



Casein-Micellen als potentielle Trägersysteme für Naturstoffe

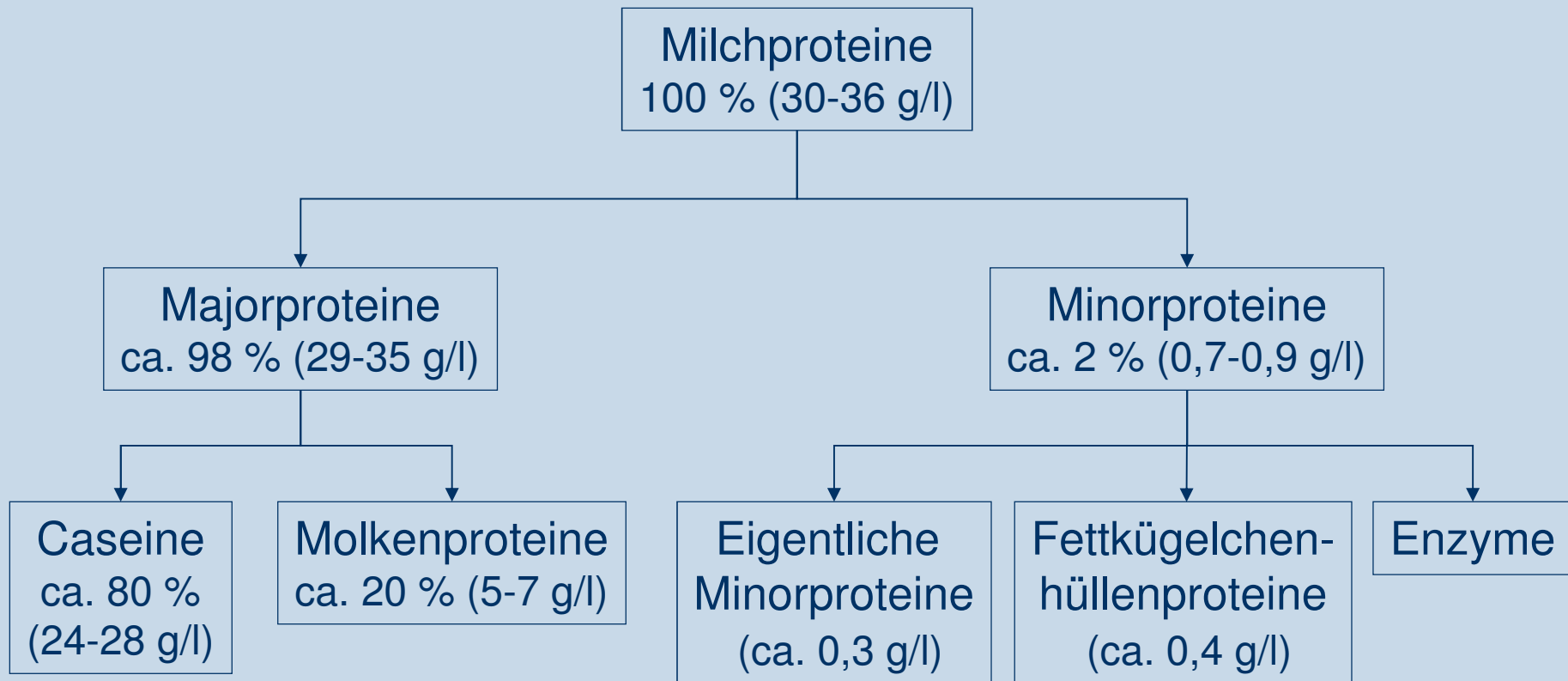
D. Martin, J. Fischer, K. Schrader, P. Chr. Lorenzen
Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Kiel

Zusammensetzung von Kuhrohmilch (Gew. %)

Wasser	87,0 - 89,0
Fett	2,0 - 7,0
Eiweiß	2,5 - 6,0
Milchzucker	3,5 - 5,5
Asche	0,5 - 0,8
Minorbestandteile	0,1

Daten aus: E. Schlimme, W. Buchheim: Milch und ihre Inhaltsstoffe. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen (1995).

Einteilung der Milchproteine in Hauptproteingruppen



Daten aus: A. Töpel: Chemie und Physik der Milch: Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel.
B. Behr`s Verlag, Hamburg (2004).

Casein-Micellen (CM) als potentielle Trägersysteme für Naturstoffe

Modellsubstanzen für die Beladung:

- Uridin-5'-monophosphat (5'-UMP)
- β -Carotin

Herstellung von CM:

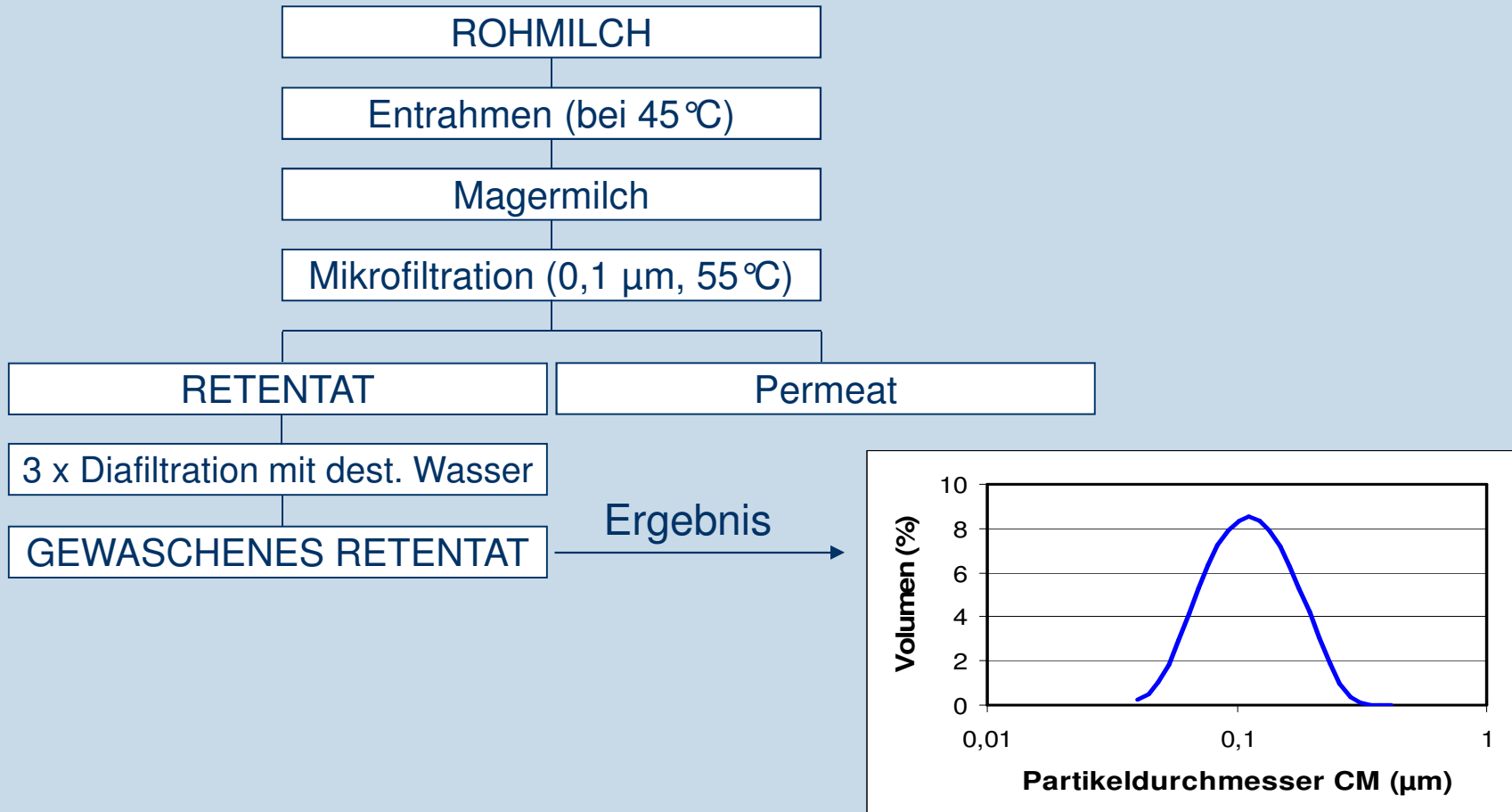
Die Herstellung der CM als Ausgangsmaterial für die Umsetzung mit dem hydrophilen 5'-UMP und dem hydrophoben β -Carotin erfolgte auf folgenden Wegen:

- a) Native CM: Herstellung durch Mikrofiltration von Magermilch
- b) Artificielle CM: Herstellung einer Na-Caseinat-Lösung, Beladung, dann anschließende Zugabe u.a. von CaCl_2 .

Aktuelle Versuche:

- Umsetzungen von β -Carotin mit Magermilch bzw. mit rekonstituierter Magermilch bei veränderten Versuchsbedingungen

Herstellung des Ausgangsmaterials (natives Casein) durch Mikrofiltration*



*: Herstellung nach Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.: Anreicherung von Milcheiweißfraktionen durch Mikrofiltration. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58**, 41-51 (2006).

Durchgeführte Untersuchungen:

Charakterisierung der CM und Überstände:

- Laserbeugung (Teilchengrößenverteilung)
- Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)
- Ribonucleotid-HPLC (5'-UMP)
- Photometrie (beta-Carotin)
- FT-IR-Spektroskopie (MIR)

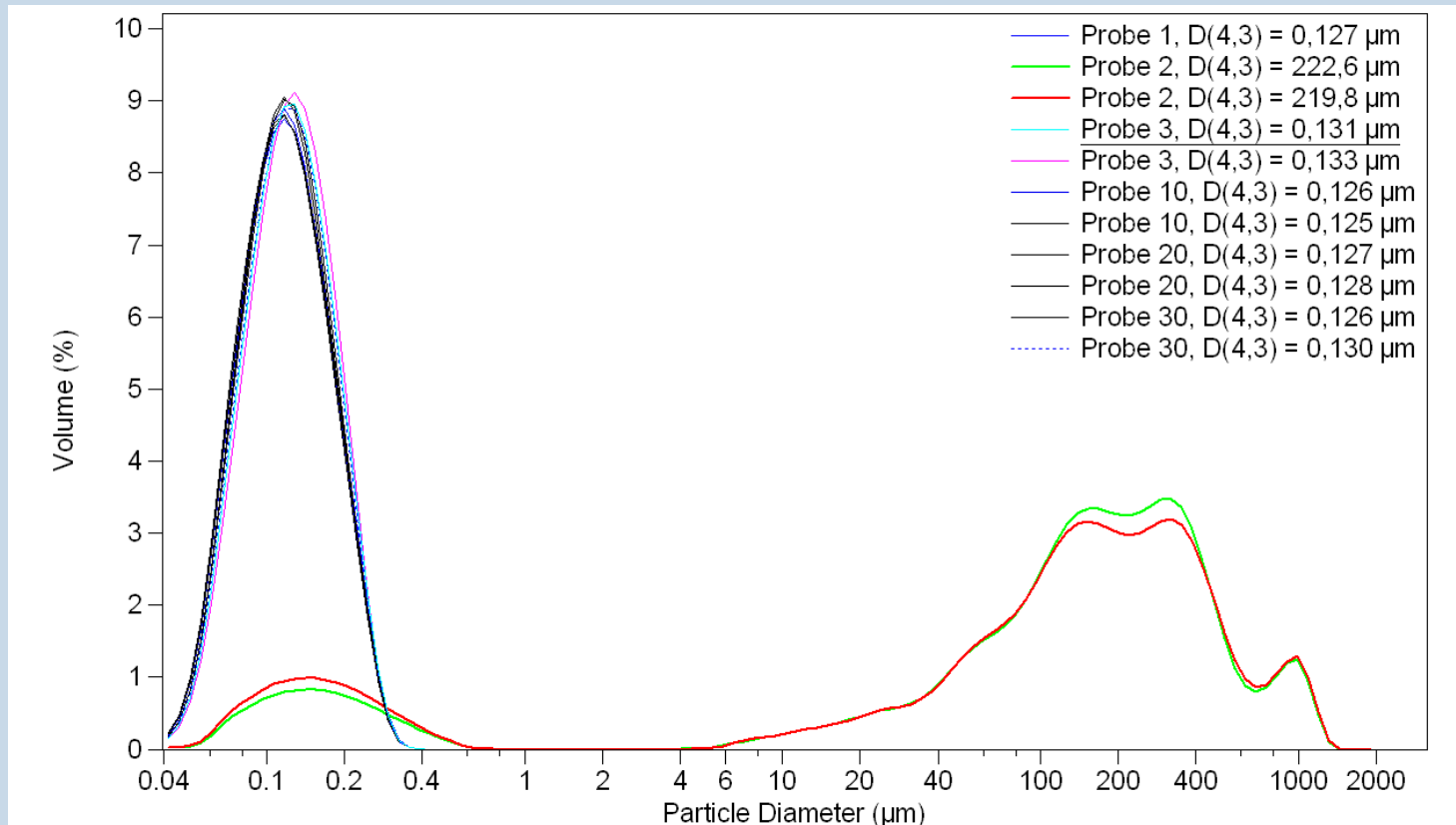
Umsetzung von CM mit Uridin-5'-monophosphat (5'-UMP):

- CM wurden bei nativem pH sowie bei erniedrigtem pH mit 5'-UMP umgesetzt (1 h Schwenken bei Raumtemp.) Anschließend erfolgte Einstellung auf originären pH und Zentrifugation. Überstände und Sedimente (CM) wurden untersucht.

Ergebnisse:

Teilchengrößenverteilung:

- In den mit 5'-UMP behandelten und in den 0-Proben wurden übliche Größenverteilungen bestimmt. Nur Probe 2 (Umsetzung mit 5'-UMP bei Absenkung des originären pH um 0,2) weicht deutlich von den übrigen Proben ab.

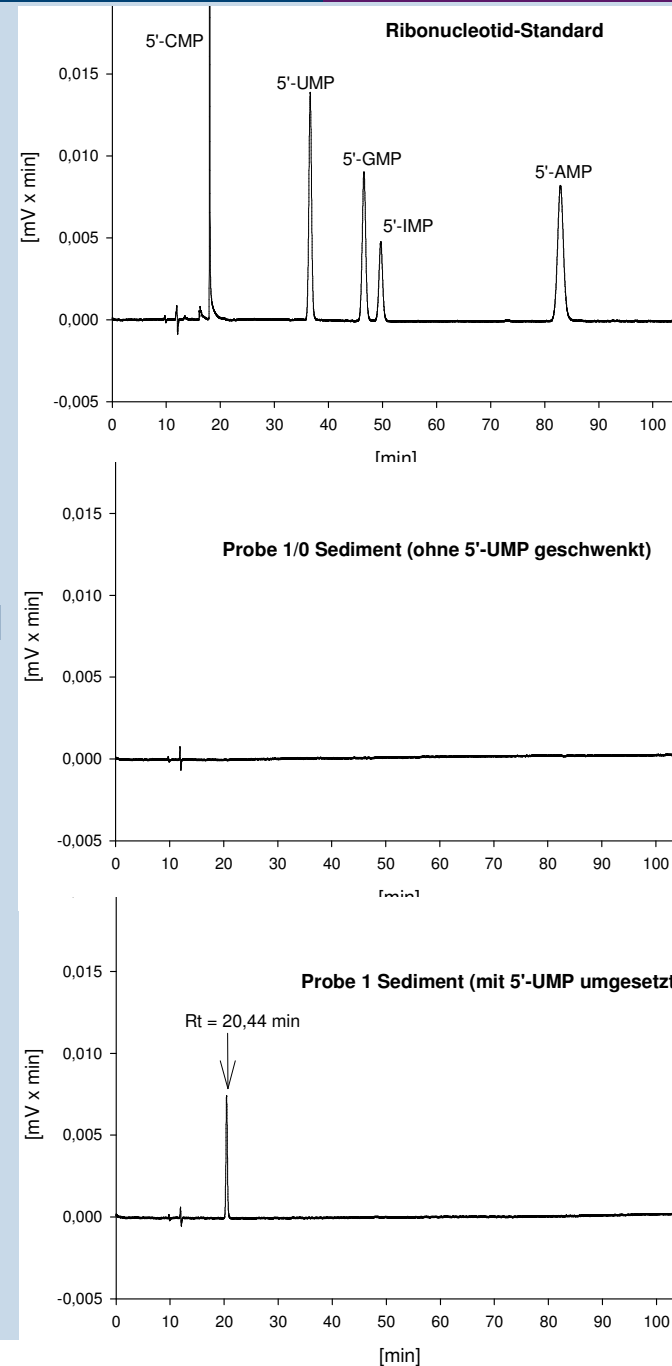


Probe 1: Umsetzung bei nativem pH; Probe 2: Nativer pH minus 0,2; Probe 3: nativer pH minus 0,6.

Probe x0: Nullprobe, d. h. CM wurden ohne Substrat 1h bei Raumtemp. bei entsprechendem pH geschwenkt

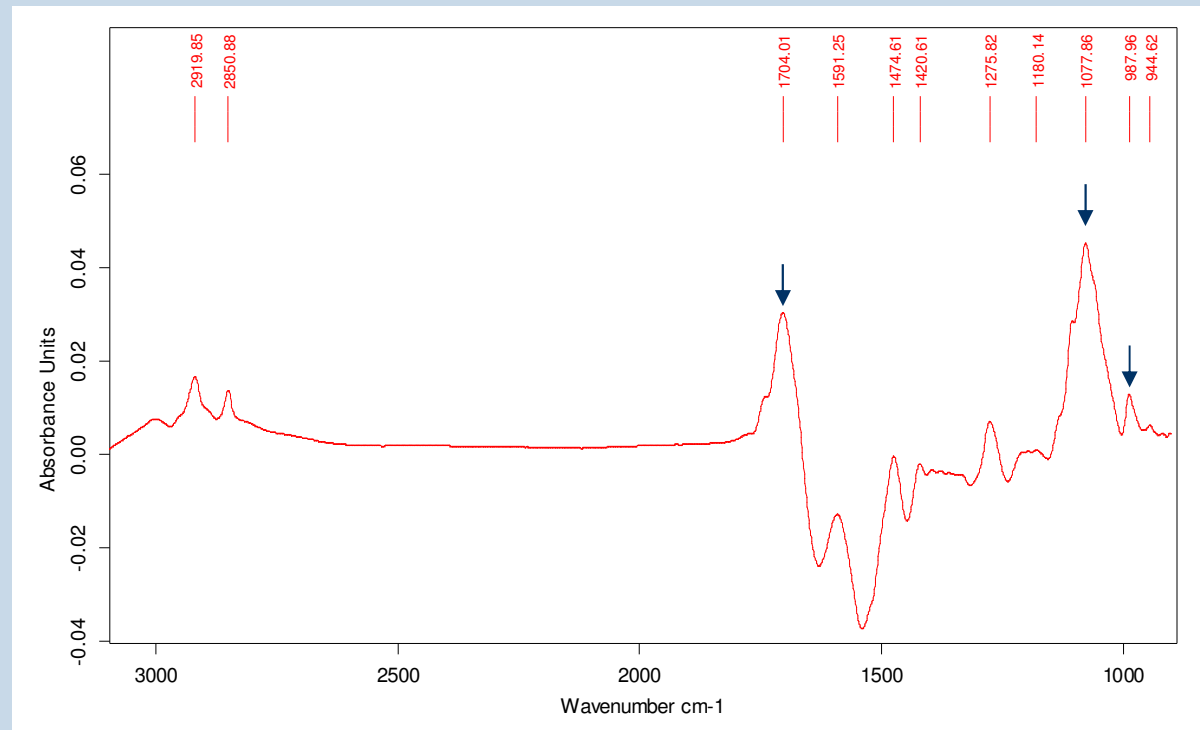
Ribonucleotid-HPLC:

- In den 0-Proben (d. h. 1 stdg. Schwenken ohne 5'-UMP) wurden bei einer Messwellenlänge von 260 nm keine Substanzpeaks detektiert.
- Bei Umsetzung von CM mit 5'-UMP wurde bei $R_t = 20,4$ min eine Substanz detektiert, die zwar früher von der RP-Phase eluiert wird als 5'-UMP (s. Standard-Chromatogramm), jedoch ein identisches UV-Spektrum zeigt wie das angewendete 5'-UMP. Dieser Peak wurde auch in den mit abgesenktem pH mit 5'-UMP versetzten Proben gefunden. Vermutlich wird an CM gebundenes 5'-UMP detektiert.



FT-IR- Spektroskopie:

FT-IR-Differenzspektrum
(Probe 3 minus Probe 3
Nullprobe)

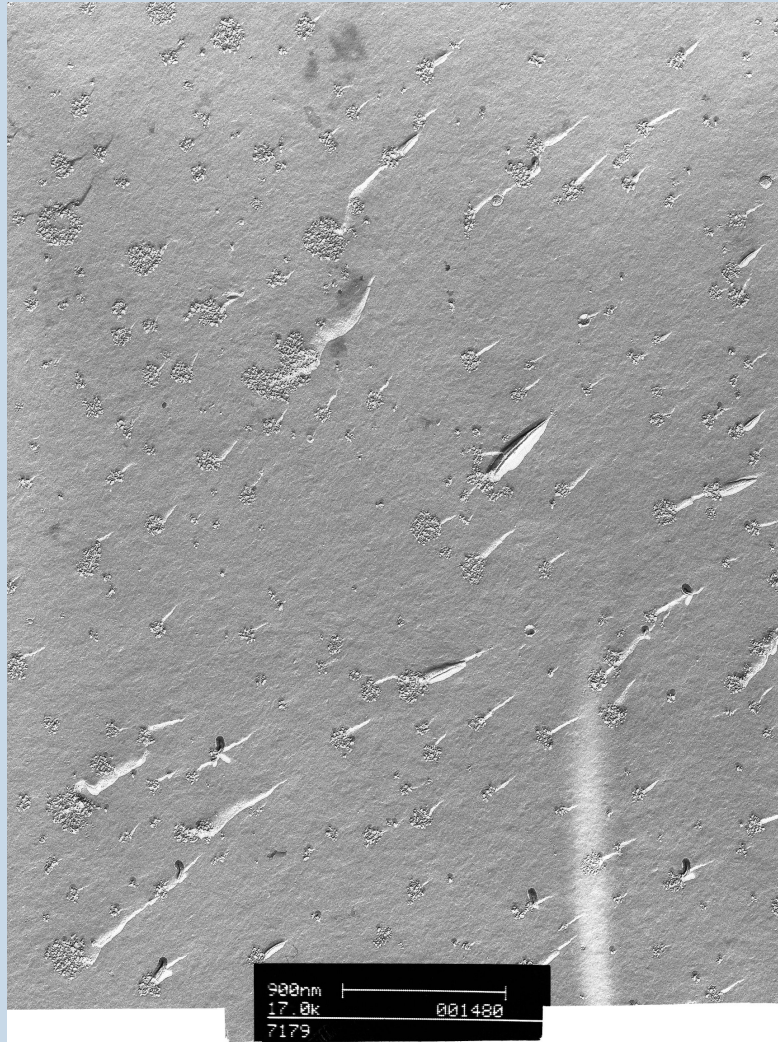


Die im Differenzspektrum aufgeführten Signale bei 1704, 1078 und 988 1/cm weisen auf die Anwesenheit von 5'-UMP im gewaschenen CM-Sediment hin.

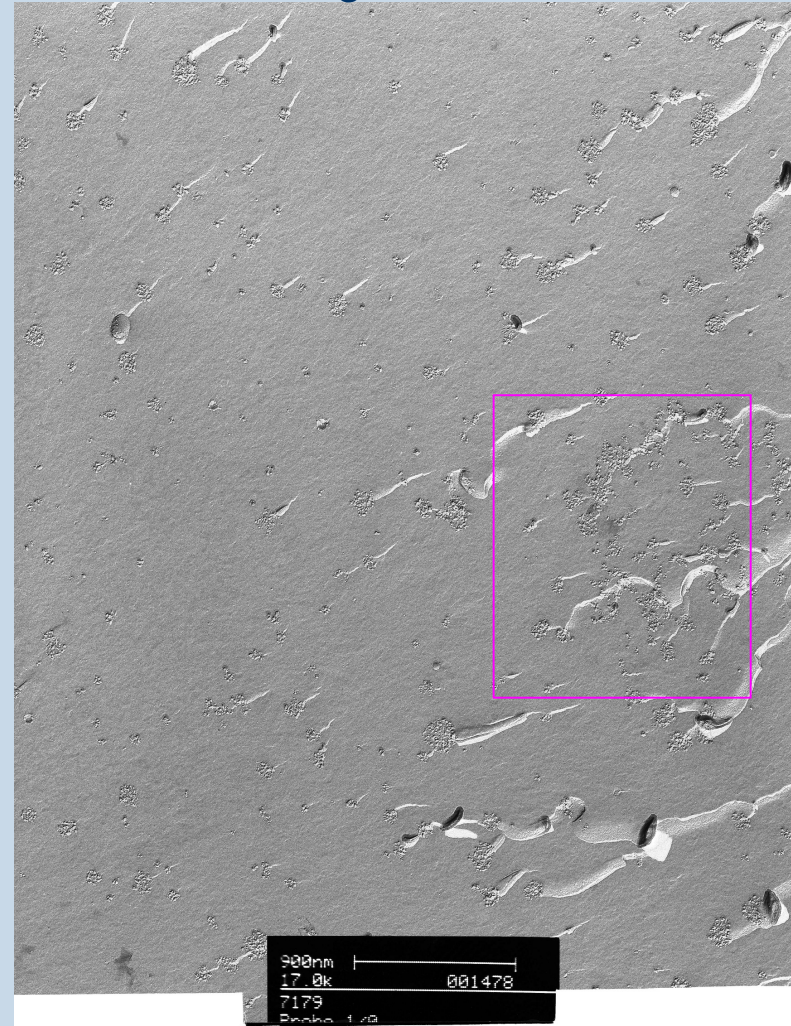
- ▶ Nach derzeitigem Kenntnisstand wird 5'-UMP an native, nanopartikuläre CM gebunden.

Transmissionselektronenmikroskopie:

0-Probe



mit 5'-UMP umgesetzte Probe



In beiden Proben sind die CM zu erkennen, wobei in der mit 5'-UMP umgesetzten Probe geringfügige Aggregation zu erkennen ist.

Umsetzung nativer CM mit Uridin-5'-monophosphat (5'-UMP) und β -Carotin mit anschließender Erhitzung auf 73 °C:

- Hierbei wurden CM mit Milchsäurelösung (MSL) im Verhältnis 1:1 (v:v) verdünnt.
- CM wurden bei nativem pH mit 5'-UMP bzw. mit ethanolischer β -Carotin-Lsg. umgesetzt (1 h Schwenken bei Raumtemp.) Anschließend erfolgte Zentrifugation und Waschen der Sedimente mit MSL. Überstände und Sedimente (CM) wurden untersucht.
- Für die Untersuchungen wurden thermisch unbehandelte sowie thermisch behandelte CM (Erhitzung nach Beladung auf 73 °C) verwendet.

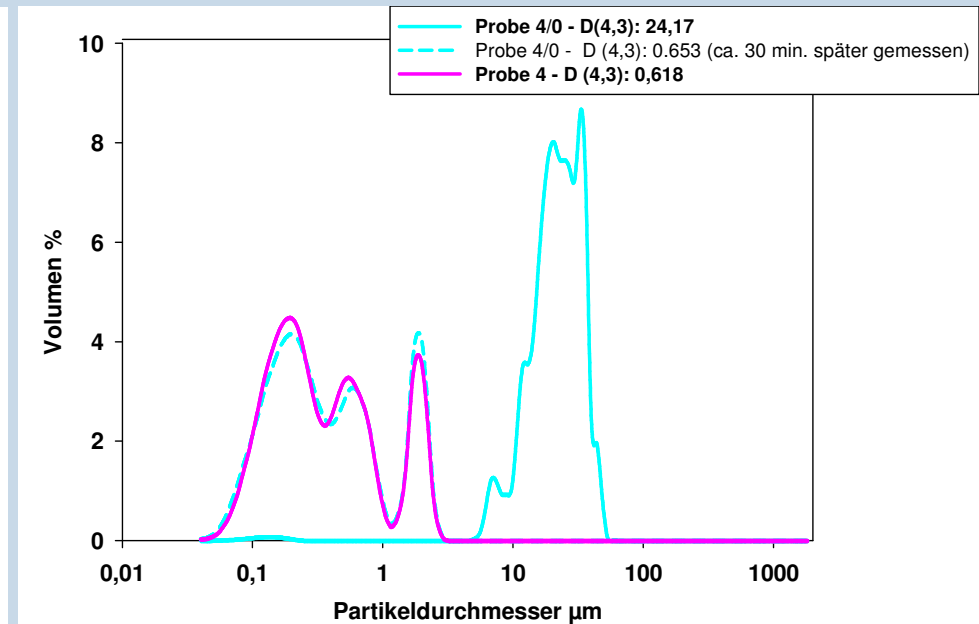
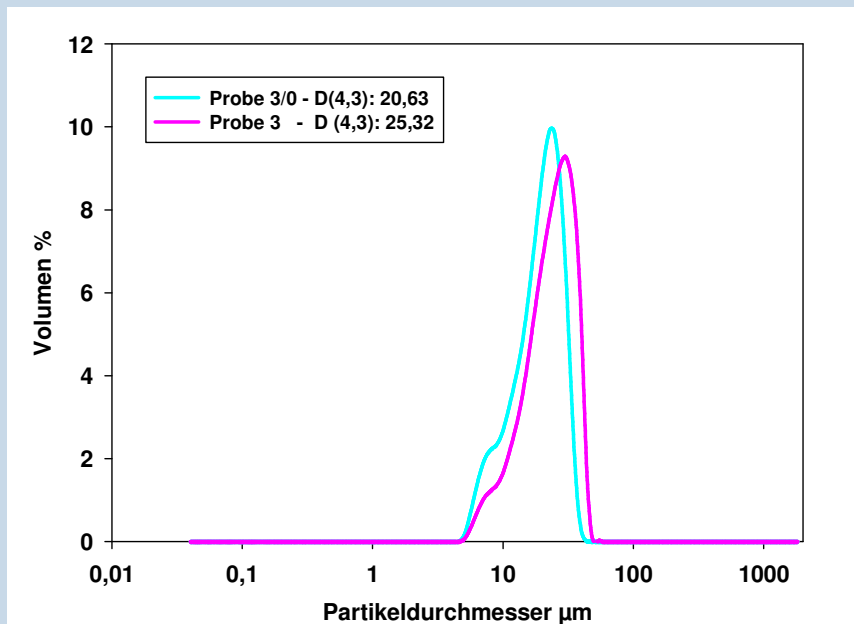
Ergebnis:

- In den Proben wurde 5'-UMP nachgewiesen, Substanz $R_t = 21,1$ min zeigt jedoch größere Peakflächen als 5'-UMP
- Sedimentproben: 5'-UMP wird durch Behandlung mit MSL eher ausgewaschen als Substanz $R_t = 21,1$ min.
- Unterschied zu Vorversuchen: Auch in thermisch unbehandelten Proben ist 5'-UMP nachweisbar -> Einfluss der Verdünnung mit MSL

Umsetzung nativer CM mit ethanolischer β -Carotin-Lsg.:

Teilchengrößenverteilung:

- In den mit 2 ml EtOH (/0-Proben) bzw. ethanolischer β -Carotin-Lsg. behandelten Proben wurden größere Partikeldurchmesser bestimmt als bei den Umsetzungen mit wässrigen 5'-UMP-Lösungen.
- Vermutlich bewirkt die EtOH-Zugabe die Zunahme der Partikeldurchmesser.

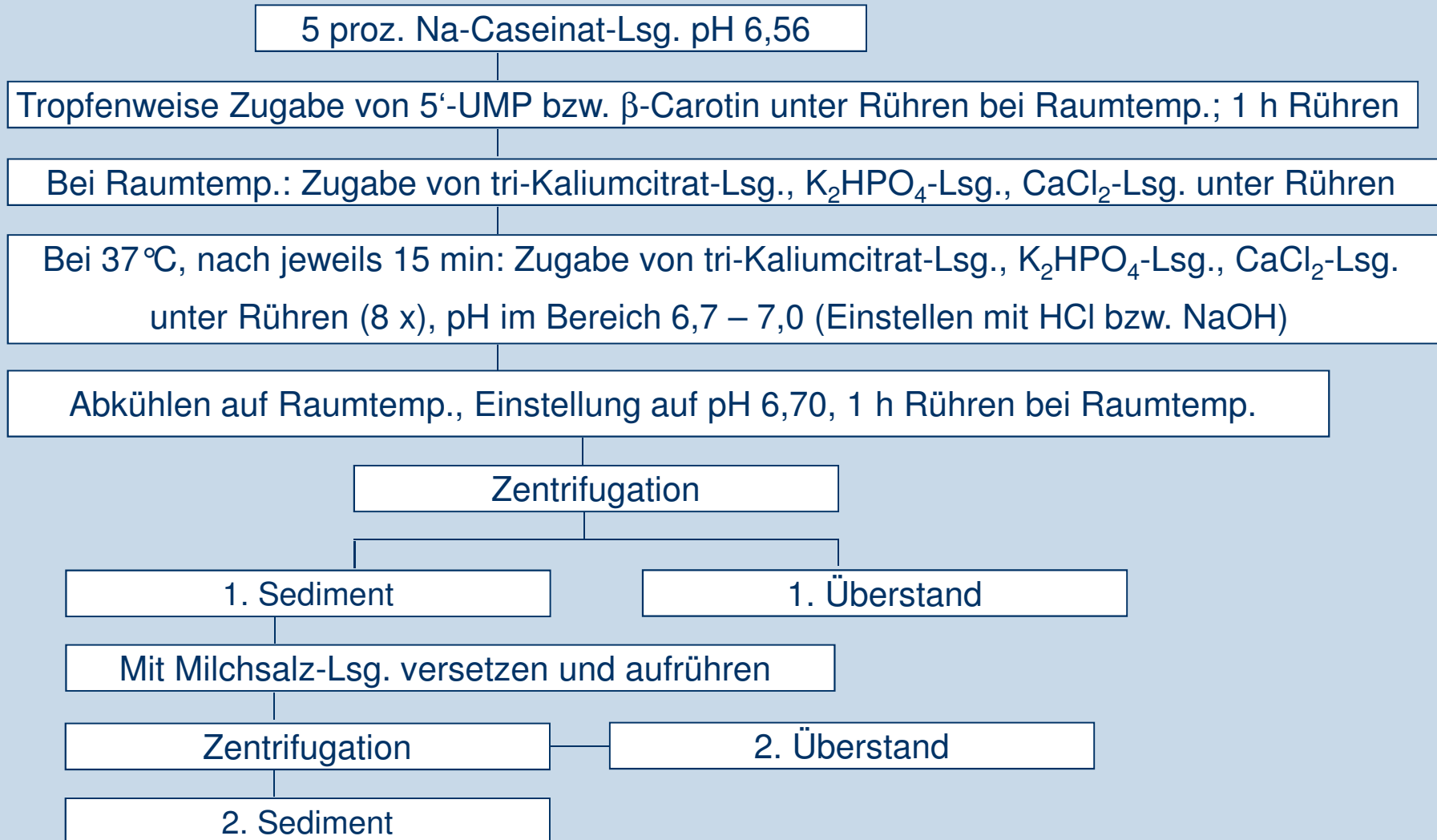


Probe 3: CM nativer pH + ethanolischer β -Carotin-Lsg.;

Probe 4: CM nativer pH + ethanolischer β -Carotin-Lsg., danach Erhitzen auf 73 °C.

- Photometrisch konnte β -Carotin in den Gesamtproben und in den Überständen nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Sedimentproben.

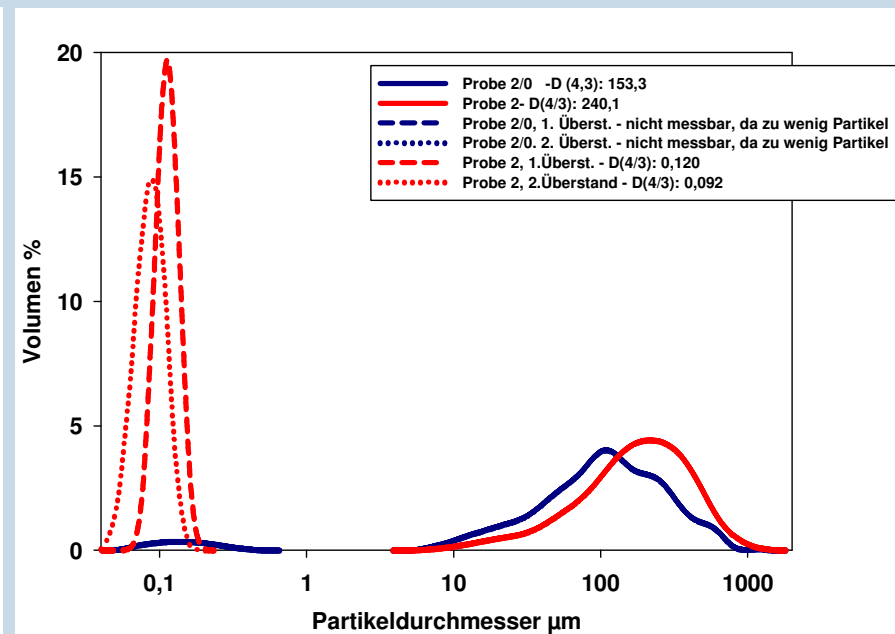
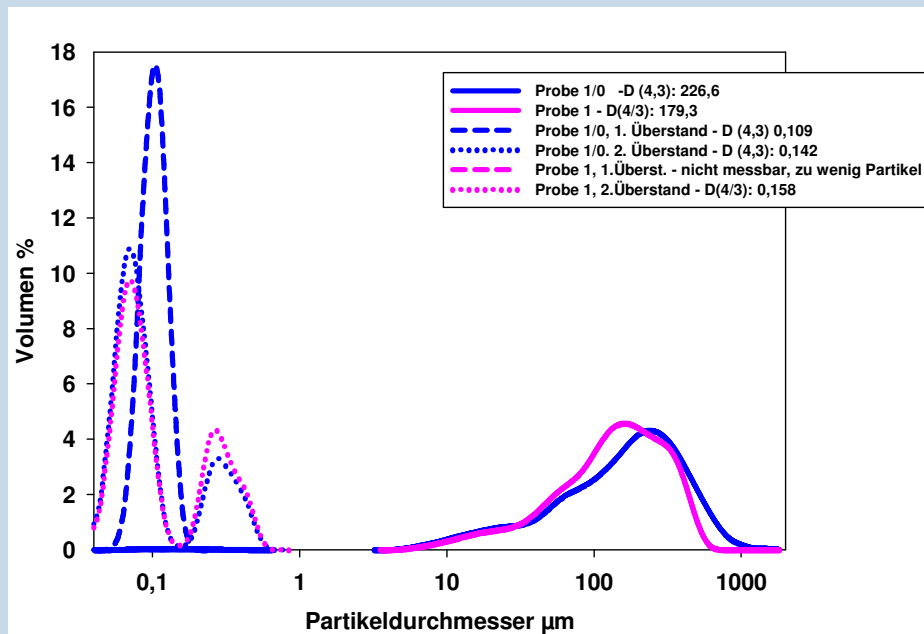
Herstellung artifizierlicher Casein-Micellen aus Na-Caseinat (nach Semo et al., 2007), Umsetzung mit 5'-UMP und β -Carotin



Ergebnisse:

Teilchengrößenverteilung:

- In den untersuchten Proben (Gesamtproben und Überstände) wurden Partikel mit Durchmessern im Bereich 0,1 μm sowie wesentlich größere Partikel bestimmt.
- Sedimentproben konnten nicht untersucht werden.



Probe 1: 100 ml Na-Caseinat-Lsg. nativer pH + 5ml Na₂-5'-UMP-Lsg. (10 mmol/10 ml)

Probe 2: 100 ml Na-Caseinat-Lsg. nativer pH + 10ml β -Carotin-Lsg. (3,958 μmol /10 ml EtOH).

Ribonucleotid-HPLC:

- Bei Umsetzung von Na-Caseinat mit 5'-UMP wurden nur bei $R_t = 40,4$ min (5'-UMP) Substanzpeaks in den Überständen und Sedimenten detektiert, nicht bei 20,1 min. Im 1. Sediment wurden ca. 6 mg/g Sediment, im 2. Sediment ca. 3 mg/g Sediment nachgewiesen.

Photometrischer Nachweis von β -Carotin:

- Gesamtprobe und 1. Überstand wurden 2 x mit n-Hexan ausgeschüttelt, zentrifugiert und die Hexan-Phase photometrisch bei 453 nm untersucht.
- Probe 2 (Gesamtprobe): 0,23 $\mu\text{g/ml}$
- Probe 2, 1. Überstand: 0,09 $\mu\text{g/ml}$

Sedimentproben:

- Die Sedimentproben wurden mit 100 mmol/l EDTA-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte mehrfache Extraktion mit n-Hexan/EtOH 1:1 (v:v)
- Die photometrischen Bestimmungen bei 453 nm ergaben 0,02 $\mu\text{g/mg}$ Sediment.
- Mittels FT-IR konnte β -Carotin nicht nachgewiesen werden.

Aktuelle Untersuchungen:

Umsetzung von β -Carotin mit Magermilch bzw. mit rekonstituierter Magermilch unter Kühlbedingungen bei nativem pH und bei abgesenktem pH:

- Bei der Umsetzung von Magermilch wurden bei nativem pH $5,25 \pm 0,43 \mu\text{g/g}$ und bei abgesenktem pH $27,72 \pm 4,78 \mu\text{g/g}$ β -Carotin im CM-Sediment bestimmt, bei der Umsetzung rekonstituierter Magermilch $8,79 \pm 0,35 \mu\text{g/g}$ (nativer pH) bzw. $44,72 \pm 1,34 \mu\text{g/g}$ (abgesenkter pH).
- Im direkten Vergleich wurde damit ersichtlich, dass die pH-Absenkung einen wesentlichen Einfluss auf die Anlagerung von β -Carotin an CM ausübt.
- Die Partikeldurchmesser sind jedoch unterschiedlich: Nach Umsetzung bei nativem pH lagen die Durchmesser bei $0,1 \mu\text{m}$, wohingegen nach Umsetzung bei abgesenktem pH Partikeldurchmesser im Bereich $10 - 100 \mu\text{m}$ gefunden wurden.

Zusammenfassung

- Die Ergebnisse der vorlaufenden Versuche haben gezeigt, dass sich natürliche CM bei Raumtemperatur nur bedingt mit hydrophilen/hydrophoben Substanzen beladen lassen.
- Auch bei den artifiziellen CM ist 5'-UMP relativ leicht auswaschbar, die Menge an eingelagertem β -Carotin kann vermutlich noch verbessert werden.

Aktuelle Untersuchungen:

- Umsetzung von β -Carotin mit gekühlter Magermilch und mit rekonstituierter Magermilch bei nativem und bei abgesenktem pH:
 - durch Absenkung des pH wird mehr β -Carotin an CM gebunden, jedoch erfolgt auch eine Erhöhung der Teilchengröße.

Vielen Dank für die technische Unterstützung:
Kerstin Hansen, Ernst Johannsen, Longina Reimann, Sabine Splitzer,
Angelika Thoß, Cornelia Voss.

Vielen Dank für ihre Aufmerksamkeit