

Abschlussbericht

zum Thema

Einfluss von Prozessparametern auf die rekristallisations- hemmende Wirkung von Antigefrierproteinen

MBFSt-Kennziffer: 3400

Andreas Leiter, Volker Gaukel

Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich I:
Lebensmittelverfahrenstechnik,

Antragsteller und Kontaktperson:

Dr. rer. nat. Dipl.-Ing. Volker Gaukel

Email: volker.gaukel@kit.edu

Tel: +49 (0)721 608-43612

Fax: +49 (0)721 608-45967

Postanschrift: Kaiserstr. 12

76131 Karlsruhe

Karlsruhe, Juli 2015

1. Einleitung

Die Qualität von gefrorenen Lebensmitteln wird stark durch Rekristallisationsprozesse und die damit verbundene Vergrößerung der Eiskristalle während der Lagerung bestimmt. Rekristallisationsprozesse können zu Schäden an Produktstrukturen führen, was beispielsweise beim Auftauen gefrorener Früchte in einem erhöhten Tropfsaftverlust resultiert [1]. In Eiskrem z. B. werden große Eiskristalle von Konsumenten als negativ empfunden, weshalb Möglichkeiten zur Verlangsamung bzw. Hemmung der Rekristallisation nicht nur wissenschaftlich sondern auch wirtschaftlich von Interesse sind. Zur Rekristallisationshemmung werden in Eiskrem üblicherweise Hydrokolloide eingesetzt, wobei auch Antifrierproteine (AFP) eine sehr potente Alternative sein können [2].

Antifrierproteine wurden ursprünglich aus antarktischen Fischen isoliert [3, 4] und weisen zwei besondere Effekte auf. Zum einen senken sie den Gefrierpunkt (Hysterese-Gefrierpunkt) 200- 500-mal stärker als aufgrund ihrer kolligativen Eigenschaft zu erwarten wäre, wobei der Schmelzpunkt der Lösung nahezu unverändert bleibt. Innerhalb des Temperaturbereichs zwischen Schmelz- und Hysterese-Gefrierpunkt (Thermale Hysterese) verhindern Antifrierproteine das Wachstum von Eiskristallen. Zum anderen weisen die Proteine schon bei sehr geringen Konzentrationen eine rekristallisationshemmende Wirkung (RI-Aktivität) an Eiskristallen auf, wobei der genaue rekristallisationshemmende Wirkungsmechanismus bisher noch nicht vollständig verstanden ist [5, 6]. Erste industriell hergestellte Eiskremsorten mit AFP wurden auf den Markt gebracht. Bisher wurde allerdings nur wenig über den Einfluss von Prozessparametern, sowie Milieubedingungen auf die rekristallisationshemmende Wirkung der AFP publiziert.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeiten, den Einfluss verschiedener Prozessparameter wie Temperatur, Druck und Scherung aber auch den in Lebensmitteln wichtigen Einfluss des pH-Werts auf die rekristallisationshemmende Wirkung der Antifrierproteine zu untersuchen. Zusätzlich wurde in Kooperation mit dem Institut für organische Chemie am KIT die Veränderung der Proteinstruktur durch die verschiedenen Parameter mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Dies sollte zusätzliche Erkenntnisse über den Einfluss einer gegebenenfalls veränderten Proteinstruktur auf die Eisrekristallisation liefern.

2. Material und Methoden

Für alle Rekristallisationsversuche wurde eine 49 %-ige Saccharoselösung mit einer Antifrierprotein Typ III Konzentration von 2 µg/ml hergestellt. Das Protein wurde von der Firma A/F Protein Inc. (Waltham/USA) gekauft. Je nach untersuchtem Einflussparameter wurde die Lösung mit unterschiedlichen Temperaturen (40, 60 und 80 °C) und Drücken vorbehandelt. Für die Temperaturvorbehandlung wurden 800 µl der Lösung in verschlossene Gewindgläser in einem Wasserbad (Thermo Haake B7) für unterschiedliche Zeiten (zwischen 1 und 30 min) erwärmt. Zur Druckvorbehandlung wurde die AFP III Lösung in einen mit Gummistopfen verschlossenen Teflonschlauch gegeben. Dieser wurde dann in einem mit Glykol-Wasser-Gemisch gefüllten Autoklaven einem Druck von 300, 2000 und 4000 bar für unterschiedliche Zeiten (zwischen 1 min und 1 h) ausgesetzt. Außerdem wurden die Lösungen in einem Rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar) Scherraten von 1500 s⁻¹ und 9000 s⁻¹ ausgesetzt. Weiterhin wurden verschiedene pH-Werte mittels Salzsäure oder Natronlauge eingestellt (pH 1, 7, 11 und 13). Danach wurden die Lösungen jeweils zwischen zwei Deckgläsern auf einen Objektträger pipettiert, mit einem weiteren Deckglas verschlossen und mit Silikon abgedichtet. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -12 °C für eine Woche gelagert. Innerhalb der Lagerzeit wurden zu bestimmten Zeitpunkten Bilder der Eiskristalle aufgenommen und diese anschließend manuell mit der Software Image Pro Plus 5.0 ausgewertet. Aus mindestens 300 Eiskristallen pro Objektträger und mindestens zwei Objektträgern pro Zeitpunkt wurde ein mittlerer flächenäquivalenter Kreisdurchmesser der Eiskristalle berechnet.

Die ¹H-NMR Spektroskopiemessungen wurden mit einem TBI Probenkopf an dem NMR-Spektrometer Avance 600 von Bruker durchgeführt. Aufgrund des starken Saccharosesignals

wurde für die Spektroskopiemessungen das Protein ohne Saccharose mit einer finalen Konzentration von 0,18 mg/ml (0,09 mg/ml) in 450 µl demineralisiertem Wasser (pH-Wert Lösung) und 50 µl Deuterium gelöst. Die untersuchte Lösung wurde ebenfalls mit Druck vorbehandelt und der pH-Wert eingestellt. Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Proteinstrukturänderung konnte die Temperatur im NMR-Spektrometer eingestellt und das Spektrum direkt aufgenommen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Veränderungen der Proteinstruktur

Der Druckeinfluss wurde nach Belastung bei 4000 bar für 1, 5 und 60 min sowie bei 300 bar für 5 min untersucht. Dabei ergab sich keine Änderung der Proteinstruktur von AFP III. Allerdings wurde eine geringfügige Verunreinigung der Proben durch Glykol festgestellt, das als Druckübertragungsmedium verwendet wurde und offenbar bei der Versuchsdurchführung in die Probenbehälter eindringen konnte. Um die Hitzestabilität des AFP III zu testen wurden die Lösungen für 2, 30 und 60 min auf 80 °C im NMR-Spektrometer gehalten. Dabei wurde festgestellt, dass es schon nach 2 min bei 80 °C zu einer Veränderung der Proteinstruktur kommt. Jedoch handelt es sich um eine reversible Denaturierung, da das Protein nach der Abkühlung auf Raumtemperatur unabhängig von der Dauer der Temperaturbehandlung in seine Ausgangsstruktur zurückgeht. Die pH-Wert-Sensitivität wurde bei pH 1, 7, 11 und 13 überprüft. Dabei wurde nur bei einem pH von 13 eine leichte Änderung der Proteinstruktur beobachtet.

Rekristallisationsverhalten

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse zum Einfluss der Temperaturvorbehandlung auf die Rekristallisation. Zunächst ist im Vergleich zur reinen Saccharoselösung zu erkennen, dass, wie erwartet, durch die Zugabe von AFP die Rekristallisation deutlich gehemmt wird. Vorbehandlungstemperaturen bis 80 °C hatten bei einer Dauer von einer Minute keine Auswirkung auf die rekristallisationshemmende Wirkung der AFP. Im Gegensatz hierzu zeigte eine Behandlung mit einer Temperatur von 80 °C über 30 min eine geringe Verschlechterung der rekristallisationshemmenden Wirkung. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie, die gezeigt haben, dass eine Hitzeeinwirkung bis zu 60 min bei 80 °C lediglich eine reversible Denaturierung von AFP III verursacht. Die Kinetik der Rückfaltung kann dabei als Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Temperaturvorbehandlung bei der NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung stattfinden musste und nicht wie in den Rekristallisationsversuchen in 49 %-iger Saccharoselösung. Die Saccharose könnte einen Einfluss auf die Denaturierung des AFP III haben.

Bei der Untersuchung des pH-Wert Einflusses zeigte sich, dass unabhängig von den eingestellten pH-Werten die rekristallisationshemmende Wirkung der Antifrierproteine immer verbessert wurde (s. Abbildung 2). Weitere Untersuchungen dazu haben ergeben, dass nicht der pH-Wert an sich, sondern die zusätzlich in der Lösung vorhandenen Ionen die rekristallisationshemmende Wirkung der Proteine verbessert haben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die rekristallisationshemmende Wirkung mit steigender Salzkonzentration bis zu einem Grenzwert zunimmt.

Die Untersuchungen zum Druckeinfluss haben ergeben, dass bei der 1 minütigen Druckbehandlung bei keinem der untersuchten Drücke eine Veränderung der rekristallisationshemmenden Wirkung auftrat. Lediglich nach 60 min Druckbehandlung bei 4000 bar wurde eine Verbesserung der rekristallisationshemmenden Wirkung beobachtet. Eine Proteinstrukturveränderung konnte bei diesen Bedingungen nicht festgestellt werden. Allerdings ergaben die NMR Untersuchungen wie oben erwähnt eine Verunreinigung der Proben durch Glykol. Es wird daher davon ausgegangen, dass die festgestellte Änderung im Rekristallisationsverhalten auf diese Verunreinigung zurückzuführen ist.

Versuche bei Scherraten von 1500 s⁻¹ und 9000 s⁻¹ und einer Behandlungszeit von 5 min zeigten keine Veränderung der rekristallisationshemmenden Wirkung im Vergleich zu den unbehandelten Antifrierproteinlösungen.

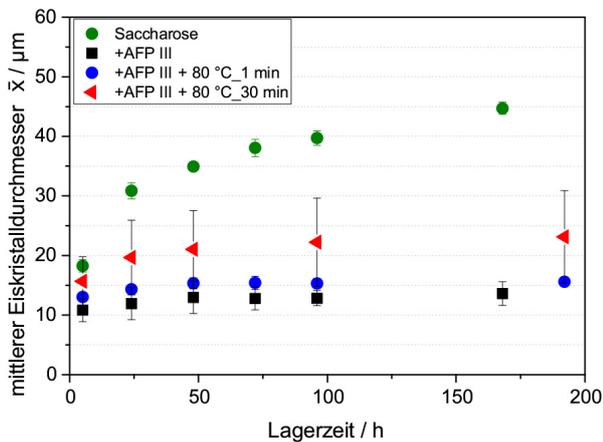


Abbildung 1: Einfluss der thermischen Behandlung auf die RI-Aktivität von AFP III bei einer Lagertemperatur von -12 °C

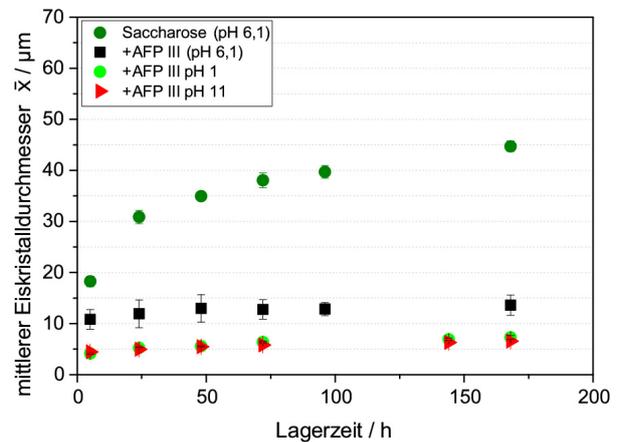


Abbildung 2: Einfluss des pH-Werts auf die rekristallisationshemmende Wirkung von AFP III bei einer Lagertemperatur von -12 °C

4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen deutlich, dass das Protein AFP III und dessen rekristallisationshemmende Wirkung in weiten Bereichen von Prozessparametern und pH-Werten stabil sind und sich somit sehr gut für den industriellen Einsatz eignen. Es konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Druckbereiche und Scherraten keinen Einfluss auf die rekristallisationshemmende Wirkung haben. Bei der Untersuchung des Temperatureinflusses zeigte eine Behandlung mit einer Temperatur von 80 °C über 30 min eine geringe Verschlechterung der rekristallisationshemmenden Wirkung, wohingegen kürzere Behandlungszeiten bei einer Minute keine Veränderung der Wirkung aufzeigte. Unabhängig von dem eingestellten pH-Wert (1, 7, 11) wurde eine verbesserte Wirkung beobachtet, was auf die Ionen in der Lösung zurückzuführen war. Für die technische Eignung für den Einsatz in Lebensmitteln bleibt daher im Wesentlichen die Frage offen, wie die Proteine mit anderen Inhaltsstoffen wechselwirken und inwieweit die rekristallisationshemmende Wirkung durch die Formulierung beeinflusst wird.

Veröffentlichungen verschiedener Teilaspekte dieser Arbeit:

- Vortrag bei dem Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Agglomerations- und Schüttguttechnik, Lebensmittelverfahrenstechnik mit Lebensmittelbiotechnologie, Grenzflächenbestimmte Systeme und Prozesse, Magdeburg, 16.- 18. März 2015, *Einfluss von Prozessparametern und Milieubedingungen auf die Struktur und rekristallisationshemmende Wirkung von Fisch Antifrierprotein*
- Posterveröffentlichung bei der 2nd Ice-Binding Protein Conference, Sapporo/Japan, 04.- 07. August 2014: *Influence of temperature and pH value on the recrystallization inhibition activity of fish ice structuring protein*
- **geplant Ende 2015:** Veröffentlichung in *der Chemie Ingenieur Technik oder Chemical Engineering & Technology*

Literatur

- 1 Petzold G, Aguilera JM. Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods. Food Biophysics 2009; 4 (4): 378–396; DOI: 10.1007/s11483-009-9136-5
- 2 Marshall RT, Goff HD, Hartel RW. Ice cream. 6. Aufl. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003
- 3 Scholander PF, Flagg W, Hock RJ et al. Studies on the physiology of frozen plants and animals in the arctic. J. Cell. Comp. Physiol. 1953; 42 (S1): 1–56; DOI: 10.1002/jcp.1030420403
- 4 DeVries AL, Wohlschlag DE. Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes. Science 1969; 163 (3871): p 1073-1075
- 5 Davies PL. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. Trends Biochem. Sci. 2014; 39 (11): 548–555; DOI: 10.1016/j.tibs.2014.09.005
- 6 Venketesh S, Dayananda C. Properties, Potentials, and Prospects of Antifreeze Proteins. Critical Reviews in Biotechnology 2008; 28 (1): 57–82; DOI: 10.1080/07388550801891152