglicher anorganischer Rückstände wird anschließend 0,5 %ige Salpetersäure für 30 min im Kreislauf gefahren und ebenfalls mit 5-10 l Wasser ausgefahren. Die abschließende Konditionierung erfolgt mit 0,5 %iger Reinigungslauge. Dies hat den Zweck, eine negativ geladene Membranoberfläche zu erzeugen und somit die unspezifische Adsorption der ebenfalls negativ geladenen Caseinmizellen oder Caseinzellfragmente zu minimieren. Im letzten Schritt wird so lange mit enthärtetem Wasser gespült, bis sowohl im Permeat als auch im Retentat ein pH Wert von 7 erreicht wird. Nach der Reinigung werden die Membranen vorsichtig aus dem Reinigungsmodul entnommen und vor Staub geschützt gelagert.

Da die Querschnittsfläche im Reinigungsmodul sehr klein ist, reicht ein Volumenstrom von 0,03 l/s aus um eine Überströmgeschwindigkeit von 9-19 m/s zu erreichen. Diese Geschwindigkeit gewährleistet eine gute Reinigungswirkung in den Membranen. Aufgrund des so erzeugten Staudrucks lag der Flux durch die Membranen ebenfalls im akzeptablen Bereich.

B Modul für den Einsatz keramischer Einkanalmembranen unter Hochdruck

Um einen Vergleich zwischen den Ergebnissen, sowie die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten, musste die Diffusion unter definierten Bedingungen ablaufen. Von besonderer Bedeutung war hierbei ein konstantes Volumenverhältnis zwischen Probenvolumen und Volumen des umgebenden Mediums. Zur Abdichtung und Fixierung der Einkanalmembranen wurde die in Abb. 10.3 dargestellte Halterung konstruiert.

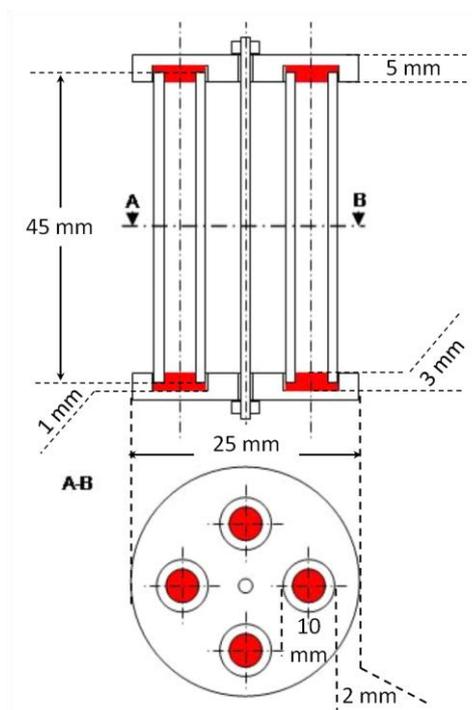


Abb. 10.3: Schnittzeichnung des Membranmoduls für Druckdissoziationsversuche

Die Membranen werden mit Caseinlösung gefüllt und Gummidichtungen (hier rot dargestellt) verschlossen. Eine ausreichende Verpressung wird durch das vorsichtige, handfeste Anziehen von zwei Muttern oben und unten an der Gewindestange erreicht. Die befüllten und abgedichteten Membranen werden in einen PE-Becher gegeben, der mit Pufferlösung aufgefüllt und mit einem Gummistopfen blasenfrei verschlossen wird. Die Abmessungen des Bechers und der Halterung sind durch die Geometrie der Autoklavenkammer vorgegeben. Das gesamte Probenvolumen im Membraninnenraum beträgt 3,2 ml. Das äußere Puffervolumen beträgt ca. 29 ml, was ein Volumenverhältnis von ca. 1:9 ergibt.

C Einfärbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brilliant Blue

Die fertigen Gele werden mit Coomassie Brilliant Blue blau eingefärbt (komplette blaue Durchfärbung des Hintergrundes) und anschließend entfärbt bis die Proteinbanden klar ersichtlich sind. Dabei muss die Entfärbelösung unter Umständen mehrmals gewechselt werden. Die Verwendeten Lösungen und Arbeitsschritte sind in Tab. 10.4 dargestellt.

Tab. 10.4: Protokoll zur Färbung der Gele (Angaben des Herstellers GE Healthcare)

| Schritt | Lösungen | Menge | Zeit |
|---------------|--|------------|--------|
| Fixierung | Ethanol | 400 ml | 30 min |
| | Essigsäure | 100 ml | |
| | Mit destilliertem Wasser auffüllen auf | 1000 ml | |
| Färbelösung | PhastGel Blue R | 1 Tablette | 10 min |
| | Mit Entfärbelösung auffüllen auf | 400 ml | |
| Waschen | Destilliertes Wasser | | |
| Entfärben | Ethanol | 250 ml | |
| | Essigsäure | 80 ml | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 1000 ml | |
| Konservierung | Glyzerin (87 % w/v) | 25 ml | 30 min |
| | Mit Entfärbelösung auffüllen auf | 250 ml | |

D Silberfärbung der SDS-Gele

Die empfindlichere Silberfärbung der Proteinbanden auf den SDS-Gele wird unter Verwendung des PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Die entsprechenden Lösungen und das Protokoll der Färbung sind in Tab. 10.5 aufgeführt.

Tab. 10.5: Silberfärbeprotokoll für SDS-Gele

| Schritt | Lösungen | Menge | Zeit |
|-----------------|---|---------|----------|
| Fixierung | Ethanol | 100 ml | 30 min |
| | Eisessig | 25 ml | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |
| Sensibilisieren | Ethanol | 75 ml | 30 min |
| | Glutardidehyd (25 % w/v) | 1,25 ml | |
| | Natriumthiosulfat (5 % w/v) | 10 ml | |
| | Natriumacetat | 17 g | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |
| Waschen | Destilliertes Wasser | | 3x5 min |
| Silberreaktion | Silbernitratlösung (2,5 % w/v) | 25 ml | 20 min |
| | Formaldehyd (37 % w/v) | 0,1 ml | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |
| Waschen | Destilliertes Wasser | | 2x1 min |
| Entwickeln | Natriumcarbonat | 6,25 g | 2-5 min |
| | Formaldehyd | 0,05 ml | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |
| Stoppen | EDTA-Na ₂ •2H ₂ O | 6,25 g | |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |
| Waschen | Destilliertes Wasser | | 3x5 min |
| Konservieren | Glyzerin (87 % w/v) | 25 ml | 2x30 min |
| | Mit destilliertes Wasser auffüllen auf | 250 ml | |

E Thermophysikalische Eigenschaften von Wasser

Die Daten für die thermophysikalischen Daten von Wasser wurden der NIST-Datenbank (Lemmon et al., 2011) (online zugänglich unter <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>) entnommen und grafisch unter Verwendung von Mathcad und SigmaPlot aufgearbeitet. Für die dreidimensionale Darstellung der Druck- und Temperaturabhängigkeit der Dichte (Abb. 10.4), der Viskosität (Abb. 10.5) sowie des Diffusionskoeffizienten als Funktion des Partikelradius des diffundierenden Teilchens (Abb. 10.6) wurde jeweils die Darstellung bzw. Perspektive mit dem höchsten Informationsgehalt gewählt.

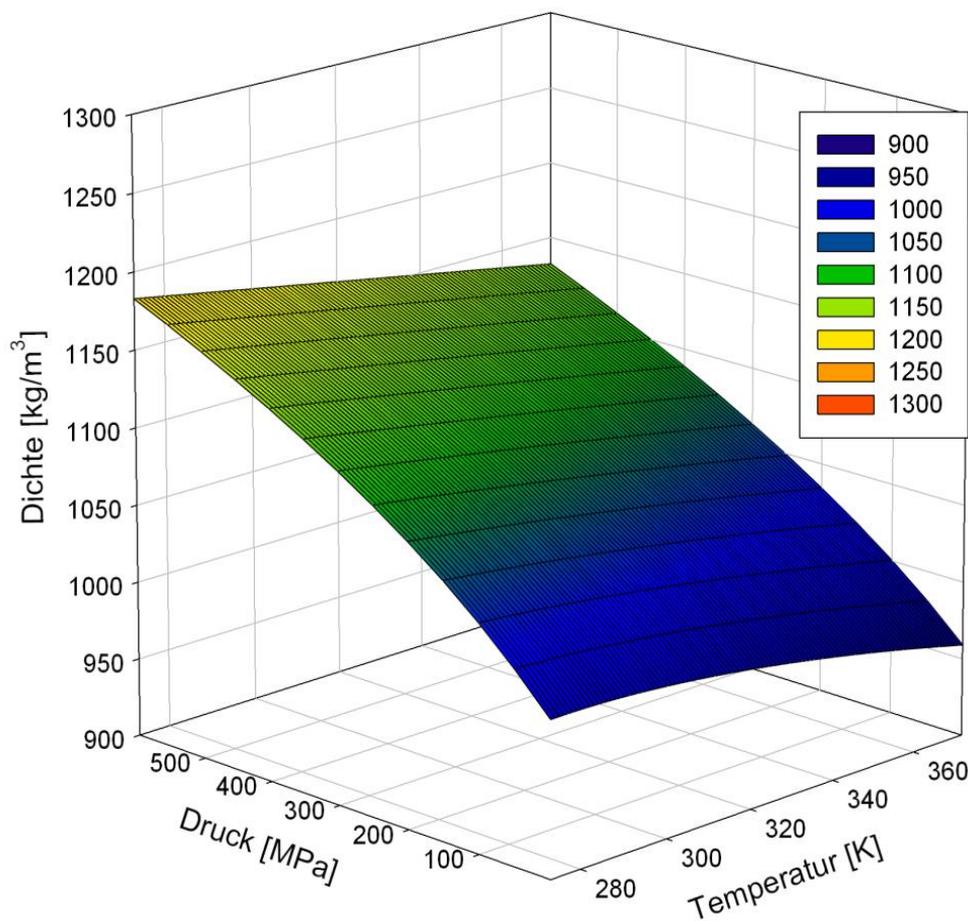


Abb. 10.4: Druck- und Temperaturabhängigkeit der Dichte von Wasser auf der Basis von Lemmon et al. (2011)

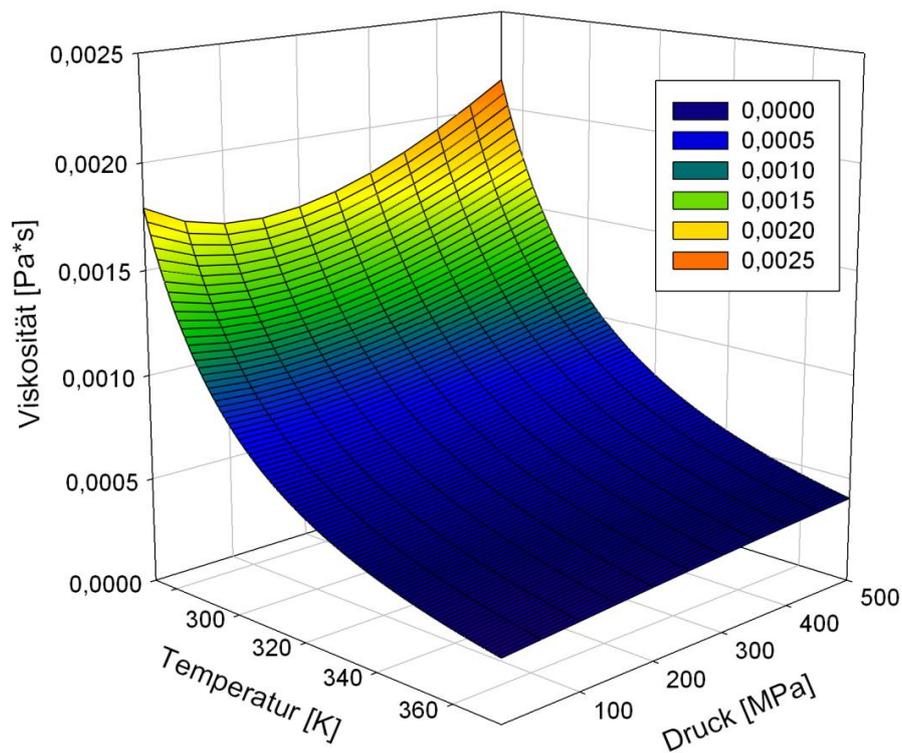


Abb. 10.5: Druck- und Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Wasser auf der Basis von Lemmon et al. (2011)

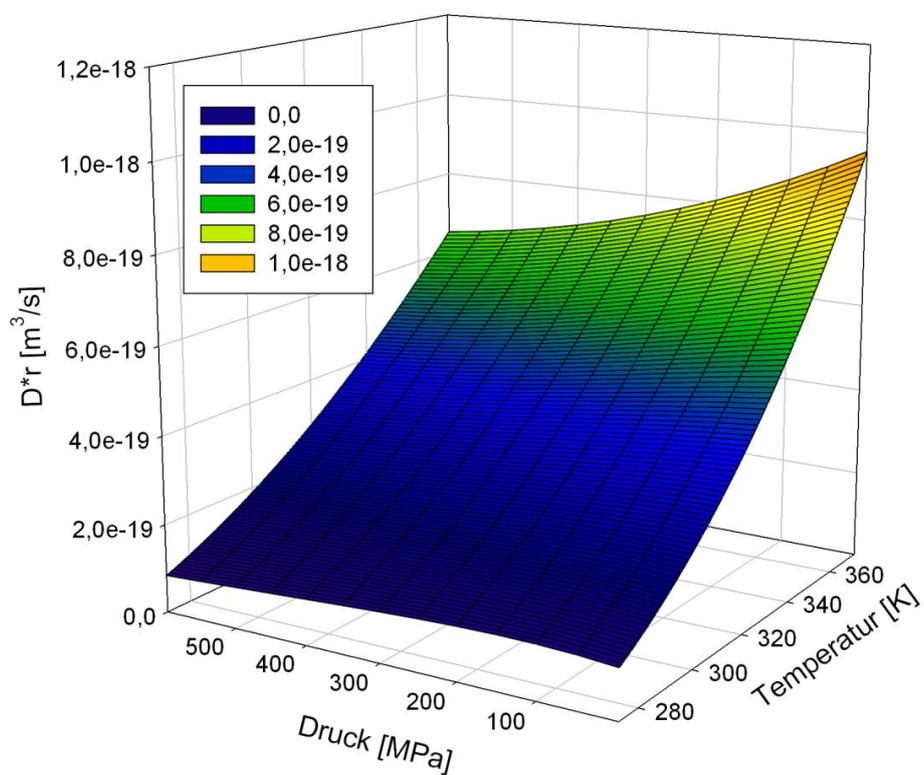


Abb. 10.6: Druck- und Temperaturabhängigkeit Diffusionskoeffizienten eines Partikels des Radius r in Wasser auf der Basis von Lemmon et al. (2011)

Tab 10.6: Wertezusammenstellung der wesentlichen Eigenschaften von Wasser unter Druck

| Druck [MPa] | 0,1 | 150 | 300 | 450 | 600 |
|-----------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| Temperatur [K] | Viskosität [Pa*s] *10⁻² | | | | |
| 283,16 | 0,1305 | 0,1259 | 0,1360 | 0,1538 | 0,1753 |
| 293,16 | 0,1001 | 0,1001 | 0,1086 | 0,1213 | 0,1357 |
| 303,16 | 0,0797 | 0,0820 | 0,0893 | 0,0989 | 0,1090 |
| 313,16 | 0,0653 | 0,0687 | 0,0751 | 0,0827 | 0,0902 |
| 323,16 | 0,0547 | 0,0586 | 0,0643 | 0,0706 | 0,0763 |
| 333,16 | 0,0466 | 0,0508 | 0,0560 | 0,0612 | 0,0658 |
| | D*r [m³/s]*10⁻¹⁹ | | | | |
| 283,16 | 1,5887 | 1,6478 | 1,5249 | 1,3484 | 1,1830 |
| 293,16 | 2,1443 | 2,1443 | 1,9776 | 1,7696 | 1,5826 |
| 303,16 | 2,7855 | 2,7077 | 2,4875 | 2,2450 | 2,0370 |
| 313,16 | 3,5135 | 3,3386 | 3,0549 | 2,7737 | 2,5444 |
| 323,16 | 4,3292 | 4,0373 | 3,6798 | 3,3548 | 3,1031 |
| 333,16 | 5,2330 | 4,8035 | 4,3611 | 3,9870 | 3,7113 |
| | Dichte [kg/m³] | | | | |
| 283,16 | 999,7 | 1061,3 | 1108,0 | 1145,8 | 1177,8 |
| 293,16 | 998,2 | 1057,6 | 1103,4 | 1140,8 | 1172,7 |
| 303,16 | 995,7 | 1053,5 | 1098,6 | 1135,8 | 1167,6 |
| 313,16 | 992,2 | 1049,2 | 1093,8 | 1130,7 | 1162,4 |
| 323,16 | 988,0 | 1044,6 | 1088,9 | 1125,6 | 1157,3 |
| 333,16 | 983,2 | 1039,7 | 1083,8 | 1120,5 | 1152,2 |

Lebenslauf

Persönliches

Martin Heinrich, geboren am 29.06.1979 in Schweinfurt

Promotion

2006-2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der Technischen Universität München -Weihenstephan

Thema der Promotion: „Untersuchungen zum hochdruckausgelösten Zerfall der Caseinmizelle“

Hochschulbildung

2001-2006 Studium der Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der Technischen Universität München – Weihenstephan

Diplomarbeit: „Bestimmung des Einflusses einer Hochdruckbehandlung auf Schutzgasverpackungen mittels in-situ Flüssigkristallthermographie und optischen ex-situ Analysen“

Berufsausbildung

1998-2001 Ausbildung zum Commis de cuisine, Kurhotel Residenz, Bad Wörishofen

Schulbildung

1989-1998 Besuch des Marianums, Gymnasium des Schulwerks der Diözese Augsburg, in Buxheim

Publikationen

- Heinrich, M. (2007): Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln, Deutsche Milchwirtschaft 11/2007 (58. Jg.), 394
- Heinrich, M. & Kulozik U. (2009): Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln – Auswirkungen auf Milch und ihre Inhaltsstoffe, Deutsche Milchwirtschaft 6/2009 (60 Jg.), 220 – 224
- Heinrich, M. & Kulozik U. (2009): Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln – Auswirkungen auf Milch und ihre Inhaltsstoffe, Ernährung/Nutrition Vol. 33, 12-2009, 505 – 515
- Heinrich, M., Lauber S., Kulozik, U. (2010): Caseinmicelles as natural nano-sized particles – Possible ways to achieve new insights in micellar structure and mechanisms of formation by high hydrostatic pressure, proceedings of the world congress on particle technology 6, Nürnberg, Germany (ISBN 978-3-00-030570-2)
- Heinrich, M. & Kulozik U. (2010): Study of chymosin hydrolysis of casein micelles under ultra high pressure: effect on re-association upon pressure release, International Dairy Journal 21 (9), 664 – 669

Vorträge

- Heinrich, M. (2007): Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln, Ansbacher Fachgespräche „Neue Technologien nutzen“, Ansbach, 21.03.2007
- Heinrich, M. (2007): Innovativer Einsatz der Ultrahochdrucktechnologie zur Haltbarmachung sowie zur Struktur- bzw. Produktgestaltung von Lebensmitteln. Technologieseminar 2007 „Neue Wege in der Lebensmittelverfahrenstechnik: Prozesse – Optimierung – Innovationen“, Freising – Weihenstephan, 24.-26. 10. 2007
- Heinrich, M. & Kulozik, U. (2008): Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln – Auswirkungen auf Milch und ihre Inhaltsstoffe. Hochdrucktagung 2008 – Kaltes Kochen und Pasteurisieren, Universität für Bodenkultur in Wien, 16.09.2008
- Heinrich, M. & Kulozik, U. (2009): Enzymatische Hydrolyse von κ -Casein unter hohem hydrostatischem Druck, DECHEMA-Jahrestreffen der Fachausschüsse Lebensmittelverfahrenstechnik und Mehrphasenströmungen, Frankfurt, 15. - 17.03.2010
- Heinrich, M. & Kulozik, U. (2009): Enzymatic Hydrolysis of kappa-Casein under High Hydrostatic Pressure. Milchkonferenz 2009, Universität für Bodenkultur in Wien, 17. – 18.09.2009
- Heinrich, M. & Kulozik, U. (2010): Effect of κ -casein hydrolysis on the reassociation behaviour of pressure-decomposed casein micelles. IDF symposium on microstructure of milk products, Tromsø, 09. - 11.06.2010
- Heinrich, M. & Kulozik, U. (2010): Effect of κ -casein hydrolysis on the reassociation behaviour of pressure decomposed casein micelles. 6th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2010), Freising-Weihenstephan, 28.08 – 01.09.2010

- Heinrich, M. (2010): Casein Mizellen als natürliches Trägersystem – Möglichkeiten zur Modifikation und gezielter Nutzung als Träger für funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe. Technologieseminar 2010 "Mikroverkapselung und Mikropartikulierung: Native und neue Strukturen aus Proteinen und Polysacchariden", Freising – Weihenstephan, 28. – 29. 10. 2010
- Heinrich, M. (2010): Hoher hydrostatischer Druck als Ansatzpunkt für neue Erkenntnisse zur Struktur von Casein-Micellen. Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung 2010, 07.-08. 10 .2010
- Heinrich, M. & Kulozik U. (2011): Characterisation of the pressure induced fragments of casein micelles by means of ceramic membranes. DECHEMA-Jahrestreffen des Fachausschusses Lebensmittelverfahrenstechnik, Vlaarding (NL), 22. - 24.03.2011

Posterpräsentationen

- Heinrich, M., Osterroth, I., Lauber S., Kulozik U. (2010): Caseinmicelles as natural nano-sized particles – Possible ways to achieve new insights in micellar structure and mechanisms of formation by high hydrostatic pressure. (Posterpräsentation) World congress on particle technology, Nürnberg, 26.-29.04.2010
- Heinrich, M., Rauh, V., Zurawski, S., Kulozik, U. (2011): Characterisation of the pressure induced fragments of casein micelles by means of ceramic membranes. (Posterpräsentation) World Dairy Summit, Parma, 15.-19.10.2011