



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

HPLC-Analytik von nativem Beta-Lactoglobulin als Erhitzungsindikator in ESL-Milch

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Eva-Maria Reiterer
Matrikel-Nummer:	0201420
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften (A474)
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Helmut Mayer Universität für Bodenkultur Wien Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie Abteilung für Lebensmittelchemie

Wien, im Septemer 2009

Danksagung

An dieser Stelle ist es mir ein großes Anliegen mich bei jenen Personen zu bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Helmut Mayer, der mir die Arbeit an der Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie, Abteilung für Lebensmittelchemie, ermöglicht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für seine Unterstützung bedanken.

Eine weitere Person, welcher ich meinen Dank aussprechen möchte, ist Iris Biedermann, die mir bei jeglicher Art von Komplikationen immer mit einem guten Rat zur Seite stand.

Schlussendlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Hildegard und Franz sowie meinem Freund Jimmy bedanken, die mir während meiner gesamten Studienzeit mit voller Kraft und Liebe zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	2
2.1. Zusammensetzung und Inhaltsstoffe der Kuhmilch	2
2.1.1. β -Lactoglobulin	2
2.1.1.1. Definition und Vorkommen	2
2.1.1.2. Aminosäuren	3
2.1.1.3. Struktureller Aufbau	3
2.1.1.4. Biologische Bedeutungen	5
2.1.1.5. Intoleranz gegenüber Kuhmilchproteinen	5
2.1.2. α -Lactalbumin	6
2.1.3. Weitere Molkenproteine	7
2.1.4. Caseine	8
2.1.5. Lipide	8
2.1.6. Kohlenhydrate	9
2.1.7. Minore Milchkomponenten	10
2.2. Extended-Shelf-Life Milch (ESL-Milch)	11
2.2.1. Erhitzungsverfahren - Allgemein	12
2.2.1.1. Pasteurisation	13
2.2.1.2. Ultrahocherhitzung	13
2.2.2. Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch	14
2.2.2.1. Hoherhitzung	14
2.2.2.2. Bactofugation	14
2.2.2.3. Mikrofiltration	15
2.2.3. Hitzeindikatoren	17
2.2.4. Erhitzung und Molkenproteine	18
2.2.5. Lagerung von ESL-Milch	20
2.3. Verfahren zum Nachweis des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch - Überblick	21

2.3.1. High performance liquid chromatography (HPLC)	21
2.3.2. Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC).....	22
2.3.3. Native und Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel- elektrophorese (Native und SDS-PAGE)	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milchen mittels RP-HPLC	25
3.1.1. Herstellung der Standards für die Kalibration	25
3.1.2. Probenaufbereitung	28
3.1.3. Chromatographische Methode.....	31
3.1.3.1. Gradientensysteme	33
3.1.3.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin	35
3.1.3.3. Ermittlung der Reproduzierbarkeit.....	35
3.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin mittels Nativer Polyacrylamidgelelektrophorese.....	36
3.2.1. Milchproben	36
3.2.2. Probenaufbereitung	36
3.2.3. Gelgießstand	38
3.2.4. Herstellung der Gele	39
3.2.4.1. Trenngel	39
3.2.4.2. Sammelgel	41
3.2.5. Auftragung und Elektrophoretische Auftrennung	43
3.2.6. Färben, Entfärben und Scannen.....	45
3.3. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin mittels Sodium- Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
3.3.1. Milchproben und Probenaufbereitung.....	47
3.3.2. Herstellung der Gele	49
3.3.2.1. Trenngel	49
3.3.2.2. Sammelgel	52
3.3.3. Auftragung und Elektrophoretische Auftrennung	54

3.3.4. Färben, Entfärben und Scannen	55
4. Ergebnisse	57
4.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels RP-HPLC	57
4.1.1. Kalibration	57
4.1.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin	60
4.1.3. Reproduktionsermittlung	66
4.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels Nativer und Natrium-Dodecyl-Sulfat-PAGE	68
5. Diskussion	71
5.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels RP-HPLC	71
5.1.1. Chromatographisches System und Probenaufbereitung	71
5.1.2. β -Lactoglobulingehalt in Kuhmilch	72
5.1.2.1. β -Lactoglobulingehalt der Rohmilchproben	73
5.1.2.2. β -Lactoglobulingehalt der pasteurisierten Milchproben	73
5.1.2.3. β -Lactoglobulingehalt der ESL-Milchproben	74
5.1.2.4. β -Lactoglobulingehalt der UHT-Milchproben	76
5.1.3. Reproduktionsüberprüfung	76
5.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milchen mittels Nativer und SDS-PAGE	77
6. Schlussbetrachtung	79
7. Zusammenfassung	81
8. Literaturverzeichnis	83

Tabellenverzeichnis

Tab.2.1.1: Aminosäuresequenz des bovinen β -Lactoglobulins B inklusive genetische Abarten (modifiziert nach SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999; BELITZ et al., 2001).....	4
Tab.2.2.1: Richtparameter für die Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch (DYCK, 1999)	12
Tab.2.2.2: Mindestgehalt des nativem β -Lactoglobulins [mg/L] bei unterschiedlichen Erhitzungsverfahren (CLAEYS et al., 2004; DYCK, 1999; GALLMANN et al., 2001)	18
Tab.3.1.1: Verdünnungsschema der Molkenprotein-Kalibrationsstandardlösungen	27
Tab.3.1.2. Rohmilchproben.....	29
Tab.3.1.3. Pasteurisierte Milchproben	29
Tab.3.1.4: Extended-shelf-life Milchproben.....	30
Tab.3.1.5.: UHT-Milchproben.....	31
Tab.3.1.6: Startgradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin	33
Tab.3.1.7: Probengradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin	34

Tab.3.1.8: Endgradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin	34
Tab.3.2.1: Native PAGE – Trenngelherstellung für 2 Gele (12,5 %)	40
Tab.3.2.2: Native PAGE – Sammelgelherstellung für 2 Gele mit pH 7,2 (12,5 %)	42
Tab.3.3.1: SDS-PAGE – Trenngelherstellung für 2 Gele (15 %)	51
Tab.3.3.2: SDS-PAGE – Sammelgelherstellung für 2 Gele (15 %)	53
Tab.4.1.1: β -Lactoglobulin-Kalibrationswerte	57
Tab.4.1.2: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Rohmilchen	60
Tab.4.1.3: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in pasteurisierten Milchen	61
Tab.4.1.4.: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Extended-shelf-life Milchen	62
Tab.4.1.5: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in UHT-Milchen	62
Tab.4.1.6: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Milbona bei einmaliger Aufarbeitung und sechsfacher Injektion	66
Tab.4.1.7: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei Milbona	66

Tab.4.1.8: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Himmeltau Kinder-Vollmilch bei dreimaliger Aufarbeitung und jeweiliger Doppelinjektion	67
Tab.4.1.9: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei Himmeltau Kinder-Vollmilch	67
Tab.4.1.10: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in NÖM Fasten bei dreimaliger Aufarbeitung und jeweiliger Doppelinjektion.....	67
Tab.4.1.11: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei NÖM Fasten.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abb.2.2.2: Schematische Darstellung des Verfahrensablaufes zur Herstellung von ESL-Milch (modifiziert nach BRUCH und PELLEGRINO, 2006).....	16
Abb.4.1.1: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe III (α -Lactalbumingehalt: 400 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 800 mg/L).....	58
Abb.4.1.2: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe IV (α -Lactalbumingehalt: 800 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 1600 mg/L).....	58
Abb.4.1.3: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe V (α -Lactalbumingehalt: 1200 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 2400 mg/L).....	59
Abb.4.1.4: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe VI (α -Lactalbumingehalt: 1600 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 3200 mg/L).....	59
Abb.4.1.5: Kalibrationsgerade für die Ermittlung des Gehaltes an bovinen nativem β -Lactoglobulin	60
Abb.4.1.6: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Clever Vollmilch (Pasteurisiert).....	63
Abb.4.1.7: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Ja natürlich Extra Vollmilch (Pasteurisiert).....	63
Abb.4.1.8: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Natur aktiv Bio-Vollmilch (Extended-shelf-life)	64

Abb.4.1.9: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in A faire Milch (Extended-shelf-life)	64
Abb.4.1.10: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in NÖM Guten Morgen (Extended-shelf-life).....	65
Abb.4.1.11: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Maresi – Die Leichte (UHT).....	65
Abb.4.2.1: Natives Polyacrylamidgel (12,5 %) der Molkenproteinfraktionen von Roh- (RM), pasteurisierten (Past.), ESL- und UHT-Milchen	69
Abb.4.2.2: SDS-Polyacrylamidgel (15 %), der Molkenproteinfraktionen von Roh- (RM), pasteurisierten (Past.), ESL- und UHT-Milchen.....	70

1. Einleitung und Fragestellung

Das Hauptmolkenprotein β -Lactoglobulin ist aufgrund der geringen Hitze-stabilität ein geeigneter Indikator, um die zur Milchherstellung eingesetzten Wärmebehandlungsverfahren nachzuweisen. Vor allem Extended-shelf-life Milchen (ESL-Milchen) gewinnen bei den Konsumenten immer mehr an Bedeutung, da sie eine höhere Haltbarkeit als pasteurisierte Milchen aufweisen und gegenüber UHT-Milchen größere Nährstoffgehalte besitzen.

Das Hauptmolkenprotein β -Lactoglobulin, welches in dimerer Form in der Kuhmilch vorkommt, besitzt eine hohe biologische Wertigkeit aufgrund des großen Gehaltes an essentiellen α -Aminosäuren. Es kann jedoch auch Initiator für Kuhmilchproteinintoleranzen sein.

Das effizienteste chromatographische Trennverfahren zum Nachweis des nativem β -Lactoglobulins ist die Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).

Im Fokus meiner Arbeit steht die Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milchen sowie in Roh-, pasteurisierten und UHT-Milchen zu Vergleichszwecken.

Es soll festgestellt werden, ob die im Handel erhältlichen ESL-Milchen den empfohlenen Mindestgehalt von 1800 mg/L an nativem β -Lactoglobulin aufweisen. Dadurch können Rückschlüsse gezogen werden, welche Erhitzungsverfahren eingesetzt wurden und es erlaubt Aussagen über die ernährungsphysiologische Qualität dieser Milchen.

Die Analyse des säurelöslichen β -Lactoglobulins erfolgt mittels RP-HPLC. Ausgewählte Milchproben werden ebenfalls mittels elektrophoretischer Verfahren (Native und Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) qualitativ nachgewiesen.

2. Literaturüberblick

2.1. Zusammensetzung und Inhaltsstoffe der Kuhmilch

Die durchschnittliche Zusammensetzung der Kuhmilch ist abhängig von der Gattung, Altersklasse, Futtermitteln, Haltung und gesundheitlichem Wohlbefinden (SPREER, 2005; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999) sowie von Genetik, Laktationsverlauf und Umgebungsbedingungen (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Kuhmilch besteht zu 63 – 87 % aus Wasser, welches als lösliches Medium für die verschiedenen Bestandteile dient (SPREER, 2005). Der restliche Anteil beläuft sich auf die Trockenmasse (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Diese wird wiederum in Fett und fettfreie Trockenmasse gegliedert, wobei zum letzteren genannten Rohprotein (Reinproteinfraktion 95 %, Nicht-Protein-Stickstoff 5 %), Laktose, Salze und minore Komponenten zählen (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

2.1.1. β -Lactoglobulin

2.1.1.1. Definition und Vorkommen

Ist jene Molkeneiweißkomponente, die nach Caseinpräzipitation (sauer) bei pH 4,6 und Raumtemperatur (20° C) in Molke bleibt.

Mit einem durchschnittlichen Gehalt von 3,5 g/L Milch bildet β -Lactoglobulin die Hauptkomponente des Molkeneiweißgemisches (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Es liegt hauptsächlich als Dispersion (molekular) vor (EBERMANN und ELMADFA, 2008).

Es kommt nicht in Frauenmilch, in der Milch von Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen vor (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999).

2.1.1.2. Aminosäuren

Aufgrund des hohen Anteils an essentiellen α -Aminosäuren (Vor allem Lysin) ist β -Lactoglobulin ernährungsphysiologisch von sehr großer Bedeutung (SPREER, 2005).

Die basische Aminosäure Lysin spielt eine wichtige Rolle als Carnitinvorstufe und ist eine Komponente des Kollagens (als hydroxylierte Form). Als Regulator der Biosynthese von Proteinen fungiert die essentielle Aminosäure Tryptophan. Des Weiteren ist es an der Niacin- sowie Serotoninbildung beteiligt. Das schwefelhaltige Methionin ist die Vorstufe von Cystein sowie Taurin und fungiert als Methylendonator bei diversen biochemischen Prozessen. Phenylalanin dient als Vorstufe der Tyrosinsynthese und ist an der Bildung von Melanin, Adrenalin und Thyroxin beteiligt (ELMADFA und LEITZMANN, 1998).

2.1.1.3. Struktureller Aufbau

Das β -Lactoglobulinmolekül wird gebildet aus 162 Aminosäuren und weist eine molare Masse von $18277 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (=18,277 kDA als Monomer) auf (MADUREIRA et al., 2007).

Das globuläre Molekül, welches als Dimer in der Milch vorliegt, hat sieben genetische Varianten (A, B, C, D, E, F, G), wobei Variante A und B am häufigsten auftreten (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Abkürzungen der vorkommenden Aminosäuren des β -Lactoglobulin wie unten angeführt:

Alanin	Ala	Leucin	Leu
Arginin	Arg	Lysin	Lys
Asparagin	Asn	Methionin	Met
Asparaginsäure	Asp	Phenylalanin	Phe
Cystein	Cys	Prolin	Pro
Glutamin	Gln	Serin	Ser
Glutaminsäure	Glu	Threonin	Thr
Glycin	Gly	Thyrosin	Tyr
Histidin	His	Tryptophan	Trp
Isoleucin	Ile	Valin	Val

Literaturüberblick

1					5					10					15					20
H - Leu	Ile	Val	Thr	Gln	Thr	Met	Lys	Gly	Leu	Asp	Ile	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Thr	Trp	Tyr	
				25					30					35					40	
Ser	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Arg	
				45					50					55					60	
Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Gln	Lys	
				Gln (D)					Ser (F)									His (C)		
				65					70					75					80	
Trp	Glu	Asn	Gly	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Lys	Ile	Ile	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	
				Asp (A)													Met (G)			
				85					90					95					100	
Val	Phe	Lys	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Lys	
				105					110					115					120	
Lys	Tyr	Leu	Leu	Phe	Cys	Met	Glu	Asn	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	Ala	Cys	Gln	
																Val (A)				
				125					130					135					140	
Cys	Leu	Val	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu	
																Tyr (F)				
				145					150					155					160	
Lys	Ala	Leu	Pro	Met	His	Ile	Arg	Leu	Ser	Phe	Asn	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	
																Gly (E, F, G)				
				162																
His	Ile -																			
	OH																			

Tab.2.1.1: Aminosäuresequenz des bovinen β -Lactoglobulins B inklusive genetische Abarten (modifiziert nach SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999; BELITZ et al., 2001)

Bei einem pH-Wert zwischen 5,2 und 7 liegt β -Lactoglobulin als Dimer vor, bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 5,2 als Oktamer und bei pH 3 und > 8 als Monomer (MADUREIR et al., 2007).

Das native β -Lactoglobulin-Molekül besitzt neun antiparallele Faltblattstrukturen. Davon bilden acht zusammen mit einer dreidimensionalen α -Helix einen sogenannten Kelch. Dieser besteht aus zwei Strängen, wobei das 1. Blatt sich aus den Strukturen A, B, C, D zusammensetzt und die Strukturen E, F, G und H das 2. Blatt ausbilden.

Eine sehr reaktive Thiolgruppe besitzt das Cystein 121, welches an Denaturierungs- und Aggregationsreaktionen beteiligt ist (KONTOPIDIS et al., 2004). Die übrigen vier Cysteinreste können zur Bildung von Disulfidbrücken,

jeweils zwei, führen (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Der Phenylring des Phe 136 trennt das Cys 121 von der Disulfidbrücke, welche zwischen Cys 106 und 119 besteht (CREAMER et al., 2004).

2.1.1.4. Biologische Bedeutungen

In vitro ist β -Lactoglobulin am Transport von Retinol und Fettsäuren (langkettigen) beteiligt (CHATTERTON et al., 2006; MADUREIRA et al., 2007), sowie auch am Vitamin D- und Cholesterintransfer (Bei einem pH-Wert von 5). Des Weiteren hat β -Lactoglobulin Einfluss auf die Regulation des Phosphor-Stoffwechsels in der Milchdrüse. Darüber hinaus spielt die Aminosäurezusammensetzung eine große Rolle. β -Lactoglobulin weist einen hohen Anteil an Cysteinen auf, welche bei der Gluthation-Synthese einen Einfluss haben. Der Aufschluss des Milchfettes wird gefördert, indem β -Lactoglobulin freie Fettsäuren bindet (MADUREIRA et al., 2007).

Das Molkenprotein β -Lactoglobulin und das im Plasma vorkommende Retinolbindungsprotein besitzen einige genetische Übereinstimmungen. Dadurch resultiert die Annahme, dass die intestinale Aufnahme von Retinol (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999) und langkettigen Fettsäuren durch die Anwesenheit von β -Lactoglobulin, beim noch nicht geborenen Kalb, gefördert wird (CHATTERTON et al., 2006).

Die genaue physiologische Bedeutung des β -Lactoglobulins ist jedoch noch unklar (CHATTERTON et al., 2006).

2.1.1.5. Intoleranz gegenüber Kuhmilchproteinen

Durch die Aufnahme von Kuhmilchproteinen initiiert das Immunsystem Überempfindlichkeitsreaktionen (MICHALSKI und JANUEL, 2006).

An den anaphylaktischen Reaktionen sind nahezu alle Milchproteine beteiligt (CHATTERTON et al., 2006). β -Lactoglobulin (Genetischen Varianten A und B)

(MAIER et al., 2006) und Caseine sind jedoch die hauptauslösenden Allergene (EL-AGAMY, 2007).

Die Kuhmilcheiweißintoleranz ist abhängig von der geographischen Lage und Volkszugehörigkeit (CHATTERTON et al., 2006).

Diese allergieauslösenden Eigenschaften der Proteine in der Kuhmilch können durch diverse Herstellungsprozesse (hohe Erhitzungstemperaturen) herabgesenkt werden (EL-AGAMY, 2007). Erfolgt eine Kombination von physikalischen mit enzymatischen Behandlungen kommt es ebenfalls zu einer Reduktion der Proteinunverträglichkeit (MAIER et al., 2006).

2.1.2. α -Lactalbumin

Vorkommen und struktureller Aufbau

Das mengenmäßig zweitgrößte Molkenprotein (20 % der Gesamtmolkenproteinfraktion) weist drei genetische Varianten (A, B, C) auf. Dieses ist aufgebaut aus 123 Aminosäuren, weist eine molare Masse von $14175 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (=14,175 kDa) auf und besitzt acht Cysteine (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Die Struktur dieses Molkenproteins wird durch vier Disulfidbrücken gefestigt (SCHOKKER et al., 2000).

Hinsichtlich dessen Aufbaues bestehen einige Ähnlichkeiten mit Lysozym (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Biologische Bedeutung

Dieses Molkenprotein besitzt die Fähigkeit Metalle zu binden, vor allem Calcium, welches für die Strukturstabilität von α -Lactalbumin von großer Bedeutung ist (CHATTERTON et al., 2007) und fungiert als eine Untereinheit der Laktosesynthetase, die für die Bildung von Laktose verantwortlich ist (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Dem α -Lactalbumin wird eine höhere biologische Wertigkeit zugeschrieben als dem β -Lactoglobulin. Weiters ist die Wertigkeit des α -Lactalbumins im Vergleich zu den Caseinen ebenfalls höher (RENNER, 1982).

α -Lactalbumin soll eine präventative Wirkung im Bezug auf verschiedene Krebsarten aufweisen und sich positiv auf chronische stressinduzierte Krankheiten auswirken (MADUREIRA et al., 2007).

2.1.3. Weitere Molkenproteine

Diese Molkenproteine sind nur in geringen Spuren in der Kuhmilch vorhanden.

Bovines Serumalbumin (BSA)

Dieses Molekül besitzt 582 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 66,267 kDa auf (MADUREIRA et al., 2007). Es sind 17 Disulfidbrücken, welche für die Stabilität der Proteinstruktur verantwortlich sind (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Bovines Serumalbumin besitzt die Fähigkeit freie Fettsäuren, andere Lipide und Aromakomponenten zu binden und weist eine präventative Wirkung im Bezug auf verschiedene Krebsarten auf (MADUREIRA et al., 2007).

Immunoglobuline

Diese Antikörper werden in fünf verschiedene Gruppierungen (Kuhmolke) eingeteilt. Die Verbindung der beiden heavy-Stränge und light-Stränge erfolgt über Disulfidbrücken.

Die Kolostralmilch von Kühen weist einen hohen Gehalt an Immunoglobulinen auf, wobei die Konzentration stetig abnimmt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der immunologischen Abwehr (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Lactoferrin

Dieses Glykoprotein (Monomer) weist ein Molekulargewicht von 80.000 kDa auf und kann Komplexe mit Eisen bilden. Der durchschnittliche Gehalt an Lactoferrin in Kuhmilch wird sehr stark von der Laktationsperiode beeinflusst und liegt in dem Bereich zwischen 0,02 und 0,35 mg/L (MADUREIRA et al., 2007).

2.1.4. Caseine

Caseine nehmen den Hauptanteil der Milchproteine mit rund 80 % ein (SPREER, 2005; EBERMANN und ELMADFA, 2008). Bovines Casein wird in vier Gruppen unterteilt: α_{s1} -Caseine, α_{s2} -Caseine, β -Caseine, κ -Caseine (EBERMANN und ELMADFA, 2008).

Durch Säurezugabe und einem pH-Wert von 4,6 kommt es zur Ausfällung dieser Proteine (EBERMANN und ELMADFA, 2008). Grund für die Reaktivität auf sauer ist der hohe Anteil an Carboxylgruppen (TÖPEL, 1991).

Ihre molekulare Masse beträgt 20-25 kDa (FOX, 2001) und sie weisen einen hohen Gehalt an Glutaminsäure, Serin, Leucin, Lysin und Prolin auf (MICHALSKI et al., 2006).

2.1.5. Lipide

Der Lipidanteil der Kuhmilch beträgt 3 - 5 % des Gesamtanteiles (EBERMANN und ELMADFA, 2008).

Den Hauptanteil dieser Nährstoffgruppe nehmen die Triglyceride mit 95-96 % ein (BELITZ et al., 2001). Diese weisen eine große Anzahl an unterschiedlichen Fettsäuren auf. Die majoren Fettsäuren sind größtenteils geradzahlig,

unverzweigt, gesättigt und reichen von C₄ bis C₁₈. Im Milchfett gibt es rund über 400 verschiedene minore Fettsäuren (Keto- und Hydroxyfettsäuren, cis-trans-Isomere) (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Niedere Fettsäuren kommen in sehr hohen Konzentrationen vor. Butter-, Capron- und Caprylsäure sind in Frauenmilch nicht enthalten. Des Weiteren wird Buttersäure zum Nachweis für Verfälschungen eingesetzt, da es nur in Milchfett vorhanden ist. Ein hoher Ölsäureanteil ist typisch für Milchfett (28 %). Einen ähnlich hohen Gehalt weist Palmitinsäure auf, gefolgt von Stearin- und Myristinsäure. Der Linol- und Linolensäureanteil ist relativ gering (EBERMANN und ELMADFA, 2008). Die konjugierte Linolsäure (CLA) weist antikanzerogene Eigenschaften auf (MICHALSKI et al., 2006).

Im Pansen von Wiederkäuern (Biohydrierung) entstehen mit Hilfe von Mikroorganismen trans-Fettsäuren, vor allem Elaidinsäure (trans-Ölsäure), die im Milchfett mit einem Gehalt von 2-4 % vorhanden sind (EBERMANN und ELMADFA, 2008).

Als Energieträger spielen die Milchlipide eine wichtige Rolle. Linol-, Linolen- und Arachidonsäure sind essentielle Fettsäuren für den menschlichen Organismus (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

2.1.6. Kohlenhydrate

Das Disaccharid Laktose (4-0-β-D-Galactopyranosyl-D-Glucopyranose) nimmt den Hauptanteil der Fraktion Kohlenhydrate mit 4,8 % ein. Es gibt zwei verschiedene Formen: α- und β-Lactose, wobei das zuerst genannte eine höhere Stabilität aufweist (BELITZ et al., 2001; EBERMANN und ELMADFA, 2008). Die Biosynthese von Laktose ist abhängig von der α-Lactalbumin-Konzentration (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999).

Bei längerer Erhitzung über 100°C kommt es zur Komplexbildung von Caseinen mit Laktose. Dies führt zu Maillardreaktion (SPREER, 2005).

Kuhmilch enthält in Spuren Oligosaccharide und Glucose (EBERMANN und ELMADFA, 2008) und Galaktose (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999).

2.1.7. Minore Milchkomponenten

Diese Gruppe von Inhaltsstoffen nehmen < 0,1 % des Gesamtanteils in der Kuhmilch ein (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999).

Die Milch der Kuh stellt eine wichtige Vitaminquelle dar. Die fettlöslichen Vitamine sind während der Wärmebehandlung im Rahm lokalisiert. Dazu zählen Tocopherole mit einem durchschnittlichen Gehalt von 1 mg/L, Retinol (0,4 mg/L) und Vitamin D (1 µg/ml) (BELITZ et al., 2001).

Bei den wasserlöslichen Vitaminen weist die Ascorbinsäure einen Durchschnittswert von 20 mg/L auf (EBERMANN und ELMADFA, 2008; BELITZ et al., 2001). In der Gruppe der B-Vitamine hat Riboflavin den höchsten Anteil mit 1,7 g/L auf, gefolgt von Pyridoxin, Thiamin und Cobalamin. Pantothensäure kommt mit einem Gehalt von 3,5 mg/L und Niacin mit 1 mg/L in der Kuhmilch vor. Folsäure und Biotin sind nur in Spuren vorhanden. Während der Erhitzung von Milch befinden sich die wasserlöslichen Vitamine in der Molke (BELITZ et al., 2001).

Die Hauptkomponenten der Mineralstoffe, welche als Kationen in der Milch von Kühen vorliegen, sind Kalium mit einem durchschnittlichen Wert von 1,5 g/L, gefolgt von Calcium (1,2 g/L), Natrium (0,5 g/L) und Magnesium mit 0,12 g/L. Zu den Anionen der Kuhmilch zählen Phosphat mit einem durchschnittlichen Gehalt von 3 g/L und Chlorid 1 g/L (BELITZ et al., 2001).

Mineralstoffe spielen eine sehr wichtige Rolle im Bereich diverser Puffersysteme und haben Einfluss auf die Beibehaltung des Druckes, welcher auf Osmose zurückzuführen ist. Des Weiteren sind sie wichtige Bestandteile für den Aufbau diverser Strukturen des Organismus. Vor allem Calcium spielt eine

wichtige Rolle bei der Prävention von Osteoporose (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999).

Zu den Minorkomponenten zählen ebenfalls die Spurenelemente, welche bestimmte Aufgaben beim Ablauf diverser Stoffwechselfvorgänge, bei denen Enzyme als Katalysatoren wirken, besitzen (SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Die wichtigsten Spurenelemente der Kuhmilch mit absteigendem Gehalt sind Zink, Aluminium, Eisen, Bor, Fluor, Kupfer, Jod, Molybdän, Mangan und Nickel (BELITZ et al., 2001).

Unter den Enzymen spielen die Hydrolasen und Oxidoreduktasen eine sehr wichtige Rolle, da sie Aufschluss über die unterschiedlichen Temperaturbereiche bei Hitzeeinwirkung geben (BELITZ et al., 2001).

2.2. Extended-Shelf-Life Milch (ESL-Milch)

Unter Extended-shelf-life Milch wird Milch mit einer Haltbarkeit von bis zu 21 Tagen bei 10° C und fortlaufender Kühlung ohne Unterbrechung im europäischen Raum verstanden (DYCK, 1999).

Dieses Produkt weist gegenüber der pasteurisierten Milch eine verlängerte Haltbarkeit auf und im Vergleich zur UHT-Milch höhere Nährstoffwerte (SPREER, 2005).

Parameter	Richtgehalt
Natives β -Lactoglobulin	> 1800 mg/L
Lactulose	< 30 mg/L
Furosin	< 12 mg/100 g Protein
Gesamtkeimzahl (Beendigung des Herstellungsverfahrens)	< 10 KBE/ml

Tab.2.2.1: Richtparameter für die Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch (DYCK, 1999)

Damit eine Haltbarkeit von 21 Tagen gewährleistet werden kann, spielen einige Faktoren eine wichtige Rolle. Neben der Rohmilchqualität (Güteklasse 1), Erhitzungsverfahren (Direkt) mit geringer Belastbarkeit bezüglich vorhandener Nährstoffe, bestmöglicher Reduktion von Bakterien und Sporen, effektiver Abtransport der gasförmigen Stoffe, Sterilisation der während des Verfahrensablaufes eingesetzten Anlagen vor Prozessbeginn (Inklusive Abfüllanlage) sowie Rekontaminationen sollen effektiv vermieden werden. Aseptische Bedingungen sind sehr wichtig (DYCK, 1999).

2.2.1. Erhitzungsverfahren - Allgemein

Durch die Wärmebehandlung von Milch sollen pathogene Mikroorganismen und Bakterien, welche den Lebensmittelverderb hervorrufen, abgetötet und die Enzyme inaktiviert werden. Durch die Veränderung der einzelnen Milchkomponenten wird die Qualität der Milch stark beeinflusst (ELLIOTT et al., 2003). Es kommt zu einer Minderung der sensorischen und ernährungsphysiologischen Qualität (MORALES et al., 2000).

Die Temperatur-Zeit-Kombinationen spielen eine sehr wichtige Rolle (SPREER, 2005).

2.2.1.1. Pasteurisation

Unter Pasteurisation werden die Dauererhitzung (62 – 65° C, 30 Minuten), Kurzzeiterhitzung (72 – 75°C, 15 – 30 Sekunden) und die Hoherhitzung (85 – 127° C, 8 – 15 Sekunden bzw. <1 Sekunde) verstanden (SPREER, 2005).

Pasteurisierte Trinkmilch wird hauptsächlich durch Kurzzeiterhitzung haltbar gemacht (Bsp. 71,7° C /15 Sekunden). Bezüglich des Wärmebehandlungsnachweises müssen der Phosphatase-Test negativ, sowie der Peroxidase-Test positiv ausfallen (RYSSTAD und KOLSTAD, 2006 ; SPREER, 2005). Eine Ausnahme bildet die Hoherhitzung, bei welcher beide Enzymnachweise negativ sein müssen (SPREER, 2005).

Bei den Pasteurisierungsverfahren werden Bazillensporen jedoch nicht abgetötet. Die pasteurisierte Milch weist eine Haltbarkeit von fünf bis sechs Tagen, bei einer Lagertemperatur von 8° C und geschlossener Verpackung, auf (SPREER, 2005).

2.2.1.2. Ultrahoherhitzung

Die Ultrahoherhitzung (UHT) wird bei Temperaturen von 135 – 150° C mit Einwirkzeiten von 2 - 8 Sekunden durchgeführt und wird in direktes oder indirektes Verfahren gegliedert (CLAEYS et al., 2002). Sowohl Phosphatase- als auch Peroxidase-Test müssen negativ ausfallen (SPREER, 2005).

Es werden alle pathogenen Mikroorganismen und Sporen abgetötet (CLAEYS et al., 2002 ; RYSSTAD und KOLSTAD, 2006).

Durch die hohe Erhitzungstemperatur kann es zur Ausbildung des Kochgeschmackes kommen, sowie zur Abnahme von Cobalamin und Folsäure (SPREER, 2005).

2.2.2. Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch

Für die Produktion von ESL-Milch stehen drei Verfahren zur Verfügung: Hoherhitzung, Bactofugation, Mikrofiltration, wobei die beiden Letzteren in Kombination mit der herkömmlichen Pasteurisation eingesetzt werden, um mehr Sicherheit bezüglich Keimfreiheit zu erzielen (KIRSCHENMANN, 2006).

2.2.2.1. Hoherhitzung

Bei diesem thermischen Verfahren wird zwischen der direkten Methode, Dampfinfusion bzw. -injektion, und der indirekten Methode in Form von Wärmeaustauschern (Röhren- bzw. Plattenapparatur) unterschieden.

Bei der Auswahl optimaler Temperatur-Zeit-Bedingungen kann der Keimabtötungseffekt, verglichen mit Dauer- und Kurzzeiterhitzung, noch etwas gesteigert werden (125 - 127°C bei 2 - 4 Sekunden bzw. 135° C für 0,5 Sekunden) (KAUFMANN und KULOZIK, 2007).

Bei Anwendung der direkten Methode kommt es zu einer minimaleren Denaturierung der Milchproteine (KIRSCHENMANN, 2006).

2.2.2.2. Bactofugation

Dieses mechanische Verfahren wird in Verbindung mit Pasteurisation eingesetzt, um den Keimgehalt noch stärker zu reduzieren (KIRSCHENMANN, 2006).

Durch Entkeimungszentrifugen, welche eine sehr gute Trennleistung aufweisen, werden die Sporen bzw. Zellen, welche Sporen aufweisen, abzentrifugiert aufgrund der unterschiedlichen Dichte von Bakterien bzw. Sporen und Milch (SPREER, 2005).

Durch diese Methode kann die Haltbarkeit um ein bis drei Tage verlängert werden und ist zudem noch ein preiswertes Verfahren (KIRSCHENMANN, 2006).

2.2.2.3. Mikrofiltration

Dieses Membrantrennverfahren ist technisch aufwendiger, hat jedoch den großen Vorteil, dass eine höhere Keimabtötungsrate erzielt wird. Die Trenngrenze der verwendeten Membrane ist entscheidend dafür, wie hoch der Anteil der Mikroorganismen, Sporen und Proteine ist, welche die Membrane passieren (GALLMANN et al., 2001).

Die meisten eingesetzten Filtrationsmembrane (Membralox-Membranmodule) weisen eine Trenngrenze von 1,4 µm bzw. 0,8 µm auf (MATHES und SCHIER, 2007 ; RYSSTAD und KOLSTAD, 2006 ; KIRSCHENMANN, 2006). Eine hohe Rückhaltung, 3,2 bis 3,5 log, der vorhandenen pathogenen Mikroorganismen sowie Sporen wird beim Einsatz von Membranen mit einer Trenngrenze von 1,4 µm erreicht. Membrane mit einer Trenngrenze von 0,8 µm weisen bis zu drei weitere Zehnerpotenzen auf (KIRSCHENMANN, 2006).

Die Milchproteine gelangen fast vollständig durch die Membran (MATHES und SCHIER, 2007 ; RYSSTAD und KOLSTAD, 2006).

Dieses Verfahren erhält den vollen und frischen Charakter der Milch und hat minimalste Auswirkungen bezüglich der vorhandenen Nährstoffe (KIRSCHENMANN, 2006). Mittels Mikrofiltration hergestellte Extended-shelf-life Milch besitzt denselben Gehalt an Laktose und nahezu einen gleichen Anteil an β-Lactoglobulin (BRUCH und PELLEGRINO, 2006).

Herstellungsprozess

Die erwärmte Milch wird in den Separator geleitet, wo eine Trennung von Magermilch und Rahm erfolgt. Der Rahm wird der Hoherhitzung und die Magermilch der Mikrofiltration zugeführt. Die Mikrofiltration kann auf ein- oder zweistufigen Anlagen erfolgen. Einstufig erfolgt die Filtration mit einem 20er Konzentrierungsfaktor. Daraus resultiert, dass der Magermilchanteil von 5 % als Retentat (Anwesenheit von Mikroorganismen) ausfällt. Die Magermilchfiltration mit einem Konzentrierungsfaktor von 100 bis 200 erfolgt bei zweistufigen Abläufen. Daraus ergibt sich ein Retentat mit einem 5 %igen Anteil an Magermilch. Der hochohitzte Rahm und die der Mikrofiltration zugeführte

Magermilch werden in der Inline-Standardisierung wieder vereint. Es kommt zu einer partiellen Homogenisierung des Rahms. Danach erfolgt eine Pasteurisation (Kurzzeiterhitzung), um die noch vorhandenen Mikroorganismen abzutöten, Rückkühlung, Tiefkühlung und aseptische Abfüllung (KIRSCHENMANN, 2006; SPREER, 2005).

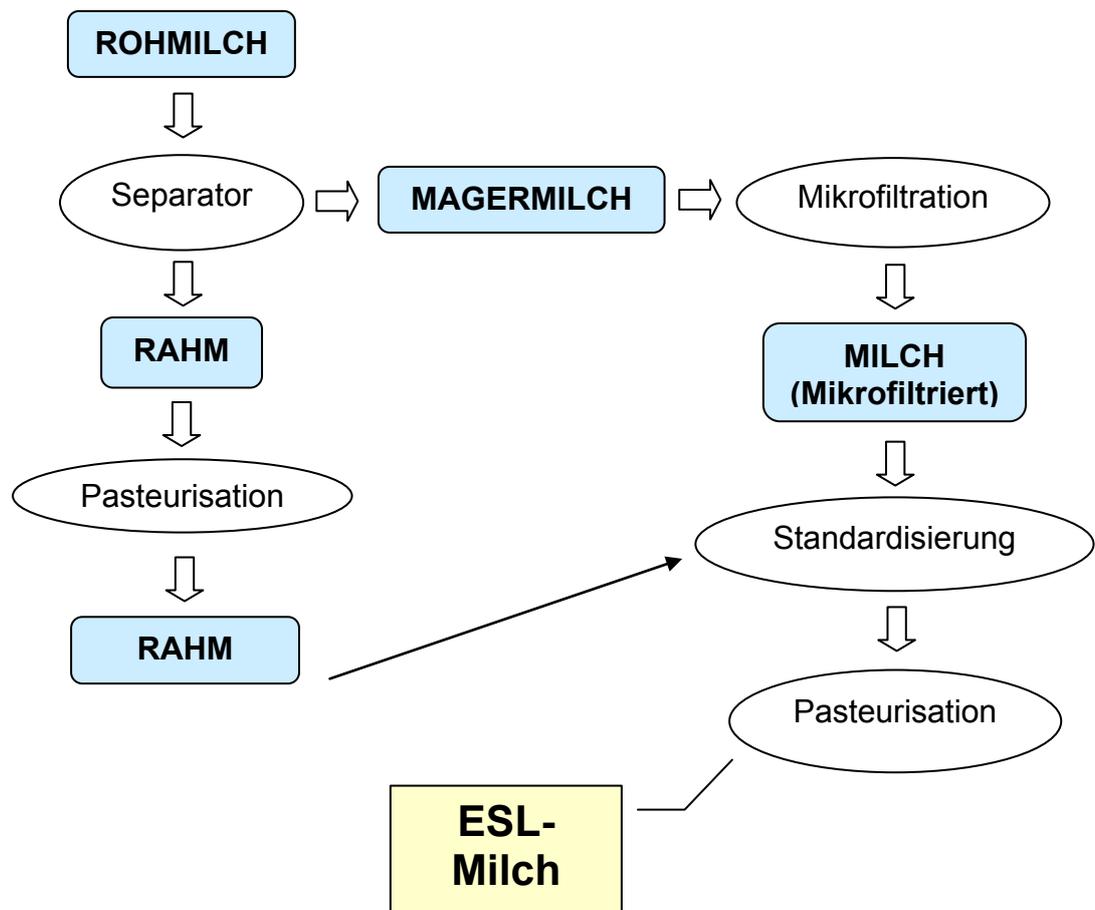


Abb.2.2.2: Schematische Darstellung des Verfahrensablaufes zur Herstellung von ESL-Milch (modifiziert nach BRUCH und PELLEGRINO, 2006)

2.2.3. Hitzeindikatoren

Für die Bewertung von Wärmebehandlungen werden chemische Reaktionen, die in zwei Gruppen unterteilt sind, herangezogen (LUF, 1995).

Typ-1-Reaktionen

Zu dieser Gruppe gehören chemische Reaktionen, die eine Trennung, chemische Veränderung mit einhergehendem Verlust der spezifischen Eigenschaften und Blockung der Aktivierung von Stoffen, welche keine Hitzeresistenz aufweisen, betreffen (LUF, 1995).

Die Hauptkomponenten der Molkenproteinfraktion, β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin erweisen sich als geeignete Indikatoren im Hoherhitzungs- (86° – 125° C) und Ultrahoherhitzungsbereich (140° C). Im Bereich der Pasteurisierung ist der Einsatz der beiden Indikatoren nur bedingt möglich. Erst ab einer Temperatur von > 62° C kommt es zu einer Verringerung des Gehaltes vor allem an β -Lactoglobulin (SCHLIMME et al., 1996).

Von den zwei Hauptmolkenproteinen ist β -Lactoglobulin der geeignetere Hitzeindikator wegen der geringeren Hitzestabilität (SCHLIMME et al., 1996).

Zu den Enzymindikatoren zählen die Alkalische Phosphatase (ALP), Lactoperoxidase (LPO) und γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GGTP) (LUF, 1995). Sie sind geeignete Indikatoren im Bereich der Pasteurisation bzw. Kurzzeiterhitzung (ELLIOTT et al., 2003).

Verfahren	β-Lactoglobulin-Mindestwert [mg/L]
Pasteurisation:	
➤ Kurzzeiterhitzung	2600
➤ Hoherhitzung	2000
ESL-Milch	1800 (1600)
Ultrahocherhitzung:	
➤ Direkt	700
➤ Indirekt	150

Tab.2.2.2: Mindestgehalt des nativem β -Lactoglobulins [mg/L] bei unterschiedlichen Erhitzungsverfahren (CLAEYS et al., 2004; DYCK, 1999; GALLMANN et al., 2001)

Typ-2-Reaktionen

Darunter werden chemische Reaktionen verstanden, die zur Entstehung neuer Produkte führen (LUF, 1995).

Hierzu zählen Lactulose, Furosin, Hydroxymethylfurfural und Tryptophan (ELLIOTT et al., 2003).

Furosin kann schon ab der Pasteurisierung als geeigneter Indikator eingesetzt werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass der Gehalt an Furosin während der Lager weiter ansteigt (LUF, 1995).

Sie sind geeignete Indikatoren im Bereich der Hoherhitzung bzw. UHT (ELLIOTT et al., 2003).

2.2.4. Erhitzung und Molkenproteine

Molkenproteine weisen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Wärmeeinwirkung auf und können aufgrund ihres Grades der Denaturierung zur

Klassifizierung der Hitzeeinwirkung herangezogen werden (SCHLIMME et al., 1996).

Hitzelabilität der Molkenproteinfraktion:

α -Lactalbumin < β -Lactoglobulin < Serumalbumin < Immunglobuline (CLAEYS et al., 2002)

Bei einer Erhitzung über 70° C erfolgt die Denaturierung der Molkenproteine (HARJINDER, 2004), welches zu einer Veränderung der Struktur und damit einhergehend zur Ausbildung anderer spezifischer Merkmale sowie die Abnahme der Löslichkeit (Vor allem β -Lactoglobulin) führt (SPREER, 2005; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999; ELLIOTT et al., 2003).

Das β -Lactoglobulin in seiner dimeren Struktur dissoziiert in ein Monomer (SCHOKKER et al., 2000).

Bei Anwesenheit von großer Calciumionenkonzentration und einem pH > 8,6 ist die Denaturierung nicht mehr reversibel (BELITZ et al., 2001).

Mit Hilfe der Reaktionskinetik (1. Ordnung) lassen sich die chemischen Veränderungen der beiden Hauptmolkenproteinfraktionen bei Temperaturen von 86° - 140° C erläutern.

Während der Denaturierung wird die globuläre Struktur der Molkenproteine entfaltet und es kommt zu Komplexbildungen innerhalb der Molkenproteinfraktion, aber auch mit anderen Proteinen der Milch vor allem mit κ -Caseinen (Temperatur 90° C, Heißhaltezeit von 10 Minuten) (SPREER, 2005; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999). Die Temperatur von 95° C spielt eine wichtige Rolle. Oberhalb dieses Temperaturbereiches ist die Geschwindigkeit abhängig von den oben erwähnten Reaktionen, während unterhalb dieser Grenze die Proteinentfaltung eine Rolle spielt (SCHLIMME et al., 1996).

Ihre Tendenz zur Denaturierung bei Erhitzung beruht auf dem hohen Gehalt an schwefelhaltigen α -Aminosäuren Cystein und Cystin. Kommt es zu einer Wärmeeinwirkung werden die Disulfidbindungen aufgebrochen, Sulfhydryl-

gruppen (H_2S) freigesetzt und es kommt zur Bildung von Dimethylsulfid ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$), welches für den Kochgeschmack verantwortlich ist (In hocherhitzten Milchprodukten) (TÖPEL, 1991).

Mit steigender Temperatur und Heißhaltezeiten steigt der Denaturierungsgrad der Molkenproteine. Weist die Milch eine hohe totale Eiweißkonzentration auf, so ist die Denaturierungsgeschwindigkeit der Molkenproteine ebenfalls erhöht (ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2008).

Die Experten sind sich noch nicht einig, ob ein Zusammenhang zwischen der β -Lactoglobulin-Denaturierung und dem Fettgehalt besteht. Es werden protektive und synergistische Einflüsse beschrieben.

Die β -Lactoglobulin-Denaturierung wird durch den Laktosegehalt protektiv beeinflusst. Gründe dafür sind, dass Kohlenhydrate sowie ähnliche chemische Verbindungen Einfluss auf die Proteinhydratation (Erhöhung bzw. Verringerung) besitzen und in der direkten Umgebung der Proteine Verbindungen mit hohem Wasseranteil gefördert werden. Des Weiteren kommt es bei der Erhitzung zu einer Verbindung von Laktose mit Proteinen, welches wiederum eine Komplexbildung von Caseinen mit Molkenproteinen erschwert (CLAEYS et al., 2002).

2.2.5. Lagerung von ESL-Milch

Um eine größtmögliche Haltbarkeit der Extended-shelf-life Milch zu gewährleisten, spielen neben den eingesetzten Erhitzungsverfahren auch diverse Faktoren im Bereich der Lagerung wie Temperatur, Dauer, Sauerstoff und Licht sowie Reinfektionen, fortlaufende Kühlung eine wichtige Rolle.

Kommt es zu einer Temperaturerhöhung um 2°C , verringert sich die Haltbarkeit um die Hälfte (Bei pasteurisierter Milch) (RYSSTAD und KOLSTAD, 2006).

Extended-shelf-life Milch, welche durch Kurzzeitpasteurisation hergestellt wurde, sollte bei einer Temperatur von 6° C gelagert werden (KAUFMANN und KULOZIK, 2007). DYCK (1999) gibt eine Lagertemperatur von 10° C an.

Lichteinwirkung (Natürlich, künstlich) führt zu einem Verlust an Vitaminen (Riboflavin, Ascorbinsäure, Retinol) sowie zur Bildung von Fremdaromen vor allem bei einer Wellenlänge bis 500 nm. Letztere entstehen durch Reaktionen von Aminosäuren und Lipiden (Vor allem ungesättigte) mit reaktivem Sauerstoff (Photooxidation) (RYSSTAD und KOLSTAD, 2006; RENNER, 1982).

Eberhard et al. (2003) analysierte die Verluste von B-Vitaminen und Folsäure von hochehitzter Milch (Direktes und indirektes Verfahren) bei einer Lagerdauer von 4 Wochen. Bei Folsäure und Cobalamin wurden keine Verringerungen des Gehaltes sowohl bei direkter als auch bei indirekter Verfahrensweise festgestellt. Ein 7 %iger Verlust an Pyridoxin wurde bei der direkten Erhitzungsmethode festgestellt und keiner bei der indirekten. Nur Thiamin wies einen verminderten Gehalt bei beiden Verfahren (Verluste: Direkt: 15 %, indirekt 5 %) auf (EBERHARD et al., 2003).

Bei Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zu einem erhöhten Abbau von Ascorbinsäure und Folsäure (RENNER, 1982).

2.3. Verfahren zum Nachweis des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch - Überblick

2.3.1. High performance liquid chromatography (HPLC)

Unter Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wird ein physikalisches Trennverfahren verstanden.

Prinzip

Die eingebrachte Probe wird von der mobilen Phase aufgenommen, welche unter Druck durch die Apparatur, mittels einer Pumpe, transportiert wird. Die stationäre Phase, welche in der Trennsäule lokalisiert ist, bewirkt eine Trennung der Probenkomponenten, basierend auf verschiedenen Verteilungskoeffizienten. Einige Anlagen verfügen über eine Vorsäule, welche zur Reinigung des Eluenten dient. Danach erfolgt eine qualitative sowie quantitative Erfassung der Substanzen durch einen Detektor.

2.3.2. Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC)

Der Nachweis des Molkenproteins β -Lactoglobulin erfolgt über Reversed-Phase HPLC. Die Substanzidentifikation erfolgt mittels Standards, ebenso die Quantifizierung.

Bei der Umkehrphasen-Chromatographie sind die stationäre Phase unpolar und die Eluenten polar. Daraus ergibt sich, dass durch die Wechselwirkung von unpolaren Molekülen mit der stationären Phase diese später verlassen werden als polare Moleküle (MEYER, 1986).

Wasser, Gemische aus Puffer sowie Lösungsmittel, welche in Wasser löslich sind, werden als mobile Phase eingesetzt. Methanol, Acetonitril und Ethanol sind die am häufigsten eingesetzten Substanzen (GRÜNWALD, 1993; MEYER, 1986).

Als stationäre Phase werden modifizierte Silicagele, welche vor allem mit Silanen verestert werden, eingesetzt. Diese weisen unpolare Seitenketten auf. Am häufigsten werden Säulen, deren organische Seitenkette aus Octadecyl (C18) bestehen, in der RP-HPLC eingesetzt (GRÜNWALD, 1993).

2.3.3. Native und Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (Native und SDS-PAGE)

Durch elektrophoretische Methoden werden Proteine getrennt inklusive deren Formen, welche genetische Abweichungen aufweisen und charakterisiert (MEHRENS und MÜLLER, 1991).

Prinzip

Die Elektrophorese ist ein Verfahren bei dem elektrisch geladene Moleküle durch ein geeignetes Trägermaterial durch Anwendung eines elektrischen Feldes wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle in einem elektrischen Feld ist abhängig von dessen Teilchengröße, Form, Ladung, Größe der Poren (Leitungsmatrix) sowie der angelegten Spannung des elektrischen Feldes und der Temperatur.

Nach Beendigung der Trennung zeigen sich die jeweiligen Molekülarten an bestimmten Stellen in Form von Banden.

In der Praxis werden überwiegend Polyacrylamidgele verwendet. Der Gehalt an Polyacrylamid und den vernetzten Monomeren bestimmt die Porengröße des Geles (HOEFER, 1994).

Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das anionische Detergens, Natriumdodecylsulfat, bindet an den Hauptstrang der Polypeptide und bewirkt einen Ausgleich der Ladungsunterschiede. Dies führt dazu, dass die Proteine eine ähnlich negative Ladung aufweisen (HOEFER, 1994).

Bei der SDS-Page erfolgt die Trennung aufgrund des Molekulargewichtes (MEHRENS und MÜLLER, 1991).

Nach Beendigung der Trennung erfolgt eine Färbung, um die Position der zu untersuchenden Moleküle zu ermitteln, welches einen Hinweis auf die

Molekülgröße gibt, und die Intensität der Banden erlaubt Aussagen über den Gehalt in der Probe (HOEFER, 1994).

Native Polyacrylamidelektrophorese (Native PAGE)

Bei dieser Form der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung aufgrund der elektrischen Ladung (HOEFER, 1994).

Hier wird das Reduktionsmittel (DDT) und Natriumdodecylsulfat (SDS) nicht verwendet.

Die Konzentration von Acrylamid mit einem Anteil von 9 – 12 % in Trenngelen erweist sich als optimal, um die Gruppe der Molkenproteine aufzuspalten (MEHRENS und MÜLLER, 1991).

3. Material und Methoden

3.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milchen mittels RP-HPLC

3.1.1. Herstellung der Standards für die Kalibration

Geräte und Hilfsmittel

Standzentrifuge	Beckmann J2-HS
Laborzentrifuge	Eppendorf, 5424 R
pH-Messgerät	Hannae Instruments, pH 211, Microprocessor
Filterpapier	Schleicher und Schüll
Filter	Miniart RC4, Sartorius stedim biotech GmbH. Porengröße: 0,20 μ m
Einmalspritzen	Braun, 2 ml
Glasgefäße pyrolysiert	

Substanzen

β -Lactoglobulin (Kuhmilch, kristallisiert und lyophilisiert drei Mal)	Sigma 095K7006
α -Lactalbumin (Pulver – lyophilisiert)	Sigma L5385
Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4	Merck 6346.1000
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Na_2HPO_4	Merck 1.06586.0500
Salzsäure 37 % (MM = 36,46)	Merck 317.2005

Herstellung der Lösungen

2 M Salzsäure

33,12 ml einer 37 %igen HCL in einen 200 ml Messkolben mittels Pipette transferieren und bis zur Marke mit UHQ-Wasser auffüllen.

Phosphatpuffer 0,1 M (pH 6,70)

Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M

2,75979 g Natriumdihydrogenphosphat in einen 100 ml Messkolben einwiegen und mit UHQ-Wasser bis zur Marke auffüllen.

Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M

1,7799 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat in einen 50 ml Messkolben einwiegen und mit UHQ bis zur Marke auffüllen.

→ Phosphatpuffer 0,1 M (pH 6,70)

In einen 200 ml Messkolben 57 ml Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M und 43 ml Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M pipettieren und mit UHQ-Wasser bis zur Marke auffüllen.

Standardlösungen (SL):

β-Lactoglobulin:

Einwaage von 35,55 mg 90 %igem β-Lactoglobulin in einen 10 ml Messkolben und mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,70) bis zur Marke auffüllen. Daraus ergibt sich eine Lösung von 32 mg β-Lactoglobulin (100 %)/10 ml.

α-Lactalbumin:

Einwaage von 37,65 mg 85 %igem α-Lactalbumin in einen 10 ml Messkolben und mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,70) bis zur Marke auffüllen. Daraus ergibt sich eine Lösung von 32 mg α-Lactalbumin (100 %)/10 ml. Es wird eine 1:2 Verdünnung hergestellt, d.h. die Lösung ergibt 16 mg α-Lactalbumin/10 ml.

(Grund: α -Lactalbumin stellt 20 % der Gesamtmolkenproteinfraktion dar, wobei β -Lactoglobulin mehr als 50 % einnimmt.)

Durchführung

Aus diesen beiden Standardlösungen erfolgt die Herstellung einer 1:10 Verdünnung. Diese dient als Ausgangssubstanz der unterschiedlichen Standardlösungen für die Kalibrierung.

Verdünnung	SL [μ l]	Gesamt [μ l]	PP [μ l]	α-Lactalbumin [mg/L]	β-Lactoglobulin [mg/L]
I	625	10000	9375	100	200
II	1250	10000	8750	200	400
III	2500	10000	7500	400	800
IV	5000	10000	5000	800	1600
V	7500	10000	2500	1200	2400
VI	10000	10000	-	1600	3200

Tab.3.1.1: Verdünnungsschema der Molkenprotein-Kalibrationsstandardlösungen

Es erfolgt eine Dreifachinjektion pro jeweiliger Verdünnung.

3.1.2. Probenaufbereitung

Geräte und Hilfsmittel

Pipetten	
Rührschiffchen	
Magnetrührer	Bibby (HB502)
pH-Messgerät	Hanna Instruments, pH 211, Micro-processor
Zentrifugenröhrchen	Corex USA, No 8441, 15 ml
Parafilm	Pechiney
Standzentrifuge	Beckmann J2-HS
Kunststoff-Fläschchen	Sterilin, Universal Container
Schüttler	IKA Labortechnik, KS 125 basic
Safe-Lock Tubes	Eppendorf, 1,5 ml
Laborzentrifuge	Eppendorf, 5424 R
Filter	Miniart RC4, Sartorius stedim biotech GmbH, Porengröße: 0,20 µm
Einmalspritzen	Braun, 2 ml
Glasgefäße pyr.	
Heißluftsterilisator	
Laborwaage	Mettler (AE 163)

Substanzen

Ultra High Quality – Wasser (UHQ)	
Salzsäure 37 % (MM = 36,46)	Merck 317.2005
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (M = 137,99)	Merck 6346.1000
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (M = 177,99)	Merck 1.06586.0500

Herstellung der Lösungen

2 M Salzsäure

Siehe 3.1.1.

Phosphatpuffer 0,1 M (pH 6,70)

Siehe 3.1.1.

Milchproben

Nr.	Bezeichnung
1	Demeter
2	Erlach

Tab.3.1.2. Rohmilchproben

Nr.	Bezeichnung	Fettgehalt (%)	Mindesthaltbarkeit (MHD)
1	Clever Vollmilch	3,5	11.12.2007
2	NÖM Vollmilch	3,5	08.12.2007
3	Almsana Vollmilch	3,5	14.12.2007
4	Echt Bio Vollmilch	3,5	12.12.2007
5	Spar Naturpur Bio-Vollmilch	3,5	06.12.2007
6	Ja natürlich Halbfett	1,6	10.12.2007
7	Ja natürlich Kinder-Frischmilch	3,8	10.12.2007
8	Ja natürlich Extra Vollmilch	4,5	10.12.2007

Tab.3.1.3. Pasteurisierte Milchproben

Nr.	Bezeichnung	Fettgehalt (%)	Mindesthaltbarkeit (MHD)
1	Natur aktiv Bio-Vollmilch	3,5	14.12.2007
2	Milbona	1,5	20.12.2007
3	NÖM Lactosefrei	1,8	14.12.2007
4	Bioness Bio-Vollmilch	3,5	10.12.2007
5	NÖM Halbfett	1,5	15.11.2007
6	NÖM Vollmilch	3,5	30.11.2007
7	Die Leichte Muh	0,7	29.11.2007
8	Himmeltau Kinder-Vollmilch	3,8	26.12.2007
9	A faire Milch	3,5	04.12.2007
10	Ja natürlich Vollmilch	3,6	11.12.2007
11	Spar Bio Vollmilch	3,5	09.12.2007
12	Ja natürlich Leichtmilch	1	12.12.2007
13	Spar Lactosefrei	1,5	15.12.2007
14	Milchkanne	1,5	13.12.2007
15	Schärdinger - Die schlanke Linie	0,1	13.12.2007
16	Bio Bio Vollmilch	3,5	13.12.2007
17	NÖM Schulmilch	1,8	07.12.2007
18	NÖM Fasten	0,9	11.12.2007
19	NÖM Guten Morgen	1,8	04.12.2007

Tab.3.1.4: Extended-shelf-life Milchproben

Nr.	Bezeichnung	Fettgehalt (%)	Mindesthaltbarkeit (MHD)
1	Maresi - Die Leichte	0,1	23.03.2008
2	Clever leicht	0,5	15.03.2008
3	Gmundner Milch	1,5	17.05.2008
4	Maresi - Die Volle	3,8	18.03.2008
5	Spar	0,5	19.03.2008

6	Viva Vital Laktosefrei	1,5	01.04.2008
7	Formil - Die Leichte	0,5	02.03.2008

Tab.3.1.5.: UHT-Milchproben

Durchführung

Aus den gut geschüttelten Milchpackungen werden jeweils 10 ml Milch entnommen und mit 2 M HCL auf einen pH-Wert von 4,5 justiert. Danach erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur von 20 Minuten. Die Zentrifugation erfolgt bei 8000 rpm und einer Temperatur von 4° C, wobei die Caseinfraktion von der Molke abgetrennt wird. Bei Rohmilch, Vollmilch oder Extended-shelf-life Milch wird jeweils 1 ml klares Filtrat entnommen und mit 9 ml 0,1 M Phosphatpuffer versetzt (1:10 Verdünnung). 2 ml klares Filtrat und 8 ml 0,1 M Phosphatpuffer werden bei UHT-Milch miteinander vereint (1:5 Verdünnung). Danach werden die Lösungen gut geschüttelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 60 Minuten werden die Lösungen nochmals gut gevortext, 1 ml Aliquot wird entnommen und bei 4° C und 13200 rpm zentrifugiert. Der flüssige Anteil wird in ein neues Eppendorf transferiert. Davon werden 500 µl durch einen Filter, mit einer Porengröße von 0,20 µm, filtriert und 10 µl in die HPLC injiziert.

3.1.3. Chromatographische Methode

HPLC-Apparatur und Hilfsmittel

HPLC Waters 600 E Multisolvent Delivery System, Waters™ 600 Pump
Method Validation Kit Symmetry 300™ Waters 186000194; 2,1 x 150 mm,
3,5 µm.

Waters 484, Tunable Absorbance Detector

3.1.3.1. Gradientensysteme

Injektionsvolumen: 10 µl

Säulentemperatur: 40°C

Absorption: 205 nm

Nächste Injektion nach 35 Minuten

High Pressure Limit: 3000 PSI

Startgradient

Laufmittel A: UHQ-Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Laufmittel B: 100 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Laufmittel D: 20 % Acetonitril

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Kanal			Kurvenart
		A [%]	B [%]	D [%]	
Initial	0,00	0	0	100	*
20	0,35	0	0	100	11
25	0,35	0	0	100	6
26	0,35	0	100	0	6
45	0,35	0	100	0	6
46	0,35	64	36	0	6
76	0,35	64	36	0	6
160	0,00	64	36	0	11

Tab.3.1.6: Startgradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β-Lactoglobulin

Nach der 76. Minute erfolgt die 1. Injektion.

Gradientenelution

Laufmittel A: UHQ-Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Laufmittel B: 100 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Kanal		Kurvenart
		A [%]	B [%]	
Initial	0,35	64	36	*
14	0,35	50	50	6
14,5	0,35	0	100	6
18	0,35	0	100	6
19	0,35	64	36	6
35	0,35	64	36	6
120	0,00	64	36	11

Tab.3.1.7: Probengradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin

Die Laufzeit pro Injektion beträgt 25 Minuten. Nach 35 Minuten kann die nächste aufbereitete Probe injiziert werden.

Endgradient

Laufmittel A: UHQ-Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Laufmittel B: 100 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure

Laufmittel D: 20 % Acetonitril

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Kanal			Kurvenart
		A [%]	B [%]	D [%]	
Initial	0,35	64	36	0	*
5	0,35	0	100	0	6
40	0,35	0	100	0	6
45	0,35	0	0	100	6
75	0,35	0	0	100	6
76	0,00	0	0	100	11

Tab.3.1.8: Endgradient zur Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin

3.1.3.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin

Chromatographisches Computersystem

Millenium³² Chromatographie Software Version 3.05.01, Waters

Computersystem

X86 Family, AT compatible, 128 MB
RAM, Windows NT 4.00.1381

Der Amount-Wert, welcher von Millennium Chromatographie Software berechnet wurde und im Resultfeld zur Darstellung kommt, ist gleichzusetzen mit dem Gehalt an β -Lactoglobulin bei Proben mit einer 1:10 Verdünnung. Der berechnete Gehalt des säurelöslichen Molkenproteins β -Lactoglobulin bei einer 1:5 Verdünnung muss halbiert werden.

3.1.3.3. Ermittlung der Reproduzierbarkeit

Aus dem arithmetischen Mittelwert und der Standardabweichung wird der Variationskoeffizient ermittelt, welcher eine geeignete Größe bezüglich Reproduzierbarkeit der jeweils angewandten Analyseverfahren darstellt.

Drei ESL-Proben (tiefgefroren) wurden für die Bestimmung herangezogen. Bei Milbona fand eine Aufarbeitung mit 6facher Injektion statt. Himmeltau Kinder-Vollmilch und NÖM Fasten wurden jeweils einer 3maligen Aufarbeitung unterzogen, wobei jede doppelt injiziert wurde. Die aufgetauten Milchproben wurden wie bei 3.1.2. beschrieben aufgearbeitet.

$$\text{VK [\%]} = (s/x') * 100$$

VK = Variationskoeffizient; s = Standardabweichung; x' = Mittelwert

3.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin mittels Nativer Polyacrylamidgelelektrophorese

3.2.1. Milchproben

Siehe 3.1.2. (tiefgefroren)

3.2.2. Probenaufbereitung

Geräte und Hilfsmittel

Siehe 3.1.2.

Gefriertrockenanlage

Edwards, Freeze Dryer Modulyo +
High

Vakuum Pump: Model 2M8 24747

Substanzen

Siehe 3.1.2.

TRIS

Roth

[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]

(> 99,3 %)

Glycin (99 %) p.a.

Roth 3908.3

Glyzerin (87 %)

Bio Chemica Appli Chem A0970.0500

Herstellung der Lösungen

2 M Salzsäure und Phosphatpuffer 0,1 M (pH 6,70)

Siehe 3.1.1.

Probenpuffer (= Elektrodenpuffer)

30 mg Tris und 144,2 mg Glycin in einen 25 ml Messkolben einwiegen, bis knapp unter dem Hals mit UHQ-Wasser auffüllen, zur Lösung bringen und weiter bis zur Marke mit Wasser ausfüllen.

1 % Bromphenolblaulösung mit Glycerin

1,5 mg Bromphenolblau in 150 µl UHQ-Wasser geben und gut vortexen. Danach Zugabe von 1500 µl 87 %igem Glycerin.

Durchführung

Siehe 3.1.2.

Nach Zugabe von 0,1 M Phosphatpuffer werden die Lösungen gut geschüttelt, bei Raumtemperatur inkubiert und eingefroren. Nach dem Auftauen werden 200 µl der 1:10 wie auch der 1:5 verdünnten Probelösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und rund 2 Stunden tiefgefroren. Über Nacht werden die Proben in der Gefriertrockenanlage bei -80°C lyophilisiert. (Eine Stunde vor dem Start der Gefriertrocknung wird die Kühlung eingeschaltet. Wenn die Temperatur von -80°C erreicht ist, werden die tiefgekühlten Proben in die Anlage gestellt, die Apparatur verschlossen, die Vakuumpumpe aktiviert und die Proben gefriergetrocknet).

Nach Zugabe von 100 µl Tris-Glycin-Probenpuffer erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 60 Minuten werden 11 µl 1 % Bromphenolblaulösung mit Glycerin dazu pipetiert, gut geschüttelt und aufgetragen.

3.2.3. Gelgießstand

Geräte und Hilfsmittel

Glasplatten	Hoefer (180 x 160 mm)
Zwischenstege (Kunststoff)	Hoefer
Laborfett	Gelseal
Platzhalter (Abstandhalter)	Hoefer
Schraubleisten (Befestigungsklemmen)	Hoefer
Gießstand	Hoefer
Klemmschrauben	
Filterpapier	Schleicher und Schüll

Aufbau

Auf einer Zellstoffunterlage werden zwei Glasplatten mit Alkohol gereinigt. Zwei Kunststoffstege werden mit Laborfett gefettet und am rechten und linken Rand einer Glasplatte platziert, dazwischen befindet sich ein Platzhalter. Die zweite Platte wird mit der gereinigten Innenseite darüber gelegt. Danach werden die Platten links und rechts mit zwei Schraubleisten locker fixiert, die Unterkante wird auf einer glatten Oberfläche ausgerichtet und die Schrauben werden angezogen. Der Platzhalter kann jetzt entfernt werden.

Der Gießstand wird gut gereinigt und die Gummileiste etwas mit Gelseal eingefettet. Danach werden die Platten mit der glatten Unterseite eingesetzt und mit Klemmschrauben links und rechts fixiert.

Um die Dichtheit dieser Apparatur zu testen, wird destilliertes Wasser eingefüllt. Dieses wird entfernt und mit Filterpapier der Gelgießstand getrocknet.

3.2.4. Herstellung der Gele

3.2.4.1. Trenngel

Geräte und Hilfsmittel

Glasgefäße (Bechergläser, Meßkolben)

Pipetten

Gilson

Parafilm

Pechiney

Ultraschallgerät

Bransonic 32

Kunststofftrichter

Filterpapier

Schleicher und Schüll

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.

Zitronensäure 1 M

Merck 818707.1000

TRIS

Roth

[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]

(> 99,3 %)

Acrylamid/Bis-Stammlösung

Serva P070081

40 % AA/Bis; 37,5:1; 2,6 %

TEMED

Fluka 07689

[Tetramethyl-ethylendiamin]

PER ultra

Fluka 09914

[Ammoniumpersulfat] (> 98 %)

Herstellung der Lösungen

Trenngelpuffer-Stammlösung (0,16 M Zitronensäure/1,5 M Tris)

18,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 3,677 g Zitronensäure-Monohydrat (entspricht 16 ml Zitronensäure 1 M) in Messkolben geben und auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen (4fach Konzentrat).

PER-Lösung 1,4 %ig

700 mg Perammoniumsulfat in einen 50 ml Messkolben transferieren, mit dest. Wasser lösen und bis zur Marke auffüllen.

Trenngelüberschichtungspuffer

7,5 ml Trenngelpuffer-Stammlösung und 22,5 ml dest. Wasser miteinander vermengen (1:4 Verdünnung der Trenngelpuffer-Stammlösung).

Durchführung

Wasser (destilliert) 40 % AA	26,25 ml
30 % AA	20 ml
Trenngelpuffer-Stammlösung	15 ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung (40 % AA/Bis, 37.5:1, 2,6 % C oder 30 % AA)	18,75 ml 25 ml
Ultraschallbad	
TEMED	300 µl
PER 1,4 %	Sommer: 350 µl Winter: 500 µl

Tab.3.2.1: Native PAGE – Trenngelherstellung für 2 Gele (12,5 %)

Die ersten drei Bestandteile werden in ein 100 ml Becherglas pipettiert, mit Parafilm überdeckt und im Ultraschallbad für rund fünf Minuten entgast. Danach

erfolgt die Zugabe der TEMED- und PER-Lösung und die Gele werden schnell gegossen. Vom oberen Rand her müssen mindestens 3,5 cm für die Sammelgele zur Verfügung stehen. Die noch zähen Gele werden mit 1 ml Aqua dest. bedeckt. Nach einer Polymerisierungszeit von 30 bis 40 Minuten wird das Wasser entfernt und die Trenngele mit Filterpapier getrocknet. Die Sammelgele werden jetzt gegossen. Wenn die Herstellung der Sammelgele erst am nächsten Tag erfolgt, werden die Trenngele mittels Trenngel-Überschichtungspuffer überschichtet und mit Parafilm überdeckt.

3.2.4.2. Sammelgel

Geräte und Hilfsmittel

Glasgefäße (Bechergläser, Meßkolben)

Pipetten

Gilson

Magnetrührer

Bibby (HB502)

Rührschiffchen

pH-Messgerät

Hanna instruments, pH 211 Micro-processor

Parafilm

Pechiney

Ultraschallgerät

Bransonic 32

Kunststofftrichter

Probenkamm (15er Probenteiler)

Hoefer

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.

Acrylamid/Bis Stammlösung

Serva P070081

40 % AA/Bis; 37,5:1; 3,3 %

TRIS

Roth

[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] (> 99,3 %)	
Zitronensäure 1 M	Merck 818707.1000
TEMED	Fluka 07689
[Tetramethyl-ethylendiamin]	
PER ultra	Fluka 09914
[Ammoniumpersulfat] (> 98 %)	
Glycin	Roth

Herstellung der Lösung

Elektrodenpuffer (pH 8,3)

12 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 57,68 g Glycin in Aqua dest. (rund 1 Liter) lösen und Zugabe von weiteren 9 Litern Aqua dest.

Durchführung

Wasser (destilliert)	10 ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung (40 % AA/Bis, 37.5:1, 3,3 % C oder 30 % AA/Bis)	2 ml 2,667 ml
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- Lösung (150 mg/ml dest. Wasser)	2 ml
Zitronensäure 1 M	500 µl
pH-Messgerät (Einstellung mittels 1 M Zitronensäure)	
Wasser (destilliert) – Mensur	20 ml
TEMED	140 µl
PER 1,4 %	500 µl

Tab.3.2.2: Native PAGE – Sammelgelherstellung für 2 Gele mit pH 7,2 (12,5 %)

Die ersten drei Bestandteile werden in ein 50 ml Becherglas pipettiert, mittels der Zitronensäure 1 M wird der pH auf 7,2 eingestellt, in eine Mensur transferiert und mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Die mit Parafilm abgedeckte Lösung wird im Ultraschallbad für rund fünf Minuten entgast. Danach erfolgt die Zugabe der TEMED- und PER-Lösung und das Sammelgel wird mittels Kunststofftrichter in die Vorrichtung gefüllt, ohne Blasen zu bilden. Danach werden die Probenkämme, die 1,5 cm vom Trenngel entfernt sein sollen, in das Sammelgel gegeben. Dies erfolgt schräg, um eine Blasenbildung zu verhindern. Nach der Polymerisation (30 Minuten) werden die Gele mit Elektrodenpuffer bedeckt und die Probenkämme entfernt. Die Probenaschen werden mit dem Elektrodenpuffer vor dem Auftragen der Proben noch gereinigt.

3.2.5. Auftragung und Elektrophoretische Auftrennung

Geräte und Hilfsmittel

Vertikalelektrophoresekammer	GE-Healthcare Sciences, SE 600 Ruby
Stromversorgung	Consort, E 143
Kühlthermostat	VWR, 1162 A
Kapillarspitzen	Biozyme
Magnetrührer	Bibby (HB502)
Rührschiffchen	

Substanzen

Siehe 3.2.4.2.

Herstellung der Lösung

Elektrodenpuffer (pH 8,3)

Siehe 3.2.4.2.

Durchführung

Die Kammer wird mit Elektrodenpuffer bis zur Markierung befüllt, Zugabe eines Magnetrührers und einschalten der Kühlung. Wenn die Temperatur von 15° C erreicht ist, wird der obere, abnehmbare Teil der Elektrophoreseapparatur mittels Schrauben an der Gelvorrichtung fixiert und im Elektrodenpuffer versenkt. Vorher werden jedoch noch die Probenaschen mit dem Elektrodenpuffer vor dem Auftragen der Proben noch gereinigt. Dieser obere Teil der Apparatur wird ebenfalls mit Elektrodenpuffer befüllt. Danach werden die Proben in die gut gespülten Probenaschen aufgetragen.

Auftragemenge: Referenz - Säuremolke: 13 µl; 1:10 Verdünnung: 26 µl (Rohmilch, pasteurisierte Milchen, ESL-Milchen: Natur aktiv Bio-Vollmilch, Bioness Bio-Vollmilch und Himmeltau Kinder-Vollmilch); 1:5 Verdünnung: 13 µl (UHT-Milchen, ESL-Milchen: Von A faire Milch bis NÖM Guten Morgen).

Der Deckel inklusive Stromversorgung wird angebracht und es wird eine Verbindung zwischen der Stromversorgung und den Elektroden hergestellt.

Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei einer Temperatur von 15° C und bei einer Spannung von 200 Volt bzw. 120 mA im Sammelgel (Dauer rund eine Stunde). Wenn die Lauffront 2 im Trenngel ist wird auf 400 Volt erhöht. Es bleibt bei 120 Milliampere (Dauer: < 4 Stunden).

Die elektrophoretische Auftrennung wird beendet, wenn die Lauffront sich 1 cm vor der unteren Grenze des Gels befindet. Die Versorgung mit Strom wird abgeschaltet und der Deckel entfernt. Der obere Teil der Elektrophoresekammer inklusive Gelvorrichtung wird herausgenommen und getrennt. Mittels

eines Kunststoffkeiles werden die zwei Kunststoffstege entfernt und die Platten getrennt. Es wird nun das Sammelgel abgetrennt und an der rechten Unterkante eine Markierung vorgenommen.

3.2.6. Färben, Entfärben und Scannen

Geräte und Hilfsmittel

Kunststoffkeil	Hofer
Färbewanne (mit Verschluss)	
Gitternetz	
Glasgefäße (Erlenmeyerkolben, Uhrglas)	
Faltenfilter 595 ½	Schleicher und Schüll
Entfärbewanne (mit Verschluss)	
Plastikschlauchfolie	VWR
Folienschweißgerät	Ciatronic 262702, FS 777, 260 V
Scanner	Sharp, JX-330
Software	Vice Versa Scan

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.	
Coomassie Serva Blue G-250	Serva 35050
Methanol (> 99 %)	Roth 8388.6
Essigsäure 100 %	Roth 3738.5

Herstellung der Lösungen

Färbelösung (0,15 % Serva Blue G-250): für 1,1 Liter (1 Gel)

400 ml Methanol werden in einen Erlenmeyerkolben transferiert, Zugabe von 1,5 g Coomassie Blue G-250 und die Öffnung mit einem Uhrglas bedecken. Nach Auflösung von Coomassie Blue G-250 wird 600 ml destilliertes Wasser und 100 ml 100 %ige Essigsäure dazugegeben. Nach 45 Minuten erfolgt eine Filtration der Färbelösung.

Entfärbelösung: für 10,7 Liter

3 l Methanol werden mit 7 l Wasser vermischt, danach erfolgt die Zugabe von 700 ml 100 %iger Essigsäure.

Durchführung

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung, Abtrennung des Sammelgels und Markierung wird das Gel mit einem Kunststoffnetz in die Färbelösung gelegt.

Diese wird entweder frisch hergestellt, wobei die Färbedauer etwa 30 Minuten beträgt bzw. es wird eine Färbelösung, die mittels Aktivkohle entfärbt wurde, verwendet. Die Färbung findet über Nacht statt.

Bei der Entfärbung wird die Lösung zwei bis drei Mal gewechselt in einem Zeitraum von acht Stunden bzw. bis das Gel eine ausreichende Helligkeit aufweist. Danach wird das Gel in einer Folie eingeschweißt.

Der Scanner muss vor dem Scanvorgang rund eine halbe Stunde vorher eingeschaltet werden. Das Gel wird aus der Folie entfernt und auf eine Platte, die aus Milchglas besteht, gelegt und mit der Entfärbelösung nochmals benetzt. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass sich unterhalb des Gels keine Luftblasen bilden.

Gescannt wird mit Durchlicht, Scan Modus: Graustufen, Auflösung: 200 dpi, Lampenfarbe: rot.

3.3. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

3.3.1. Milchproben und Probenaufbereitung

Milchproben

Siehe 3.1.2. (tiefgefroren)

Geräte und Hilfsmittel

Siehe 3.2.2.

Elektrischer Heizblock

Techne, DRI-Block DB 2D

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.

TRIS

Roth

[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]

(> 99,3 %)

Salzsäure 10 %

Bio Chemica Appli Chem

SDS

BioRad

[Natriumdodecylsulfat]

DDT [Dithiothreitol]

Bio Chemica Appli Chem

Bromphenolblau

Serva 35050

Glyzerin (87 %)

Bio Chemica Appli Chem A0970.0500

Herstellung der Lösungen

Tris-HCl-Puffer 50 mM Tris pH (7,2)

Einwaage von 0,3028 g Tris in ein 50 ml Becherglas und Zugabe von 45 ml UHQ-Wasser. Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 durch 10%ige HCL (in etwa 750 µl), Transfer in einen Messkolben und bis zur Marke auffüllen.

SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat) 10 %

In ein 50 ml Becherglas 5 g SDS einwiegen, Zugabe von 40 ml UHQ-Wasser, langsam rühren bis zur Lösung, in einen 50 ml Messkolben quantitativ transferieren und auffüllen bis zur Markierung.

Probenpuffer

600 µl Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,2 und 400 µl SDS 10 % miteinander mischen.

DDT-Lösung (Dithiothreit) 2,6 M

Einwaage von 250 mg DDT in ein Eppendorf und Zugabe von 500 µl UHQ-Wasser.

1 % Bromphenolblaulösung mit Glyzerin

1,5 mg Bromphenolblau mit 150 µl UHQ-Wasser mischen und gut vortexen. Danach Zugabe von 1500 µl 87 %igem Glyzerin.

Durchführung

Siehe 3.2.2.

Nach dem Auftauen werden jeweils 200 µl der 1:10 Verdünnungen und 100 µl der 1:5 Verdünnungen in Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und rund zwei Stunden tiefgefroren. Über Nacht werden die Proben in der Gefriertrockenanlage bei -80°C lyophilisiert.

Bei den gefriergetrockneten Proben kommt es zur Zugabe von 200 µl Probenpuffer (Tris-HCl/SDS) und 2 µl 2,6 M DDT-Lösung.

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wird 10 mg lyophilisierte Säuremilch (NÖM VM past.) eingewogen, 500 µl Probenpuffer (Tris-HCl/SDS) und 5 µl 2,6 M DDT-Lösung dazu pipettiert.

Anschließend werden sie bei 100° C für 10 Minuten gekocht. Nach ca. 10minütiger Abkühlzeit werden nochmals 2 µl 2,6 M DDT-Lösung zu den Probelösungen dazu pipettiert, bei der Referenz 5 µl 2,6 M DDT-Lösung. Es erfolgt die Zugabe von 22 µl 1 %iger Bromphenolblaulösung mit Glycerin bei den Probelösungen und bei der Referenzsäuremilch 55 µl und anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 10.000 Upm für 2 Minuten. Die Proben können jetzt auf das Gel aufgetragen werden.

Eingefrorene Proben werden aufgetaut, gut gevortext und bei 100° C 3 Minuten lang gekocht. Danach kurz zentrifugieren, abkühlen, Zugabe von 2,6 M DDT-Lösung und nochmalige Zentrifugation.

3.3.2. Herstellung der Gele

3.3.2.1. Trenngel

Geräte und Hilfsmittel

Siehe 3.2.4.1.

Magnetrührer

Bibby (HB502)

pH-Messgerät

Hanna instruments, pH 211 Microprocessor

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.

TRIS Roth

[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]
(> 99,3 %)

SDS BioRad

[Natriumdodecylsulfat]

Salzsäure 32 % Roth

Acrylamid/Bis-Stammlösung Serva P070081

40 % AA/Bis; 37,5:1; 2,6 % C

TEMED Fluka 07689

[Tetramethyl-ethylendiamin]

PER ultra Fluka 09914

[Ammoniumpersulfat] (> 98 %)

n-Butanol VWR

Herstellung der Lösungen

Trenngelpuffer-Stammlösung (1,5 Mol Tris; 0,4 % SDS) pH 8,8

In einem Becherglas (120 ml) Einwaage von 18,15 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 400 mg SDS (Dodecylsulfat-Natrium) und mit 70 ml UHQ-Wasser zur Lösung bringen.

68 ml 32 %ige HCl in einen 100 ml Messkolben pipettieren und mit Aqua dest. bis zur Marke auffüllen. Diese Lösung entspricht einer 6 n HCL.

Die vorherige Lösung wird mittels 6 n HCL (rund 16 ml) auf einen pH-Wert von 8,8 justiert. Transfer in einen 100 ml Messkolben und mit UHQ-Wasser ausfüllen (4fach Konzentrat; 90,75 g Tris/2 g SDS in 500 ml Aqua dest.).

Ammoniumpersulfat 10 %

Lösung von 100 mg PER in 1000 µl Aqua dest.

Butanol mit UHQ-Wasser gesättigt

50 ml n-Butanol werden mit 5 ml UHQ-Wasser vermischt.

Trenngel-Überschichtungspuffer

7,5 ml Trenngelpufferstammlösung werden mit 22,5 ml UHQ-Wasser vermischt (Verdünnung 1:4).

Durchführung

Wasser (destilliert) 40 % AA	22,5 ml
30 % AA	15 ml
Trenngelpuffer-Stammlösung	15 ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung (40 % AA/Bis, 37.5:1, 2,6 % C oder 30 % AA)	22,5 ml
	30 ml
Ultraschallbad	
TEMED	30 µl
PER 10 %	300 µl

Tab.3.3.1: SDS-PAGE – Trenngelherstellung für 2 Gele (15 %)

Siehe 3.2.4.1.

Die noch nicht auspolymerisierten Gele werden mit jeweils rund 1 ml Butanol, das mit UHQ-Wasser gesättigt ist, überschichtet. Nach rund 30 Minuten wird Butanol abgegossen, mit UHQ-Wasser gespült und mit Filterpapier getrocknet. Danach werden die Gele mit jeweils 3 ml Trenngel-Überschichtungs-Puffer bedeckt, mit Parafilm überdeckt und für rund 3 Stunden zur Auspolymerisation stehen gelassen bzw. über Nacht. Wenn die Gele fest sind, wird der Trenngel-Überschichtungs-Puffer entfernt und wieder mit Filterpapier getrocknet. Die Sammelgele werden jetzt gegossen.

68 ml 32 %ige HCl in einen 100 ml Messkolben pipettieren und mit Aqua dest. bis zur Marke auffüllen. Diese Lösung entspricht einer 6 n HCL.

Die vorherige Lösung wird mittels 6 n HCL (rund 11 ml) auf einen pH-Wert von 6,8 justiert. Transfer in einen 50 ml Messkolben und mit UHQ-Wasser ausfüllen (4fach Konzentrat; 6,056 g Tris/400 mg SDS in 100 ml UHQ-Wasser).

Elektrodenpuffer 250 mM Tris, 1 % SDS, 1,92 M Glycin pH 8,3

Auflösung von 30,28 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 144 g Glycin in zwei - drei Liter Aqua dest. und weitere Zugabe von rund 8 Liter UHQ-Wasser.

In einem Becherglas Einwaage von 10 g SDS und Zugabe von Aqua dest. bis zur Lösung. Beide Lösungen miteinander langsam vereinen.

Durchführung

Wasser (destilliert) 40 % AA	6,5 ml
Sammelgelpuffer-Stammlösung	2,5 ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung (40 % AA/Bis, 37.5:1, 2,6 % C oder 30 % AA)	1 ml 1,333 ml
Ultraschallbad	
TEMED	5 µl
PER 10 %	50 µl

Tab.3.3.2: SDS-PAGE – Sammelgelherstellung für 2 Gele (15 %)

Die ersten drei Bestandteile werden in ein 50 ml Becherglas pipettiert, mit Parafilm überdeckt und im Ultraschallbad für rund fünf Minuten entgast. Danach erfolgt die Zugabe der TEMED- und PER-Lösung und das Sammelgel wird mittels Kunststofftrichter in die Vorrichtung gefüllt, ohne Blasen zu bilden. Danach werden die Probenkämme, die 1,5 cm vom Trenngel entfernt sein sollen, in die Sammelgele gegeben. Dies erfolgt schräg, um eine Blasenbildung zu verhindern. Nach der Polymerisation (30 Minuten) werden die Gele mit

Elektrodenpuffer bedeckt und die Probenkämme entfernt. Die Probenaschen werden mit dem Elektrodenpuffer vor dem Auftragen der Proben noch gereinigt.

3.3.3. Auftragung und Elektrophoretische Auftrennung

Geräte und Hilfsmittel

Siehe 3.2.5.

Substanzen

Siehe 3.3.2.2.

Herstellung der Lösung

Elektrodenpuffer 250 mM Tris, 1 % SDS, 1,92 M Glycin pH 8,3

Siehe 3.3.2.2.

Durchführung

Siehe 3.2.6.

Auftragemenge: Marker: 13 μ l; Referenz - Säuremolke: 52 μ l; Rohmilch, pasteurisierte, ESL und UHT-Milch: 52 μ l.

Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei einer Temperatur von 15° C und bei einer Stromstärke von 60 mA bzw. 200 Volt im Sammelgel (Dauer: bis 1,5

Stunden). Wenn die Lauffront 2 cm im Trenngel ist wird auf 120 mA bzw. auf 400 Volt erhöht (Dauer: bis 3,5 Stunden).

Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung:

Siehe 3.2.5.

3.3.4. Färben, Entfärben und Scannen

Geräte und Hilfsmittel

Siehe 3.2.5.

Wasserbad

Lauda

Magnetrührer

Bibby (HB502)

Rührschiffchen

Brutschrank

Dipl. Ing. W. Ehret, BK 3

Substanzen

UHQ-Wasser bzw. Aqua dest.

Essigsäure 100 %

Roth

PhastGel Blue R

Pharmacia, R-350

Herstellung der Lösungen

Färbelösung für 2 Liter (2 Gele)

1,8 Liter Aqua dest. mit 200 ml 100 %iger Essigsäure vermischen und auf 50° C erhitzen. Zugabe einer Farbstofftablette PhastGel Blue R und bis zur vollständigen Lösung rühren.

Entfärbelösung, Essigsäure 10 % für 2 Liter

1,8 Liter Aqua dest. mit 200 ml 100 %iger Essigsäure mischen.

Durchführung

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung, Abtrennung des Sammelgels und Markierung wird das Gel mit einem Kunststoffnetz in die Färbelösung gelegt. In der Färbelösung wird das Gel bei 50° C im Wärmeschrank gefärbt.

Bei der Entfärbung wird die Lösung einmal gewechselt in einem Zeitraum von drei Stunden. Danach wird das Gel in einer Folie eingeschweißt.

Scannen:

Siehe 3.2.6.

4. Ergebnisse

4.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels RP-HPLC

Die Erfassung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin als Erhitzungsindikator in ESL-Milchen war der Focus meiner Arbeit.

4.1.1. Kalibration

Um β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin mittels RP-HPLC analysieren zu können, kam es zur Erstellung von Kalibrationskurven.

Die sechs Verdünnungslösungen der Standards werden jeweils einer Dreifach-Bestimmung unterzogen, um eine Kalibrationsgerade zu ermitteln. Durch die Peakflächen kann der Molkenproteingehalt unmittelbar analysiert werden.

Stufe	β -Lactoglobulin- gehalt [mg/L]	Amount	Stufe	β -Lactoglobulin- gehalt [mg/L]	Amount
	200	390832		1600	3961842
I	200	387654	IV	1600	4082699
	200	383438		1600	3807091
	400	832892		2400	6223302
II	400	827101	V	2400	6074574
	400	827598		2400	5907775
	800	1927877	VI	3200	7961219
III	800	1893982		3200	8062482
	800	1848318			

Tab.4.1.1: β -Lactoglobulin-Kalibrationswerte

Ergebnisse

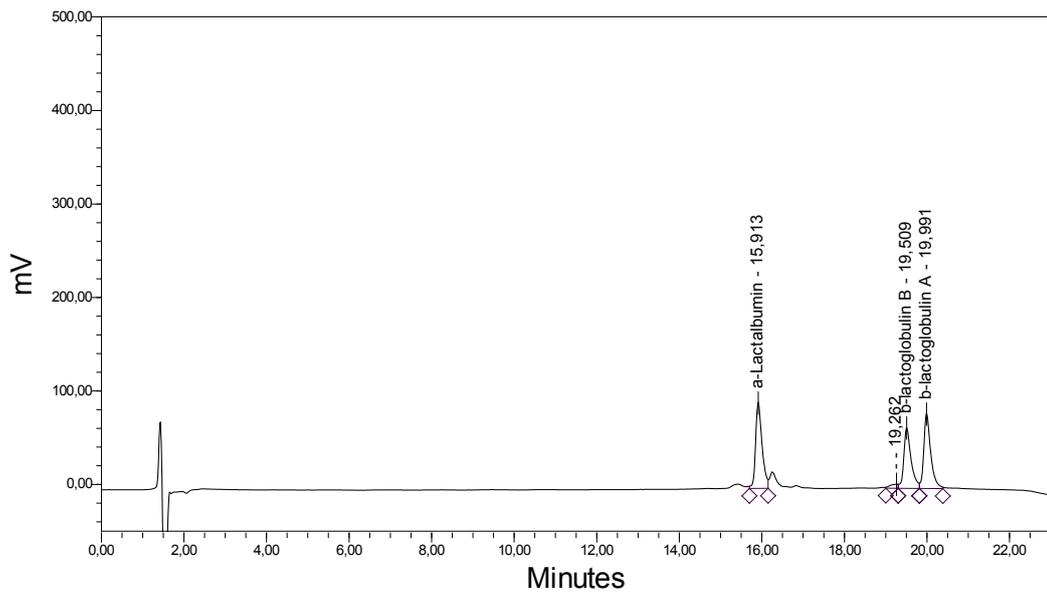


Abb.4.1.1: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe III (α -Lactalbumingehalt: 400 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 800 mg/L)

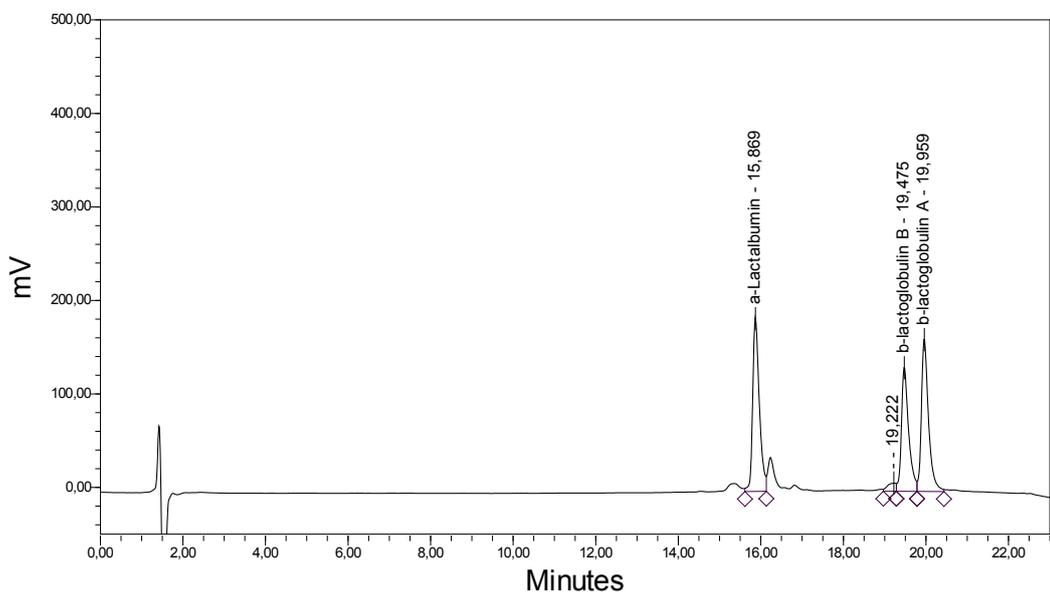


Abb.4.1.2: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe IV (α -Lactalbumingehalt: 800 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 1600 mg/L)

Ergebnisse

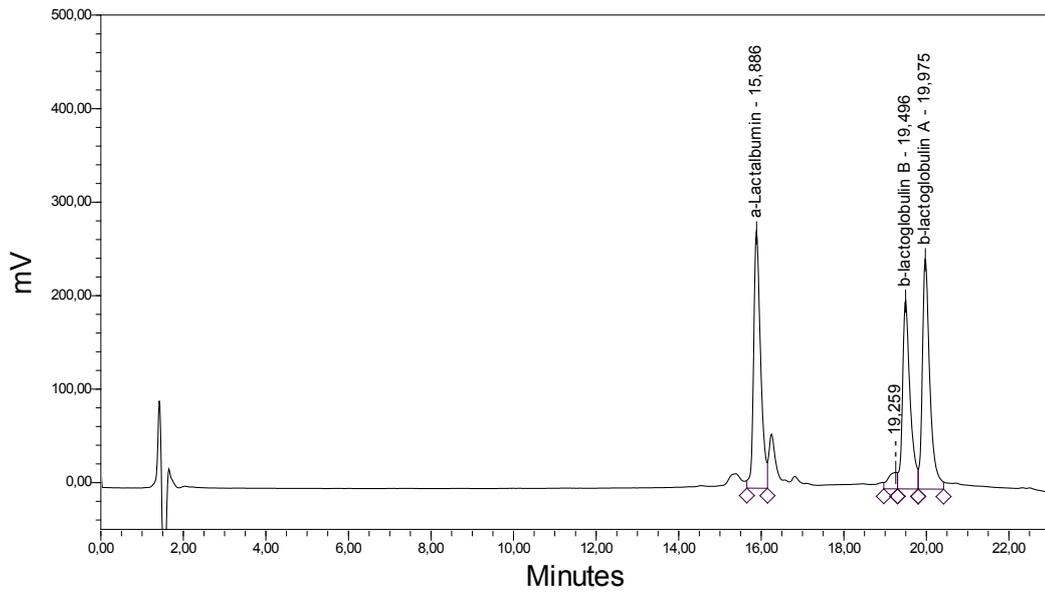


Abb.4.1.3: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe V (α -Lactalbumingehalt: 1200 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 2400 mg/L)

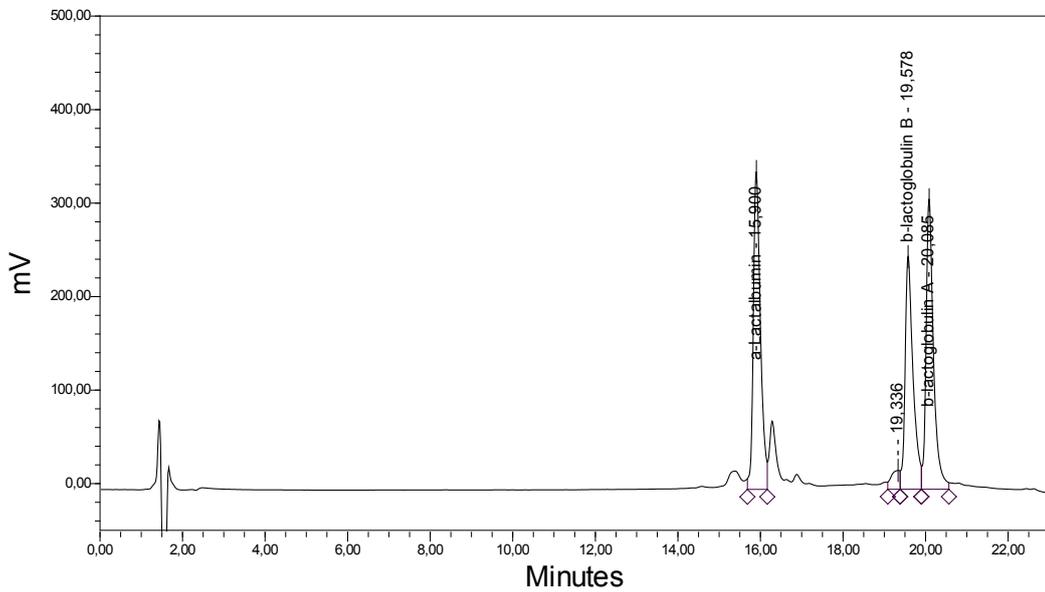


Abb.4.1.4: HPLC-Chromatogramm der Kalibrationsstandards für Molkenproteine, Verdünnungsstufe VI (α -Lactalbumingehalt: 1600 mg/L, β -Lactoglobulingehalt: 3200 mg/L)

Es erfolgte eine gute Auftrennung der Molkenproteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin von den Standardlösungen I bis VI.

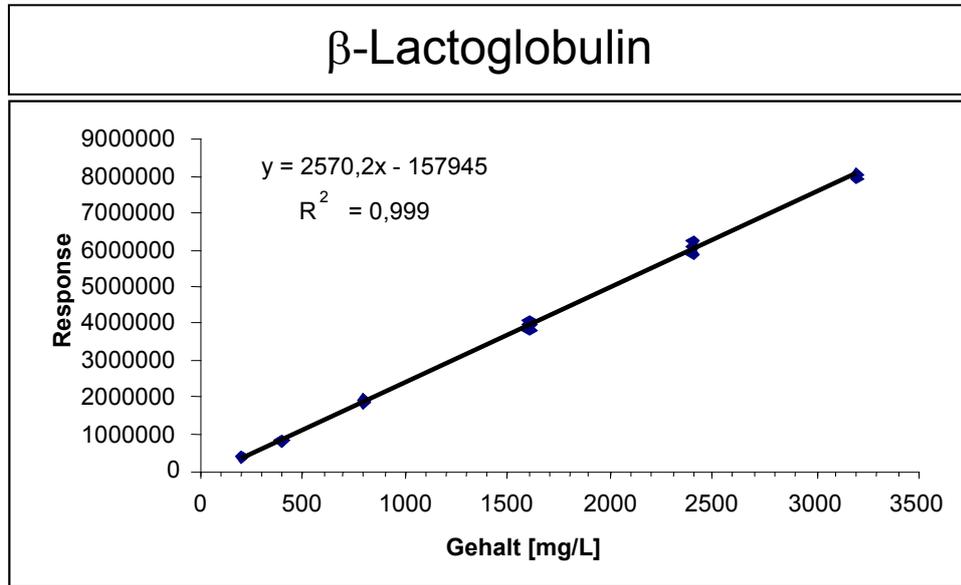


Abb.4.1.5: Kalibrationsgerade für die Ermittlung des Gehaltes an bovinen nativem β -Lactoglobulin

4.1.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin

Es wurden für die Bestimmung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin zwei Rohmilchen, acht pasteurisierte, 19 Extended-shelf-life und sieben UHT-Milchen herangezogen.

Bezeichnung	α -Lactalbumin	β -Lactoglobulin
	[mg/L]	[mg/L]
Amstetten	1326	3389
Erlach	1197	3182

Tab.4.1.2: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Rohmilchen

Ergebnisse

Bezeichnung	α-Lactalbumin [mg/L]	β-Lactoglobulin [mg/L]
Clever Vollmilch	1249	3460
NÖM Vollmilch	1222	3398
Almsana Vollmilch	1254	3274
Echt Bio Vollmilch	1188	3200
Spar Naturpur Bio Vollmilch	1150	3135
Ja natürlich Halbfett	1227	2966
Ja natürlich Kinder-Frischmilch	1224	2905
Ja natürlich Extra Vollmilch	1152	2871

Tab.4.1.3: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in pasteurisierten Milchen

Bezeichnung	α-Lactalbumin [mg/L]	β-Lactoglobulin [mg/L]
Natur aktiv Bio-Vollmilch	1083	2696
Milbona	1083	2644
NÖM Laktosefrei	1150	2626
NÖM Halbfett	1135	2525
Bioness Bio-Vollmilch	947	2478
NÖM Vollmilch	1048	2403
Die leichte Muh	1101	2249
Himmeltau Kinder-Vollmilch	973	2021
A faire Milch	1009	1882
Ja natürlich Vollmilch	621	400
Spar Bio-Vollmilch	590	363
Ja natürlich Leichtmilch	591	331
Spar Laktosefrei	618	331
Milchkanne	373	251
Schärdinger – Die schlanke Linie	560	248
Bio Bio Vollmilch	331	238

Ergebnisse

NÖM Schulmilch	351	199
NÖM Fasten	359	199
NÖM Guten Morgen	329	189

Tab.4.1.4.: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Extended- shelf-life Milchen

Bezeichnung	α-Lactalbumin [mg/L]	β-Lactoglobulin [mg/L]
Maresi – Die Leichte	424	272
Clever leicht	189	213
Gmundner Milch	235	206
Maresi – Die Volle	338	203
Spar	182	193
Viva Vital Laktosefrei	151	181
Formil – Die Leichte	157	150

Tab.4.1.5: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in UHT-Milchen

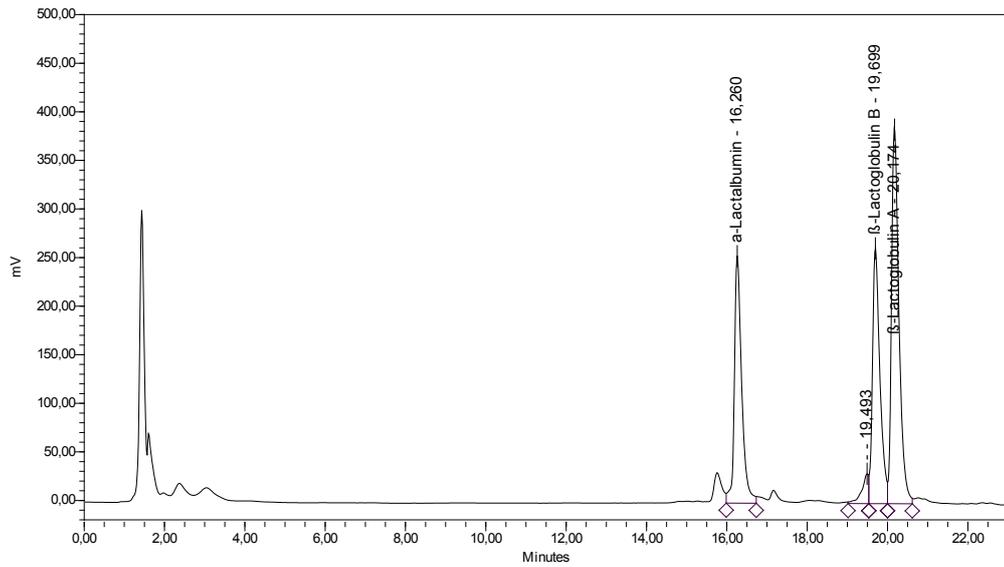


Abb.4.1.6: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Clever Vollmilch (Pasteurisiert)

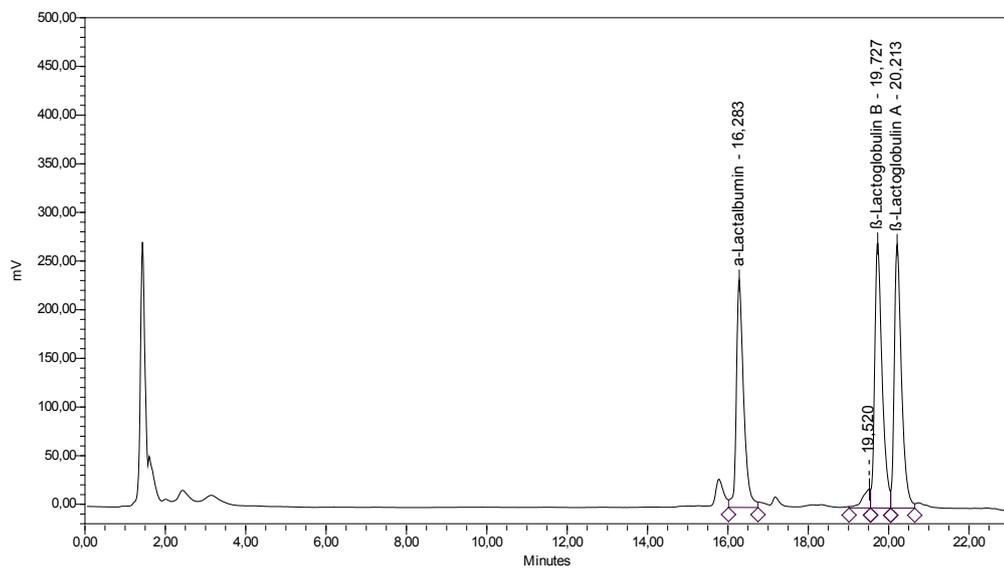


Abb.4.1.7: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Ja natürlich Extra Vollmilch (Pasteurisiert)

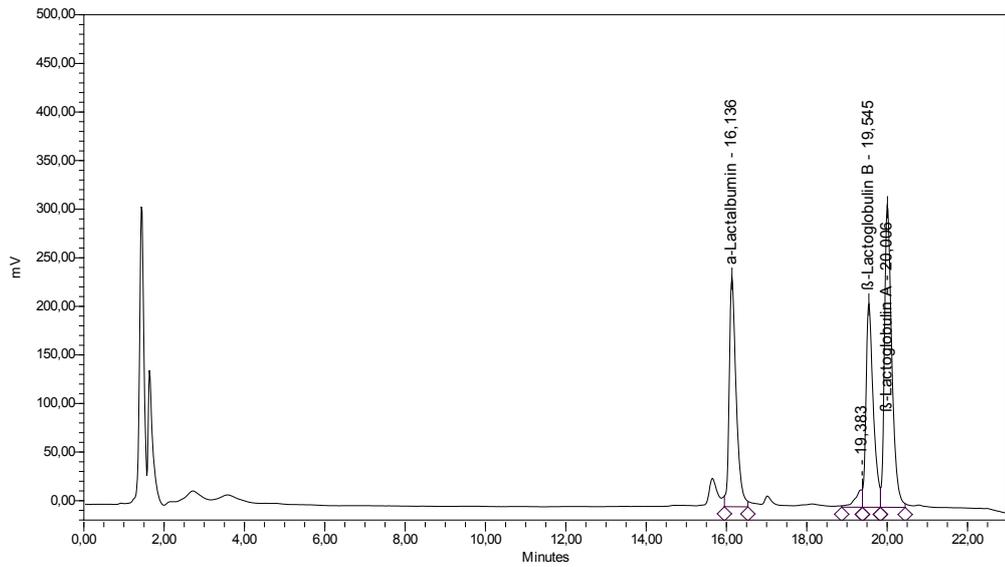


Abb.4.1.8: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Natur aktiv Bio-Vollmilch (Extended-shelf-life)

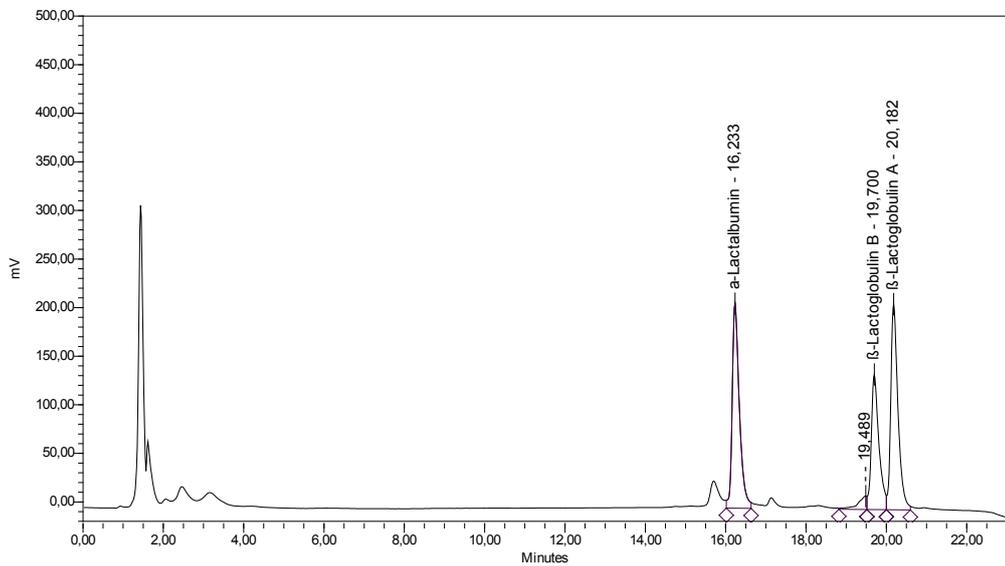


Abb.4.1.9: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in A faire Milch (Extended-shelf-life)

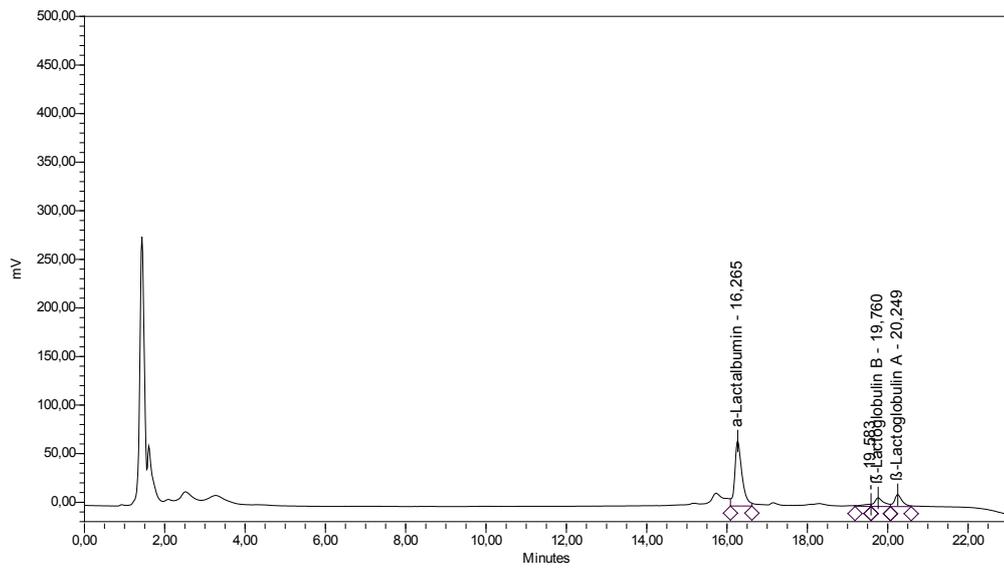


Abb.4.1.10: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in NÖM Guten Morgen (Extended-shelf-life)

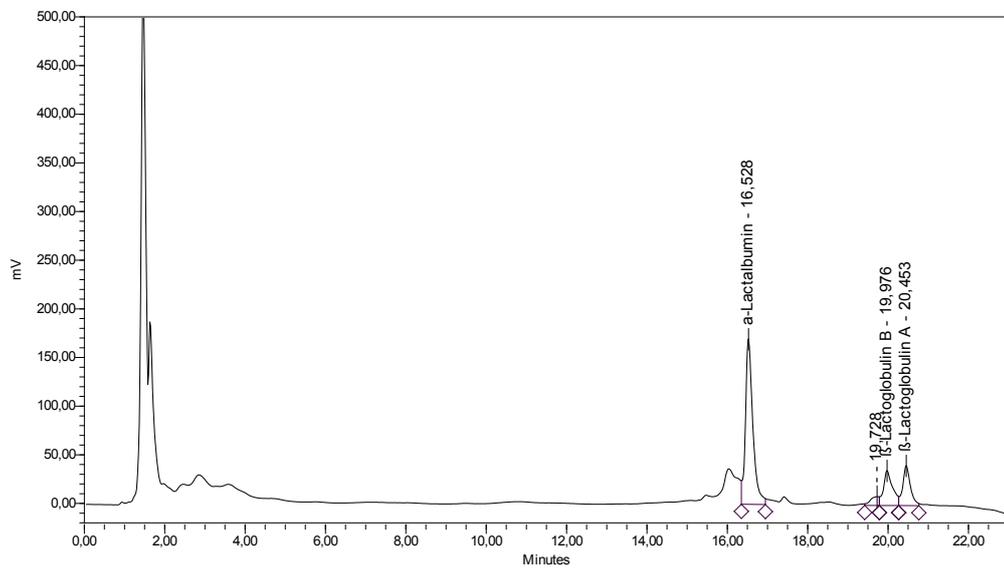


Abb.4.1.11: HPLC-Chromatogramm von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Maresi – Die Leichte (UHT)

4.1.3. Reproduktionsermittlung

Durch Mehrfachbestimmungen von drei Extended-shelf-life Milchen (Milbona, Himmeltau Kinder-Vollmilch und NÖM Fasten, aufgetaut) wurde die Präzision überprüft. Aus den jeweiligen Messergebnissen wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt, um den Variationskoeffizienten zu bestimmen.

Milbona (Tiefgefrorene Probe vom Dezember 2007)

Injektionen	α-Lactalbumin [mg/L]	β-Lactoglobulin [mg/L]
1	1014	2694
2	1012	2673
3	1012	2685
4	1000	2649
5	1004	2683
6	1000	2685

Tab.4.1.6: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Milbona bei einmaliger Aufarbeitung und sechsfacher Injektion

	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)
α -Lactalbumin	1007	6,5	0,6
β -Lactoglobulin	2678	15,9	0,6

Tab.4.1.7: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei Milbona

Himmeltau-Kinder-Vollmilch (Tiefgefrorene Probe von November 2007)

Injektionen	α -Lactalbumin [mg/L]	β -Lactoglobulin [mg/L]
I.1.	1056	2126
I.2.	1034	2105
II.1.	1054	2129
II.2.	1036	2086
III.1.	998	2026
III.2.	982	1992

Tab.4.1.8: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Himmeltau Kinder-Vollmilch bei dreimaliger Aufarbeitung und jeweiliger Doppelinjektion

	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)
α -Lactalbumin	1027	13,1	1,3
β -Lactoglobulin	2077	23,2	1,1

Tab.4.1.9: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei Himmeltau Kinder-Vollmilch

NÖM Fasten (Tiefgefrorene Probe von November 2007)

Injektionen	α -Lactalbumin [mg/L]	β -Lactoglobulin [mg/L]
I.1.	396	200
I.2.	391	201
II.1.	392	200
II.2.	390	204
III.1.	393	202
III.2.	393	203

Tab.4.1.10: Gehalt [mg/L] von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in NÖM Fasten bei dreimaliger Aufarbeitung und jeweiliger Doppelinjektion

	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)
α -Lactalbumin	393	2,1	0,5
β -Lactoglobulin	202	1,4	0,7

Tab.4.1.11: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin bei NÖM Fasten

4.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels Nativer und Sodium-Dodecyl-Sulfat-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung erlaubt qualitative Aussagen bezüglich der Molkenproteine inklusive deren genetischen Varianten. Die Messergebnisse des nativen β -Lactoglobulin mittels RP-HPLC sollen durch diese Methoden optisch dargestellt werden.

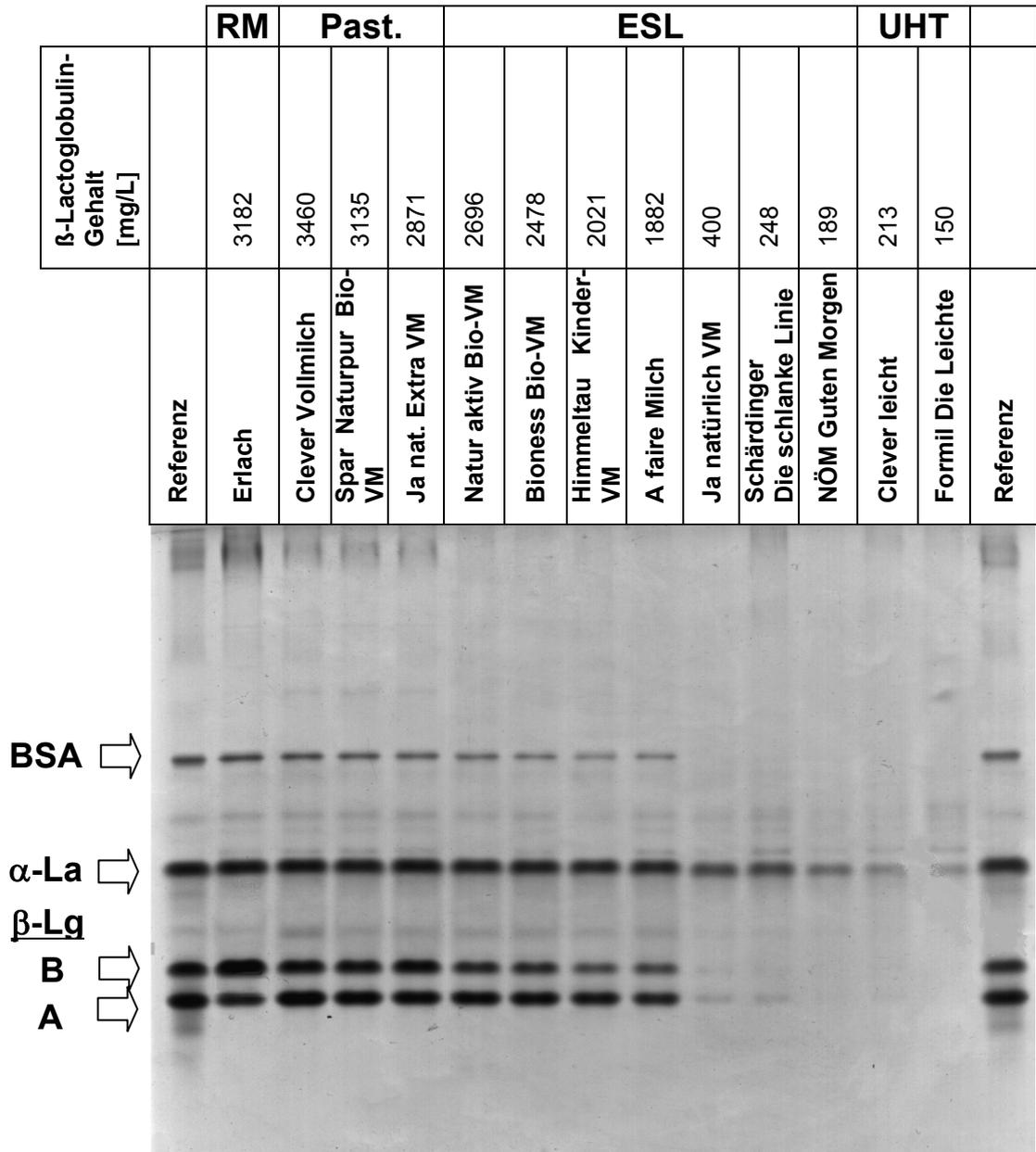


Abb.4.2.1: Natives Polyacrylamidgel (12,5 %) der Molkenproteinfraktionen von Roh- (RM), pasteurisierten (Past.), ESL- und UHT-Milchen.

Auftragemenge: Referenz: 13 µl, 1:10 Verdünnung: 26 µl (Rohmilch, pasteurisierte Milchen, ESL-Milchen: Natur aktiv Bio-Vollmilch, Bioness Bio-Vollmilch und Himmeltau Kinder-Vollmilch), 1:5 Verdünnung: 13 µl (UHT-Milchen, ESL-Milchen: Von A faire Milch bis NÖM Guten Morgen).

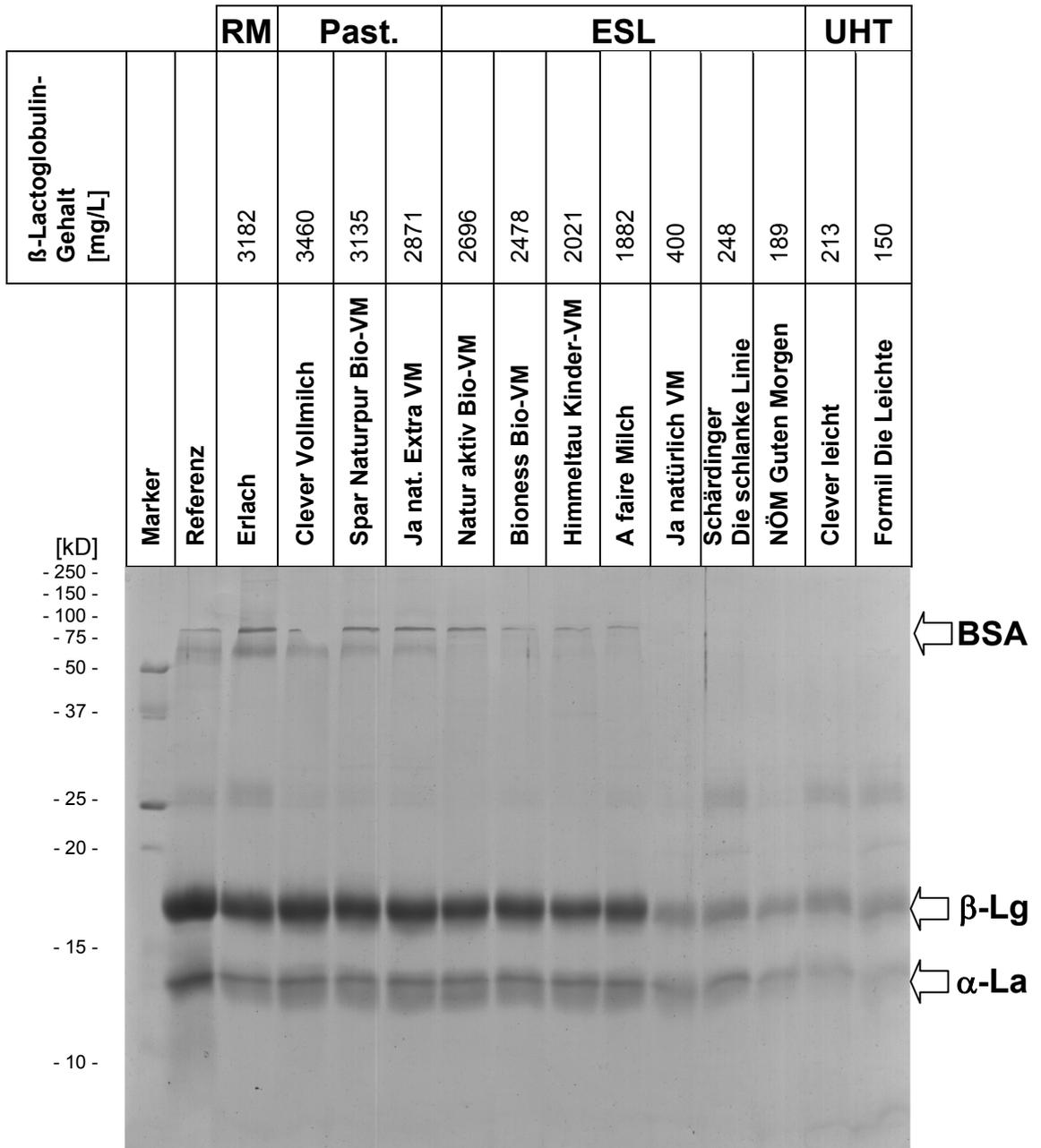


Abb.4.2.2: SDS-Polyacrylamidgel (15 %) der Molkenproteinfraktionen von Roh- (RM), pasteurisierten (Past.), ESL- und UHT-Milchen.

Auftragemenge: Marker: 13 µl, Referenz, Rohmilch, pasteurisierte, ESL und UHT-Milch: 52 µl.

5. Diskussion

5.1. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch mittels RP-HPLC

Der Gehalt des Hauptmolkenproteins β -Lactoglobulin kann mittels RP-HPLC sehr gut nachgewiesen werden.

5.1.1. Chromatographisches System und Probenaufbereitung

Als stationäre Phase wurde eine Reversed Phase Säule 2,1 x 150 mm mit einer Partikelgröße von 3,5 μm verwendet. Die geringe Partikelgröße der verwendeten Säule bewirkt eine hohe Trennleistung, ist jedoch auch anfälliger für Verschmutzungen. Dieses Problem trat während meiner gesamten Analysezeit nicht auf, da eine regelmäßige Reinigung der Säule durchgeführt wurde.

Als polare Eluenten werden Acetonitril und UHQ-Wasser verwendet, welche mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure versetzt werden (Laufmittel A: UHQ-Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure, Laufmittel B: 100 % Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure).

Die verwendeten Laufmittel weisen einen hohen Reinheitsgrad auf, da Verunreinigungen zu zusätzlichen Peaks (Geisterpeaks) im Chromatogramm führen können. Sie wurden vor dem Einsatz filtriert.

Die UV-Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 205 nm durchgeführt. Die Chromatogramme weisen eine gute Auflösung der Peaks auf.

Die im IDF Standard 178A:1999 beschriebene Probenaufbereitung ist sehr gut wiederzugeben.

5.1.2. β -Lactoglobulingehalt in Kuhmilch

Die durchschnittliche Zusammensetzung der Kuhmilch ist abhängig von der Gattung, Altersklasse, Futtermitteln, Haltung und gesundheitlichem Wohlbefinden (SPREER, 2005; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999) sowie von Genetik, Laktationsverlauf und Umgebungsbedingungen (KRÖMKER und BRUCKMAIER, 2007).

Der Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in Kuhmilch unterliegt großen saisonalen Schwankungen und ist abhängig von den jeweils eingesetzten Erhitzungsverfahren (Zeit-Temperatur-Bedingungen) sowie von diversen Faktoren der Lagerung.

Dieses Molkenprotein ist ein geeigneter Indikator im Bereich der Pasteurisation, ab einer Temperatur von $> 62^\circ \text{C}$, sowie im Hoherhitzungs- ($86^\circ - 125^\circ \text{C}$) und Ultrahoherhitzungsbereich (140°C).

Von den zwei Hauptmolkenproteinen ist β -Lactoglobulin der geeignetere Hitzeindikator wegen der geringeren Hitzestabilität (SCHLIMME et al., 1996).

Ein bestehender Zusammenhang der β -Lactoglobulin-Denaturierung mit dem Fettgehalt ist noch strittig, der Laktosegehalt beeinflusst diesen protektiv (CLAEYS et al., 2002).

Aufgrund des hohen Anteils an essentiellen α -Aminosäuren (Vor allem Lysin) ist das β -Lactoglobulin ernährungsphysiologisch von sehr großer Bedeutung (SPREER, 2005).

Die allergieauslösenden Eigenschaften der Proteine in der Kuhmilch, vor allem β -Lactoglobulin, kann durch diverse Herstellungsprozesse (Erhitzung mit hohen Temperaturen etc.) herabgesenkt werden (EL-AGAMY, 2007). Erfolgt eine Kombination von physikalischen mit enzymatischen Behandlungen kommt es ebenfalls zu einer Reduktion der Proteinunverträglichkeit (MAIER et al., 2006).

5.1.2.1. β -Lactoglobulingehalt der Rohmilchproben

Der durchschnittliche β -Lactoglobulin-Gehalt für Rohmilch liegt bei 3300 – 3500 mg/L (SCHLIMME et al., 1996; BRANDL, 1997).

Bei den untersuchten Chargen weisen die pasteurisierten Milchen Clever Vollmilch und NÖM Vollmilch einen höheren Gehalt an nativem β -Lactoglobulin auf, als die beiden Rohmilchproben Amstetten und Erlach.

Es ist sehr auffallend, dass die Rohmilch Erlach einen so deutlich geringen Gehalt an nativem β -Lactoglobulin (3182 mg/L) aufweist. Dies ist höchstwahrscheinlich auf saisonale Schwankungen bzw. eine Erwärmung $> 40^\circ \text{C}$ zurückzuführen.

Der ermittelte β -Lactoglobulin-Gehalt von den pasteurisierten Milchen Almsana Vollmilch und Echt Bio Vollmilch ist ebenfalls höher als jener der Rohmilch Erlach. Diese pasteurisierten Milchen wurden einer sehr schonenden Erhitzung unterzogen.

Die angegebenen Rohmilchwerte des nativem β -Lactoglobulin in diversen Literaturen liegen um ein vielfaches höher als meine analysierten Ergebnisse (SCHLIMME et al., 1996; CLAEYS et al. 2004).

5.1.2.2. β -Lactoglobulingehalt der pasteurisierten Milchproben

Pasteurisierte Milchen weisen eine hohe ernährungsphysiologische Qualität aufgrund des eingesetzten schonenden Erhitzungsverfahrens auf.

Der Mindestgehalt an nativem β -Lactoglobulin für Kurzzeitpasteurisierung ist bei 2600 mg/L und für Hochpasteurisierung bei 2000 mg/L festgelegt (SCHLIMME et al., 1996; BRANDL, 1997; CLAEYS et al., 2004).

Bei den acht analysierten, pasteurisierten Milchen liegen die Messwerte deutlich oberhalb der empfohlenen Mindestgrenzwerte laut Literatur. Diese pasteurisierten Milchen wurden einer Kurzzeiterhitzung unterzogen.

RABA (2008) ermittelte ebenfalls den Gehalt an nativem β -Lactoglobulin bei unterschiedlich hoch erhitzten Milchen (anderer Chargen). Bei der Gegenüberstellung meiner ermittelten nativen β -Lactoglobulin-Gehalte mit jenen von RABA werden nur sehr geringe Abweichungen festgestellt. Diese sind auf saisonalen Schwankungen zurückzuführen.

Die β -Lactoglobulin-Werte im Bereich der Pasteurisation bei SCHLIMME et al. (1996) liegen um vielfaches höher als meine analysierten Messwerte. Bei ELLIOTT et al. (2003) ist der β -Lactoglobulin-Gehalt in pasteurisierten Milchen im Bereich von 3203 - 1392 mg/L angesiedelt.

5.1.2.3. β -Lactoglobulingehalt der ESL-Milchproben

Die Extended-shelf-life Milch hat in der heutigen Gesellschaft einen sehr hohen Stellenwert aufgrund der verlängerten Haltbarkeit im Bezug auf pasteurisierte Milch und des höheren Nährstoffgehaltes im Vergleich zur UHT-Milch.

DYCK (1999) setzt den Mindestwert an nativem β -Lactoglobulin bei 1800 mg/L fest, bei GALLMANN et al. (2001) liegt die untere Grenze bei 1600 mg/L.

Die Analyse der 19 ESL-Proben zeigten erstaunliche Ergebnisse. Natur aktiv Bio-Vollmilch, Milbona, NÖM Laktosefrei, Bioness Bio-Vollmilch, NÖM Halbfett, NÖM Vollmilch, Die leichte Muh und Himmeltau Kinder-Vollmilch wiesen β -Lactoglobulin-Gehalte deutlich oberhalb der erwähnten Mindestgrenzwerte auf.

A faire Milch mit einem nativen β -Lactoglobulin-Gehalt von 1882 mg/L liegt auch noch knapp über dem Mindestwert.

Die restlichen analysierten ESL-Milchen zeigen einen deutlichen Sprung im Bezug auf den β -Lactoglobulin-Gehalt. Ja natürlich Vollmilch, Spar Bio-Vollmilch, Ja natürlich Leichtmilch, Spar Laktosefrei weisen einen β -Lactoglobulin-Gehalt im Bereich von 400 - 331 mg/L auf. Bei Milchkanne, Schärddinger – Die schlanke Linie, Bio Bio Vollmilch, NÖM Schulmilch, NÖM Fasten und NÖM Guten Morgen liegen die Gehalte des β -Lactoglobulins unterhalb der UHT-Milch

Maresi – Die Leichte (272 mg/L). Die Herstellung dieser ESL-Milchen erfolgte höchstwahrscheinlich auf UHT-Anlagen. Die zuletzt erwähnten ESL-Milchen können aus diesem Grund qualitativ der UHT-Milch gleichgesetzt werden und bedürfen im Verkaufsgebäude keiner kühlen Lagerung.

Es ist sehr erschreckend, dass von 19 analysierten ESL-Milchen nur neun den Qualitätsanforderungen einer ESL-Milch entsprechen.

Einige ESL-Milchen, vor allem NÖM Schulmilch, werden für Kinder als geeignete Trinkmilch angepriesen, obwohl eine verminderte ernährungsphysiologische Qualität vorliegt. Bei Himmeltau Kinder-Vollmilch soll der hohe Gehalt von Calcium, Kalium, Magnesium und Vitamin D zum Kauf animieren.

Die Konsumenten werden teilweise auch zum Kauf verführt, wenn zum Beispiel wie bei Spar Laktosefrei ein hoher Gehalt an Calcium angepriesen wird, obwohl dieses Produkt mit einer UHT-Milch gleichzusetzen ist. Schärtinger – Die schlanke Linie und NÖM Guten Morgen locken zusätzlich noch mit einem hohen Ballaststoffgehalt bzw. mit Vitamin D-Zusatz.

Die ermittelten β -Lactoglobulin-Werte werden mit jenen von RABA (2008) verglichen, um etwaige Unterschiede zu ermitteln. Die analysierten Ergebnisse bei NÖM Laktosefrei, Ja natürlich Leichtmilch, Spar Laktosefrei, NÖM Schulmilch, NÖM Guten Morgen und NÖM Fasten weichen nur sehr gering von meinen ermittelten Werten ab. Saisonale Schwankungen sind auch hierfür wieder der Grund.

Bei A faire Milch ist eine deutlich Abweichung des Gehaltes an β -Lactoglobulin zu erkennen. RABA (2008) ermittelte einen Wert von 2690 mg β -Lactoglobulin/L (MHD 02.03.2007), welcher um über 800 mg höher liegt, als der von mir analysierte Wert. Meine analysierte Charge von A faire Milch wurde bei hohen Erhitzungstemperaturen hergestellt.

Geringere Unterschiede im β -Lactoglobulin-Gehalt sind auch bei Himmeltau Kinder-Vollmilch und NÖM Vollmilch nachzuweisen.

5.1.2.4. β -Lactoglobulingehalt der UHT-Milchproben

Milchen, welche durch UHT (Ultra high temperature processing) -Verfahren hergestellt werden, besitzen eine längere Haltbarkeit, welche mit hohen Nährstoffverlusten einhergeht.

Der Mindestgehalt an nativem β -Lactoglobulin liegt laut GALLMANN et al. (2001) bei 700 mg/L für direkte UHT-Verfahren bzw. bei 150 mg/L für indirekte UHT-Verfahren.

Bei der Analyse von sieben UHT-Milchen einer bestimmten Charge lagen die β -Lactoglobulin-Gehalte oberhalb bzw. an der Grenze des genannten Mindestgehaltes des indirekten UHT-Verfahrens (272 - 150 mg/L).

Auch hier wurden die ermittelten β -Lactoglobulin-Werte von RABA (2008) zu Vergleichszwecken herangezogen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Milchen auf Anlagen der gleichen Bauart dem Erhitzungsprozess unterzogen wurden.

Die angegebenen Gehalte des nativen β -Lactoglobulins in diversen Literaturen liegen im selben Bereich bzw. etwas höher als meine analysierten Ergebnisse (SCHLIMME et al., 1996; CLAEYS et al. 2004; ELLIOTT et al., 2003).

5.1.3. Reproduktionsüberprüfung

Bei der Überprüfung der Präzision wurden drei ESL-Milchen aufgetaut, der Probenaufbereitung unterzogen und mittels RP-HPLC analysiert.

Bei Milbona (Einfrierdauer: 7 Wochen) zeigten sich nach einmaliger Aufarbeitung und sechsfacher Injektion keine signifikanten Unterschiede im β -Lactoglobulin-Gehalt. Dies traf auch bei Himmeltau Kinder-Vollmilch (Einfrierdauer: 4 ½ Wochen) und NÖM Fasten (Einfrierdauer: 4 Wochen), welche einer jeweils dreifachen Aufarbeitung und Doppelinjektionen unterzogen

wurden, zu. Daraus ergibt sich, dass Einfrieren keinen Verlust an nativem β -Lactoglobulin bei oben erwähnter Einfrierdauer zur Folge hat.

Bei Himmeltau Kinder-Vollmilch wird bei β -Lactoglobulin ein Variationskoeffizient von 1,1 % ermittelt, bei NÖM Fasten liegen die Werte bei 0,7 %. Die Grenze dieser einfachen Bestimmungen liegt bei 3 %. Daraus ergibt sich eine hohe Präzision des chromatographischen Systems bzw. minimalste Fehler bei der Aufarbeitung der Proben.

Der ermittelte Wert der ESL-Milchprobe Milbona liegt auch noch knapp unterhalb der definierten Grenze (0,7 %), begründet durch Abweichungen bei der Probenaufarbeitung.

5.2. Ermittlung des Gehaltes an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milchen mittels Nativer und SDS-PAGE

Um den Denaturierungsgrad der Molkenproteine durch elektrophoretische Verfahren qualitativ zu ermitteln, wurde eine Native und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

Bei Durchführung einer SDS-PAGE ist die richtige Menge an Natriumdodecylsulfat und DDT als Reduktionsmittel sehr wichtig. SDS führt zu einer Denaturierung der Proteine. Dies bewirkt, dass die Proteine eine ähnlich negative Ladung aufweisen (HOEFER, 1994).

Die Auftragemenge ist von sehr großer Bedeutung. Bei einer geringen Auftragemenge sind die Intensitäten der Banden sehr schwach. Eine geringere Trennleistung tritt bei großen Auftragemengen auf.

Es wurden 13 ausgewählte, tiefgefrorene Milchproben (Eine Rohmilch, drei pasteurisierte Milchen, acht ESL-Milchen und zwei UHT-Milchen) zur qualitativen Bestimmung des β -Lactoglobulins herangezogen.

Die Reihenfolge der Auftragung der Milchproben erfolgte mit absteigendem β -Lactoglobulingehalt, welcher mittels RP-HPLC ermittelt wurde. Als Standard diente eine Säuremolke, welche für die Ermittlung der Proteingröße wichtig ist. Nach Beendigung der Elektrophorese und Färbung wurde die Position bestimmt.

Die jeweilige Art des eingesetzten Erhitzungsverfahrens ist durch die Intensität der Banden des β -Lactoglobulins sehr gut ersichtlich.

Bei der Nativen Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt die Trennung aufgrund der elektrischen Ladung (HOEFER, 1994).

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt die Trennung aufgrund des Molekulargewichtes (MEHRENS und MÜLLER, 1991).

β -Lactoglobulin (A + B) wird bei einem Molekulargewicht von rund 18 kDa, α -Lactalbumin bei etwa 14 kDa lokalisiert.

Bei beiden Formen der Polyacrylamidgelelektrophorese ist ersichtlich, dass die ESL-Milchen Ja natürlich Vollmilch und Schärdinger – Die schlanke Linie β -Lactoglobulin-Gehalte aufweisen, welche im Bereich von UHT-Milchen anzusiedeln sind.

6. Schlussbetrachtung

Der Nachweis des säurelöslichen β -Lactoglobulins zur Klassifizierung der eingesetzten Erhitzungsverfahren ist von sehr großer Bedeutung. Dadurch können Rückschlüsse auf die Beeinträchtigung der ernährungsphysiologischen und sensorischen Qualität gezogen werden.

Die Analyse des nativen β -Lactoglobulins als Erhitzungsindikator in unterschiedlich hoch erhitzten Milchen mittels RP-HPLC erweist sich als gut durchführbar. Der eingesetzte Probengradient weist eine optimale Trennleistung und eine relativ kurze Analysedauer von 25 Minuten auf. Es wurden auch elektrophoretische Verfahren (Native und SDS-PAGE) zum qualitativen Nachweis der Molkenproteinfraktionen durchgeführt.

Die mittels RP-HPLC analysierten Extended-shelf-life Milchen weisen eine große Bandbreite des β -Lactoglobulingehaltes auf. Weniger als die Hälfte der untersuchten ESL-Milchen besitzen einen Wert oberhalb des empfohlenen Mindestgehaltes von 1800 mg/L. Die anderen sind bezüglich ihrer Qualität mit UHT-Milchen gleichzusetzen, da die Inhaltsstoffe stark durch nicht schonende Behandlung beeinträchtigt wurden. Die zuletzt erwähnten ESL-Milchen wurden auf UHT-Anlagen dem Erhitzungsprozess unterzogen und sollten nicht als Konsummilch bevorzugt werden.

Von den untersuchten Rohmilchen konnte nur bei einer Probe der durchschnittliche β -Lactoglobulin-Gehalt bestätigt werden. Saisonale Schwankungen bzw. eine Erwärmung $> 40^\circ \text{C}$ sind hierfür die Gründe.

Bei den pasteurisierten und UHT-Milchen wurden die empfohlenen Mindestgehalte für Kurzzeitpasteurisierung (2600 mg/L) bzw. indirekte UHT-Erhitzung (150 mg/L) an nativem β -Lactoglobulin überschritten. Dies weist auf eine schonende Wärmebehandlung der Milch hin.

Die Native und SDS-PAGE zeigen eine gute Trennung der einzelnen Molkenproteinfraktionen. Durch die Intensität der Banden des β -Lactoglobulins kann auf das jeweils eingesetzte Erhitzungsverfahren geschlossen werden.

Die RP-HPLC ist eine optimale Methode, um den Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in Milchen nachzuweisen. Die Probenaufbereitung laut IDF Standard 178A:1999 sowie der eingesetzte Probengradient sind ohne Probleme gut wiederholbar. Zur optischen Darstellung des Gehaltes an β -Lactoglobulin eignen sich die eingesetzten elektrophoretischen Methoden sehr gut.

7. Zusammenfassung

β -Lactoglobulin ist aufgrund der hohen Hitzelabilität ein geeigneter Hitzeindikator, um die zur Milchherstellung eingesetzten Wärmebehandlungsverfahren nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der β -Lactoglobulingehalt in Extended-shelf-life Milchen mittels RP-HPLC analysiert, um festzustellen, ob der empfohlene Mindestgehalt von 1800 mg/L vorliegt. Die Probenvorbereitung wurde wie im IDF Standard 178A:1999 beschrieben durchgeführt. Als mobile Phase für die Gradientenelution wurden UHQ-Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure eingesetzt. Ein Probengradient mit einer Analysendauer von 25 Minuten wurde verwendet.

Die Analyse der 19 ESL-Proben zeigten erstaunliche Ergebnisse. Neun Extended-shelf-life Milchen wiesen einen β -Lactoglobulingehalt oberhalb der Mindestgrenze von 1800 mg/L auf. Die anderen zehn zeigten einen β -Lactoglobulingehalt < 400 mg/L. Diese Milchen wurden offenkundig auf UHT-Anlagen erhitzt. Von den zwei analysierten Rohmilchproben wies nur eine einen β -Lactoglobulingehalt im Durchschnittsbereich von 3300 – 3500 mg/L auf. Die acht analysierten, pasteurisierten Milchen zeigen Messergebnisse im Bereich von 2871 - 3460 mg/L, welche deutlich oberhalb des empfohlenen Mindestgehaltes für Kurzzeitpasteurisierung (2600 mg/L) liegen. β -Lactoglobulingehalte oberhalb bzw. an der Grenze des empfohlenen Richtwertes (150 mg/L) bei indirekter UHT-Erhitzung wiesen die sieben UHT-Milchen auf (150 - 272 mg/L).

Aus dieser Arbeit ist gut ersichtlich, dass sich die Analyse des nativen β -Lactoglobulins als Erhitzungsindikator in ESL-Milchen mittels RP-HPLC als gut durchführbar erweist. Native und SDS-PAGE wurden als zusätzliche Verfahren zur qualitativen Bestimmung des β -Lactoglobulins herangezogen.

Abstract

β -Lactoglobulin is an appropriate heat indicator due to the high heat instability. It shows which heating processes were used for production of milk.

The β -Lactoglobulin content in extended-shelf-life milks was determined by means of RP-HPLC in this present paper. The challenge was to find out if the recommended threshold level of 1800 mg/L was kept. The sample preparation was carried out as described in the IDF Standard 178A:1999. UHQ-water and acetonitrile, each with 0,1 % trifluoroacetic acid, were used as mobile phase for the HPLC gradient, analysis time was 25 minutes.

The analysis of the 19 extended-shelf-life milks showed astonishing results. Nine ESL milks had a β -Lactoglobulin content above the threshold level of 1800 mg/L. The rest of the analyzed ten milks had β -Lactoglobulin contents < 400 mg/L. These milks were obviously heated on UHT-plants. One of the two analyzed raw milk samples had a β -Lactoglobulin content in the average area of 3300 – 3500 mg/L. The eight tested pasteurized milks had results in the range of 2871 - 3460 mg/L. These determined concentrations were above the recommended minimum content for short-term pasteurization (2600 mg/L). The seven UHT-milks had β -Lactoglobulin contents (150 – 272 mg/L) above or rather at the threshold of the standard value of indirect UHT-heating (150 mg/L).

The present work shows that the analysis of native β -Lactoglobulin as a heating indicator in extended-shelf-life milks is appropriate by means of RP-HPLC. β -Lactoglobulin was additionally studied by Native and SDS-PAGE.

8. Literaturverzeichnis

ANANDHARAMAKRISHNAN C, RIELLY C.D., STAPLEY A.G.F. Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins 2008; 41: 270-277

BELITZ H-D, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001

BRANDL E: Qualitätssicherung von Milch durch Wärmebehandlung, Deutsche Milchwirtschaft 1997; 6: 189-191

BRUCH R, PELLEGRINO T. Welche Möglichkeiten bietet die Mikrofiltration von Milch und wie rentabel ist sie wirklich, Deutsche Milchwirtschaft 2006; 24: 990– 992

CHATTERTON D.E.W., SMITHERS G, ROUPAS P, BRODKORB A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – Technological implications for processing, International Dairy Journal 2006; 16: 1229–1240

CLAEYS W.L., SMOUT C, VAN LOEY A.M., HENDRICKX M.E. From Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator Tolerance Levels: Heat Treated Milk, Biotechnol. Prog. 2004; 20: 1–12

CLAEYS W.L., VAN LOEY A.M., HENDRICKX M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk, Trends in Food Science & Technology 2002; 13: 293–311

CREAMER L.K., BIENVENUE A, NILSSON H, PAULSSON M, VAN WANROIJ M, LOWE E.K., ANEMA S.G., BOLAND M.J., JIMENEZ-FLORES R. Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins, 1. bovine

β -Lactoglobulin, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004; 52: 7660-7668

DYCK B. ESL-Milch – Herstellung und Chancen, Deutsche Milchwirtschaft 1999; 15: 638–639

EBERHARD P, BÜTIKOFER U, SIEBER R. Vitamine in gelagerter hocherhitzter Milch, Agrarforschung 2003; 10 (2): 62–65

EBERMANN R, ELMADFA I. Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, Springer Verlag, Wien/New York, 2008

EL-AGAMY E.I., The challenge of cow milk protein allergy, Small Ruminant Research 2007; 86: 64–72

ELLIOTT A. J., DHAKAL A, DATTA N, DEETH H.C. Heat-induced changes in UHT milks – Part 1, The Australian Journal of Dairy Technology 2003; 58 :3-10

ELMADFA I, LEITZMANN C. Ernährung des Menschen, 3. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Hohenheim, 1998

FOX P.F. Milk proteins as food ingredients, International Journal of Dairy Technology 2001; 54: 41–55

GALLMANN P.U., EBERHARD P, SIEBER R. Vor- und Nachteile der ESL (Extended Shelf Life)-Milch, Agrarforschung 2001; 8: 112-117 und FAM-Information (Nr. 423) 2001

GRÜN WALD W. Die Praxis der instrumentellen Analytik – RP-HPLC für Anwender, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993

HARJINDER S. Heat stability of milk, International Journal of Dairy Technology 2004; 57: 111–119

HOEFER. Protein Electrophoresis, Application Guide, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, 1994

International IDF Standard, milk and heat-treated milk, Determination of acid soluble β -Lactoglobulin content, Reversed-phase HPLC method, International Dairy Federation Belgium, 178A:1999

KAUFMANN V, KULOZIK U. Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Deutsche Milchwirtschaft 2007; 8: 268-271

KIRSCHENMANN B. Drei Wochen Haltbarkeit – voller Trinkmilchgeschmack, Herstellung von pasteurisierter Milch mit langer Haltbarkeit durch Mikrofiltration, Deutsche Milchwirtschaft 2006; 4: 143-144

KONTOPIDIS G, HOLT C, SAWYER L. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure and Function, Journal of Dairy Science 2004; 87: 785–796

KRÖMKER V, BRUCKMAIER R.M. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey Verlag, Stuttgart, 2007

LUF W. Hitzeklassifizierung von Konsummilch, Milchwirtschaftliche Berichte 1995; 124: 133-134

MADUREIRA A.R., PEREIRA C.I., GOMES A.M.P., PINTADO M.E., MALCATA F.X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties, Food Research International 2007; 40: 1197–1211

MAIER I, OKUN V.M., PITTNER F, LINDNER W. Changes in peptic digestibility of bovine β -lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods, *Journal of Chromatography B* 2006, 841: 160–167

MATHES U, SCHIER G. ESL-Milch, die längere Frische im Zeichen von Tine aus der Osterhusumer Meierei Witzwort eG, *Deutsche Milchwirtschaft* 2007; 8: 290–292

MEHRENS H.-A., MÜLLER G. Milchproteine, Elektrophoretische Methoden, Band 4 der Schriftenreihe Lebensmittelchemie, Lebensmittelqualität, Lebensmittelchemische Gesellschaft – Behr's Verlag Hamburg, 1991

MEYER V. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 4. Auflage, Verlag Moritz Diesterweg, Otto Salle Verlag, Verlag Sauerländer, 1986

MICHALSKI M.-C., JANUEL C. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk, *Trends in Food Science & Technology* 2006; 17: 423–437

MORALES F-J, ROMERO C, JIMENEZ-PEREZ S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes, *International Journal of Food Science and Technology* 2000; 35: 193–200

RABA B. HPLC-Analytik zur Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin als Erhitzungsindikator in ESL-Milch sowie von Glucomakropeptid in Milchpulver. Diplomarbeit, 2008

RENNER E. Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen, 4. überarbeitete Auflage, Volkswirtschaftlicher Verlag, München, 1982

RYSSTAD G, KOLSTAD J. Extended shelf life milk – advances in technology, International Journal of Dairy Technology 2006; 59: 85-96

SCHLIMME E, BUCHHEIM W. Milch und ihre Inhaltsstoffe: Chemische und physikalische Eigenschaften, 2. überarbeitete Auflage. Mann Verlag, Gelsenkirchen, 1999

SCHLIMME E, CLAWIN-RÄDECKER I, EINHOFF K, KIESNER C, LORENZEN P. C., MARTIN D, MEISEL H, MOLKENTIN J, PRECHT D. Unterscheidungsmerkmale zur Bewertung der Wärmebehandlung von Milch, Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsbeichte 1996; 48: 5–36

SCHOKKER E.P., SINGH H, CREAMER L.K. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin, International Dairy Journal 2000; 10: 843–853

SPREER E. Technologie der Milch, 8. neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Behr Verlag, Hamburg, 2005

TÖPEL A. Chemie der Milch, 3. Auflage, Fachbuchverlag, Leipzig, 1991

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Reiterer

Anschrift: Blümelgasse 78, 2620 Raglitz

Telefonnummer: 0664/1711139

E-Mail: evre@gmx.at

Geburtsdatum: 3.12.1981

Geburtsort: Neunkirchen

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: Ledig (Keine Kinder)

Schulbildung

09/1988-06/1992: Volksschule St. Lorenzen

09/1992-06/1996: Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium,
Neunkirchen

09/1996-06/2001: Städtische höhere Lehranstalt für wirtschaftliche
Berufe, Wiener Neustadt.

Matura abgeschlossen: Ende Juni 2001

Studium

Seit Oktober 2002: Studium der Ernährungswissenschaften an der
Universität Wien. Schwerpunkt: Lebensmittel-
produktion und –technologie.

Beruflicher Werdegang und Praktika

07/2001-08/2002: Arztschreibkraft im allgemein öffentlichen Krankenhaus Neunkirchen, Abteilung: Unfall

07/2006: Kurzentrum „Landsknechte“, Bad Schönau

08/2007: Hanusch Krankenhaus, Diätbüro, Wien

04/2008: Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien

Kenntnisse

Fremdsprachen: Englisch und Französisch (Maturaniveau)

Personal Computer: MS Office (Word, Excel, Power Point), Nutzung des Internets