



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Beurteilung der Proteolyse von ausgewählten Schimmelkäsen mittels UPLC und elektrophoretischer Methoden

Verfasserin

Eva Baumann

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, im März 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium der Ernährungswissenschaften

Matrikelnummer: 0503241

Betreuer: Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut Mayer
Univ. f. Bodenkultur, DLWT

Danksagung

Der größte Dank geht wohl an meine Eltern, die mir nicht nur dieses Studium ermöglicht haben, sondern mir auch immer mit Geduld, Liebe und Motivation zur Seite gestanden sind.

An dieser Stelle möchte ich mich auch besonders bei meinem Freund und meinen Freunden bedanken, die es auch nicht immer leicht mit mir in dieser Zeit hatten und die dennoch mich aufs Neue motiviert haben, sowie an mich glaubten.

Aber auch bei meinem Laborbetreuer Betreuer Ao. Univ. Prof. DI. Dr. Helmut Mayer, der mir die Möglichkeit zu dieser Diplomarbeit gegeben hat und mir mit fachlichem Rat weitergeholfen hat, möchte ich mich bedanken.

Besonderen Dank möchte ich meinen Kollegen DI Gregor Fiechter, Iris Biedermann und Bernd Raba aussprechen, die mich im Laufe der Arbeit immer wieder aufs Neue tatkräftig unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	2
2.	Literaturüberblick.....	3
2.1.	Geschichte und Fakten von Käse	3
2.2.	Definition von Käse	5
2.3.	Ernährungsphysiologische Qualität von Milch.....	6
2.4.	Chemische Zusammensetzung der Milch	6
2.5.	Milchproteinsystem.....	7
2.5.1.	Caseine	9
2.5.2.	Struktur und chemische Zusammensetzung der Caseine.....	10
2.5.3.	α - _{s1} -Casein.....	11
2.5.4.	α - _{s2} -Casein.....	11
2.5.5.	β -Casein	12
2.5.6.	κ -Casein	12
2.5.7.	γ -Casein.....	13
2.5.8.	Caseinmizelle	13
2.5.9.	Caseinfällung	14
2.6.	Molkenproteine	16
2.6.1.	beta-Lactoglobulin	17
2.6.2.	alpha-Lactalbumin.....	17
2.6.3.	Blutserumalbumin	18
2.6.4.	Immunglobuline	18
2.6.5.	Minorkomponenten.....	18
2.7.	Käseherstellung.....	18
2.7.1.	Gereifte Käse.....	19
2.7.2.	Zusätze bei der Herstellung von Käse und Mittel zur Oberflächenbehandlung von Käse.....	23
2.8.	Definition von Schimmelkäse und Beispiele der einzelnen Sorten	24
2.9.	Biochemie der Käsereifung.....	28
2.9.1.	Methoden zur Überwachung der Proteolyse im Käse.....	38
3.	Material und Methoden.....	41
3.1.	Probenmaterial	41
3.2.	Aufarbeitung der Käseproben	42
3.2.1.	Caseingewinnung für die elektrophoretischen Analysen.....	42
3.2.2.	Wasserlöslicher Stickstoff (WSN) in Käse	42
3.3.	Elektrophoretische Analyse	43
3.3.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	45
3.4.	Urea- PAGE	52
3.5.	Bestimmung des Stickstoffgehalts	56
3.6.	Peptidmapping für Schimmelkäse mittels UPLC	63
4.	Ergebnisse und Diskussion	66
4.1.	Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl	66
4.2.	Alkalische PAGE	68
4.3.	SDS-PAGE.....	73
4.4.	Peptidmapping	78
5.	Schlussbetrachtung.....	87
6.	Zusammenfassung.....	94
7.	Abstract	95
8.	Literaturverzeichnis.....	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung nach dem Fettgehalt in der Trockenmasse (F.i.T) [Codexkapitel_B32]	4
Tabelle 2: Einteilung nach dem Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse (Wff) [Codexkapitel_B32]	4
Tabelle 3: kompositionelle Proteinbeschaffenheit in Milch und Molke (g/kg) [Barth et al., 1997]	8
Tabelle 4: Auswahl der bekanntesten genetischen Varianten der Caseine [Jakob, 1994]	9
Tabelle 5: Physikalisch-chemische Charakterisierung der Caseine [Swaigood, 1992];	10
Tabelle 6: mengenmäßige Anteile der Molkenproteine in Kuhmilch (g/L) [Köller, 1992; Hanser, 1992]	17
Tabelle 7: Anforderungen an die käsetaugliche von Milch [Rimbach et al., 2010]	19
Tabelle 8: analysierte Schimmelkäse	41
Tabelle 9: gespeicherte Programme der Destillationseinheit.....	63
Tabelle 10: Gradientenelution für Peptidmapping mittels UPLC	65
Tabelle 11: analysierten Stickstoffwerte der Käseproben (EW%, TN%, WSN%, WSN/TN%).....	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung der Käse und käseähnlichen Produkte in Super-Familien basierend auf der Koagulation der Milch und weitere Unterteilung der labkoagulierten Käse basierend auf ihrer charakteristischen Technologie bzw. dem verwendeten Reifungsagens [McSweeney, 2007].....	5
Abbildung 2: Komponenten der Milchproteinfraktion [Swaigood, 1992].....	8
Abbildung 3: Bildung von Caseinkomplexen und Caseinmizellen [Belitz et al., 2008]	13
Abbildung 4: schematisches Caseinmizellenmodell [Belitz et al., 2008]; a Subeinheit aus α -s ₁ -, β -, γ - und κ -Casein; b Mizellen aus Subeinheiten, die durch Calciumphosphat verbrückt sind.....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Caseingerinnung nach der Schutzkolloidtheorie (nach PAYENS) [Spreer, 2005]	16
Abbildung 6: Plasmin/ plasminogenes System in Milch [McSweeney, 2004].....	34
Abbildung 7: Übersicht zu den biochemischen Abläufen während der Käsereifung [Rimbach et al., 2010].....	37
Abbildung 8: Urea-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 1).....	69
Abbildung 9: Urea-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 2).....	71
Abbildung 10: SDS-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 1).....	74
Abbildung 11: SDS-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 2).....	76
Abbildung 12: Peptidmap einer Sauermolke (aromatische Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan; Glukomakropeptid und Molkenproteine: α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin).....	79
Abbildung 13: Peptidmap einer Labmolke (aromatische Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan); und Molkenproteine: α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin).....	79
Abbildung 14: Peptidmapping der Gorgonzolaproben (WSN).....	80
Abbildung 15: Peptidmapping der Camembertproben (WSN).....	81
Abbildung 16: Peptidmapping der Mischkäseproben (WSN)	82
Abbildung 17: Peptidmapping der Weißschimmelprobe (WSN)	83
Abbildung 18: Peptidmapping der Grünschimmelprobe (WSN).....	83
Abbildung 19: Peptidmapping der Blauschimmelproben (WSN)	85
Abbildung 20: Peptidmapping der Roquefortproben (WSN)	86

1. Einleitung und Fragestellung

Die vorliegende Diplomarbeit befasst sich mit der Proteolyse von ausgewählten Blau- und Weißschimmelkäsen. Die Proteolyse ist ein sehr komplexer Vorgang und einer der Wichtigsten für die Bildung der Käsetextur und der Geschmacksbildung, sowohl im positiven als auch im negativen Sinne. Ihr Beginn wird durch das restliche Koagulans, z.B. *Chymosin* verursacht. Aber auch originäre Milchproteinasen, Enzyme somatischer Zellen, Milchsäure-Starter, Milchsäure-Nichtstarter, Sekundärstarter und exogene Protein- und Peptidasen sind für den Abbau der Caseine von Bedeutung. Dies kommt zustande, wenn die Caseine durch die restliche Koagulansaktivität, durch *Plasmin* im Käsebruch hydrolysiert werden. Durch diesen Prozess entstehen große und mittelgroße Peptide, welche von Startermilchsäurebakterien und Nichtstartermilchsäurebakterien, sowie durch die sekundäre Mikroflora, zu kleinen Peptiden und Aminosäuren abgebaut werden, die wiederum für den Geschmack von Relevanz sind.

Um diesen sehr dynamischen Prozess mit analytischen Mitteln festhalten zu können, werden zwei mögliche Methoden unterschieden:

- nicht-spezifische Methoden: Mit ihnen ist es möglich den Umfang der Proteolyse, die Aktivität der proteolytischen Agenzien z.B. über die Bestimmung von löslichen Stickstoff festlegen zu können.
- spezifische Methoden: Sie geben genauere Auskünfte über Peptide, die im Prozess gebildet werden. Mit Hilfe von Elektrophorese oder Chromatographie wird das möglich gemacht. Vor allem die Urea-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein weit verbreitetes Werkzeug, um die Proteolyse in Käse zu überwachen und einen Vergleich von den einzelnen Caseinmustern zu erstellen. Sie bedient sich der Masse und Ladung, während bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE) nur über die Molekularmassen getrennt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 29 handelsübliche Schimmelkäseproben (Blauschimmel- und Weißschimmelkäse) anhand ihrer Proteolysemuster mit SDS-PAGE und Urea-PAGE miteinander verglichen. Weiters wurde, nach vorangegangener Fraktionierung, der Gehalt an wasserlöslichem (WSN) Stickstoff bestimmt. Zur Abrundung der Ergebnisse wurde mittels hochauflösendem UPLC™-Peptidmapping ein käsetypisches Peptidmuster erstellt, um eine Ergänzung zu den Gelen zu bilden.

2. Literaturüberblick

2.1. Geschichte und Fakten von Käse

Die Käseherstellung zählt zu den ältesten Anwendungen der Biotechnologie und findet ihren Ursprung ungefähr 6000 Jahre vor Christus. Zur Haltbarmachung von Käse wurden zwei Varianten verwendet:

- die Milchsäurebakterienfermentation und
- die Reduktion der Wasseraktivität durch Wasserentzug und Zugabe von Salz

Wahrscheinlich wurde das Käsen zuerst in Zentralasien oder Mittelasien entdeckt und verbreitete sich danach auch in Europa. Mit dem Käse wurde es möglich, Milch haltbar zu machen [Fox et al., 2004].

Ungefähr 500 Sorten von Käse (Abb. 1) werden auf der ganzen Welt hergestellt. Die Weltproduktion beträgt 10^7 Tonnen pro Jahr, und jedes Jahr gibt es eine Steigerung von 4%. Die Käseherstellung besteht aus der Gelbildung des Caseins durch Säure- oder Labkoagulation. Einige wenige Käsesorten werden durch die Kombination von Hitze und Säure und noch seltener durch thermische Eindampfung gewonnen. Durch die Entwicklung von Ultrafiltration wurde die Herstellung einiger Käsesorten sehr erleichtert. Käse, die durch Säure- oder Säure/Hitze fällung koaguliert werden, werden frisch konsumiert und ihre Produktion ist einfach. Labkäse müssen zumeist vorher reifen, bevor sie konsumiert werden, da sie einer Reihe von komplexen Enzymreaktionen unterliegen [Fox et al., 2004].

Derweil gibt es keine definitive Käseliste. Viele Käse sind sich ähnlich in Geschmack, Textur und Herstellungstechnologie, deswegen wird nach folgenden Kriterien klassifiziert:

- Textur, welche durch Fettgehalt und Feuchtigkeit festgelegt ist
- Reifungsindices nach dem Umfang des chemischen Zusammenbruchs des Caseins
- Methode der Koagulation z.B. Lab-, Säure- und Hitze/Säurekoagulation [McSweeney, 2007].

Die gängigste Methode ist die Einteilung nach der unterschiedlichen Textur (Tab. 1) sowie dem Wassergehalt (Tab. 2) in folgende Gruppen:

Tabelle 1: Einteilung nach dem Fettgehalt in der Trockenmasse (F.i.T) [Codexkapitel B32]

Bezeichnung der Fettstufe	F.i.T %
Doppelrahmstufe	65
Rahm	55
Vollfett	45
Dreiviertelfett	35
Halbfett	25
Viertelfett	15
Mager	unter 15

Tabelle 2: Einteilung nach dem Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse (Wff) [Codexkapitel B32]

Käse	Wff %
Hartkäse	< 56
Halbharter Schnittkäse	52-60
Schnittkäse	54-63
Halbweicher Schnittkäse	61-69
Weichkäse	>67
Sauermilchkäse	60-73
Frischkäse	> 73

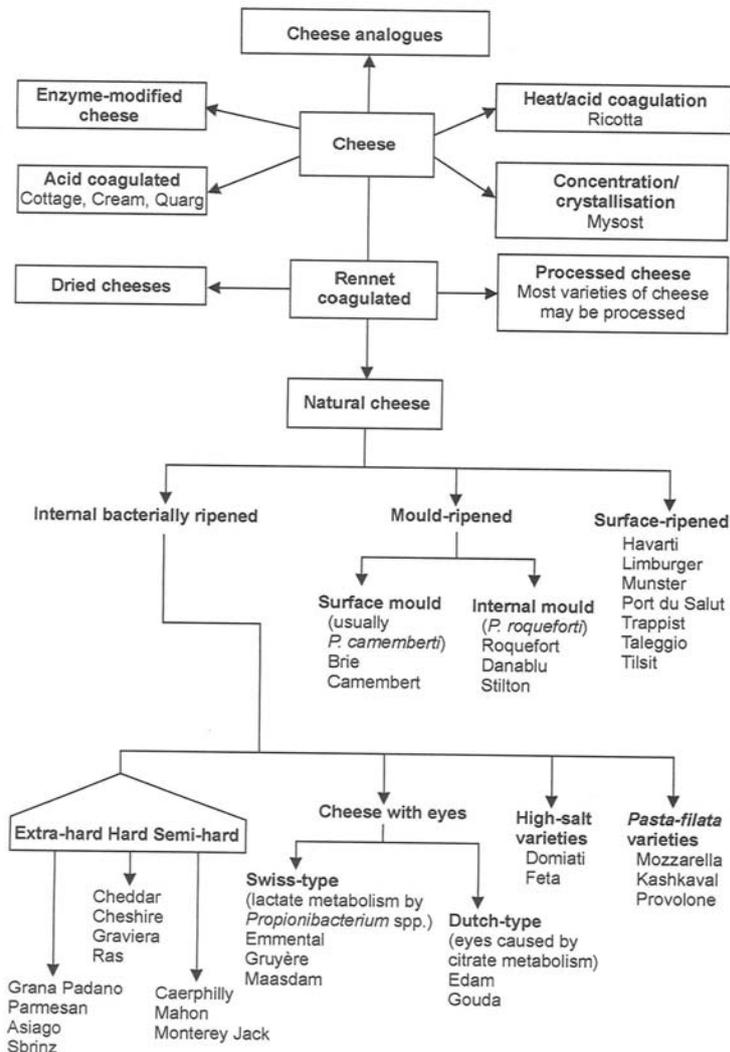


Abbildung 1: Klassifizierung der Käse und käseähnlichen Produkte in Super-Familien basierend auf der Koagulation der Milch und weitere Unterteilung der labkoagulierten Käse basierend auf ihrer charakteristischen Technologie bzw. dem verwendeten Reifungsagenz [McSweeney, 2007]

2.2. Definition von Käse

Käse ist eines der wichtigsten Milchprodukte in der gesamten Welt. Laut Definition gemäß der Käse-Verordnung sind es „*frische oder in verschiedenen Graden der Reife befindliche Erzeugnisse, die aus der dickgelegten Käsemilch, der Molke entzogen worden ist, hergestellt sind*“ [Codexkapitel_B32], des weiteren aber auch Erzeugnisse die hauptsächlich aus Molke durch Säurehitzegefällung oder durch Entzug von Wasser hergestellt sind. Diese Käse werden Molkenkäse genannt. Bei Käsezubereitungen, welche auch aus anderen Lebensmitteln bestehen, müssen mindestens 51% der Trockenmasse des Endproduktes aus Käsetrockenmasse bestehen, einschließlich des eventuell zugegebenen Milchfettes.

Da es die verschiedensten Sorten gibt, kann kein einheitliches Herstellungsverfahren für alle geltend gemacht werden. Je nach Sorte wird ein anderes Verfahren angewendet [Codexkapitel_B32].

2.3. Ernährungsphysiologische Qualität von Milch

Milch zählt zu den wertvollsten Lebensmitteln, da ein Liter Vollmilch mit 3.5% Fett, 100% des Calciumbedarfs, in etwa zwei Drittel des Tagesbedarfs an Phosphor und Vitamin B₂, zirka ein Drittel der Vitamin A und B₁-Aufnahme, sowie 20% des Vitamin C-Bedarfs eines Tages deckt [Spreer, 2005].

Durchschnittlich werden bis zu 60% des Calciumbedarfs von 1000 mg/Tag durch Milch- und Milchprodukte gedeckt [Elmadfa und Leitzmann, 2004].

Durch schonende Erhitzung und anschließend gekühlte Lagerung bei 4 bis 5°C, kann dem Vitaminverlust, vor allem von Vitamin B₁ und B₆ entgegen gewirkt werden [Eberhard et al., 2003].

2.4. Chemische Zusammensetzung der Milch

Die Kuhmilch besitzt einen Wassergehalt von 87% und eine Trockenmasse von 13%. Letztere kann noch in 9% fettfreie Trockenmasse und 4% Fett eingeteilt werden. Die Zusammensetzung der fettfreien Trockenmasse basiert auf Milchzucker, Salzen und Rohprotein, welches in Reinprotein und Nicht-Protein-Stickstoff-Substanzen eingeteilt wird [Foissy, 2005].

Der Anteil der Nicht-Protein-Stickstoffsubstanzen (NPN) setzt sich aus dem Stickstoff jener Milchbestandteile zusammen, welche nach dem Ausfällen der Milchproteine in Lösung bleiben. Dazu gehören Harnsäure, Creatin, Creatinin, Hippursäure, Orotsäure, N-Acetylglucosamin sowie Salicylsäure und Sarkosin. Durchschnittlich kann ein Liter Milch 200 bis 400 mg Nicht-Protein-Stickstoff enthalten [Schlimme und Buchheim, 1998].

Zum Reinprotein zählen Caseine und Molkenproteine, welche mit 3.2% die Hauptfraktion des Reinproteins darstellen. Das Casein zu Molkenproteinverhältnis beträgt bei Kuhmilch zumeist 80:20.

Bei Milch handelt es sich um eine Öl-in-Wasser Emulsion. Dieses Fett ist hier in Form von Fettkügelchen, welche von einer Fettkügelchenmembran umgeben sind, im Milchserum emulgiert [Belitz et al., 2008].

In der Kuhmilch können bis zu 60 verschiedene Fettsäuren nachgewiesen werden. Die wichtigsten mengenmäßigen Vertreter sind die Öl-, Palmitin-, Stearin-, und Myristinsäure. Auch für das Milchfett ist ein Anteil von etwa 1% methylverzweigten und zirka 2% trans-ungesättigten Fettsäuren, wie die 11-trans-Octadecensäure typisch [Baltes, 2000].

2.5. Milchproteinsystem

Die Milchproteinfraktionen bilden ein komplexes Gemisch aus Polypeptiden mit verschiedenen chemischen Strukturen sowie physikalisch-chemischen und funktionellen Eigenschaften.

Diese lassen sich in vier Hauptgruppen unterteilen:

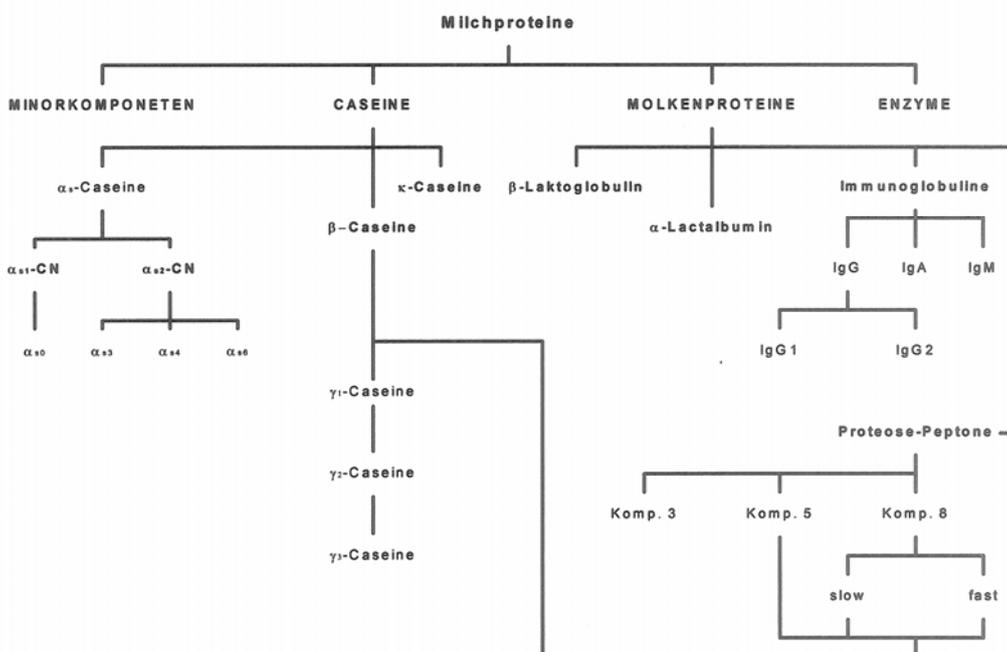
- Caseine
- Molkenproteine
- Minorkomponente (z.B. Proteine der Fettkügelchenmembran)
- Enzyme

Die zwei Hauptgruppen bestehend aus Caseine (zirka 82%) und Molkenproteine (zirka 18%) gehen aus Tabelle 3 hervor [Mehrens und Reimerdes; 1991]:

Tabelle 3: kompositionelle Proteinbeschaffenheit in Milch und Molke (g/kg) [Barth et al., 1997]

Komponente	Gehalt (g/kg) Milch
Gesamtprotein	34.1
Caseine	26.9
alpha-s ₁ -CN (A, B, C, D, E)	10.3
alpha-s ₂ -CN (A, B, C, D)	2.7
beta-CN	9.6
kappa-CN	3.5
gamma-CN	0.8
Molkenproteine	5.9
beta-Lactoglobulin (A, B, C, D, E, F, G)	3.4
alpha-Lactalbumin (A, B, C)	1.2
Serumalbumin	0.4
Immunoglobuline (A, G1, G2, M, E)	0.7
<i>Lactoferrin</i>	0.1
<i>Transferrin</i>	0.1
<i>Proteose- Peptone</i>	0.1
andere minore Proteine	0.1

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die einzelnen Milchproteinfraktionen und ihre Aufspaltung während des Caseinabbaus.

**Abbildung 2: Komponenten der Milchproteinfraktion [Swaigood, 1992]**

2.5.1. Caseine

Caseine sind mit einem Beitrag von 80% der Hauptanteil des Milcheiweißes und liegen in der Milch in Mizellen vor [Spreer, 2005]. Laut Definition sind Caseine Phosphoproteine, die nach Ansäuerung auf pH 4.6 aus roher Magermilch bei 20°C präzipitieren [Eigel et al., 1984]. Die Caseinunterteilung erfolgt nach Homologien in der Primärstruktur in folgende Hauptgruppen:

- α -_{s1}-Casein
- α -_{s2}-Casein
- β -Casein
- κ -Casein

Synthetisiert werden nur die Formen α -_{s1}-, α -_{s2}-, β - und κ -Casein, im Verhältnis von etwa 40:10:35:12 [Mehrens und Reimerdes, 1991; Fox und McSweeny, 1997]. Die vier Caseine können auch in verschiedenen genetischen Varianten vorkommen, was in Tabelle 4 gezeigt wird. Diese Varianten entstehen durch die spontane Änderung der Basensequenz der DNA, wodurch es zu einem Austausch einzelner Aminosäuren kommt. Aufgrund des Fehlens einer Tertiärstruktur sind die Caseine nicht wie Molkenproteine hitzedenaturierbar. Außerdem besitzen sie ein Bindungsvermögen gegenüber mehrwertigen Kationen. Die mutationsbedingten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Milchproteine bezeichnet man als genetischen Polymorphismus der Milchproteine [Jakob, 1994].

Tabelle 4: Auswahl der bekanntesten genetischen Varianten der Caseine [Jakob, 1994]

Caseine	Varianten*
α - _{s1} -CN	A, B, C, D, (E)
α - _{s2} -CN	A, (B,C), D
β -CN	A, A², A³, B, C, (D), E
κ -CN	A, B, C, E

*häufigsteVarianten fettgedruckt, () bei europäischen Rinderrassen (Bos taurus) bisher nicht beachtet

Eine Differenzierung der einzelnen Caseine mittels Elektrophorese funktioniert wegen ihrer verschiedenen physikalisch-chemischen Parameter sehr gut. Dies verdeutlicht Tabelle 5, die Ergebnisse von drei verschiedenen Autoren zusammenfasst.

**Tabelle 5: Physikalisch-chemische Charakterisierung der Caseine [Swaisgood, 1992];
^aMehrens und Reimerdes, 1991; ^bBelitz und Grosch, 1992; ^cFox, 1989**

Protein	Ladung bei pH 6.6		isoinonische pH		Molekulargewicht	
<i>α_{s1}-Casein</i>						
A-8P	-21		4.94		22 077	
B-8P	-21.9	-20.9 ^c	4.94	4.96 ^c	23 623	23 612 ^c
C-8P	-20.9		4.97		23 551	
D-9P	-23.5		4.88		23 734	
<i>α_{s2}-Casein</i>						
A-10P	-12.2	-13.2 ^c	5.54	5.39 ^c	25 157	25 148 ^c
A-11P	-13.8	-14.8 ^c	5.37	5.32 ^c	25 238	25 228 ^c
A-12P	-15.5	-16.4 ^c	5.30	5.25 ^c	25 319	25 308 ^c
A-13P	-17.1	-18.0 ^c	5.23	5.19 ^c	25 400	25 388 ^c
<i>β-Casein</i>						
A ³ -5P	-13.8		5.07		23 979	
A ² -5P	-13.3	-12.3 ^c	5.14	5.19 ^c	23 988	23 980 ^c
A ¹ -5P	-12.8		5.22		24 028	
B-5P	-11.8		5.29		24 097	
C-4P	-9.2		5.46		23 946	
<i>γ-Caseine</i>			5.8-6.0 ^b			
β-CN A ² -1P (f29-209) [γ ₁ -CN]					20 520 ^a	
β-CN A ² (f106-209) [γ ₂ -CN]					11 822 ^a	
β-CN A (f108-209) [γ ₃ -CN]					11 557 ^a	
<i>κ-Casein</i>						
A-1P	-3.0	-3.9 ^c	5.61	5.43 ^c	19 038	19 037 ^c
B-1P	-2.0		5.90		19 006	

2.5.2. Struktur und chemische Zusammensetzung der Caseine

Die Aminosäuresequenz der Caseine ist gut erforscht und weitgehend aufgeklärt.

Wenn der Fokus auf die Primärstruktur gesetzt wird, dann fällt folgendes auf:

- Gehalt an Phosphoserylresten
- Fehlen von Cystein-, Cystinresten bei alpha-_{s1}- und beta-Casein
- relativ hoher Gehalt hydrophober Aminosäuren und Kohlenhydratrest am kappa-Casein
- hoher Prolingehalt

Hinweise auf eine ziemlich flexible und offenkettige Struktur der Caseine geben der hohe Prolingehalt, der dafür zuständig ist, dass es zu keiner komplexen räumlichen Strukturbildung kommt, aber auch das Fehlen von Schwefelwasserstoff- und Disulfidbrücken, welche für die globuläre Form verantwortlich sind. Durch diese

Struktur ist der enzymatische Abbau der Caseine wesentlich erleichtert. Die Anhäufung von hydrophoben Aminosäuren in bestimmten Molekülbereichen führt zu einem bitteren Geschmack bei intensivem proteolytischen Abbau. Dies wird manchmal zu einem Problem bei der Käsureifung [Mehrens und Reimerdes, 1991].

2.5.3. α -_{s1}-Casein

Diese Caseinfraktion besteht aus zwei Teilen, nämlich einer Haupt- und einer Minorkomponente. Beide Komponenten weisen die gleiche Aminosäuresequenz mit je 199 Aminosäureresten und acht bzw. neun Phosphorgruppen auf [Eigel et al., 1984; Dumas et al., 1989]. Zusammen mit β -Casein macht α -_{s1}-Casein 70% des Gesamtcaseins aus [Dumas et al., 1989]. Das Molekulargewicht beträgt 23 600 Dalton [Belitz et al., 2008].

Außerdem besitzt das α -_{s1}-Casein fünf genetische Varianten A, B, C, D, und E, wobei die Variante B und C die am häufigsten vorkommenden sind [Eigel et al., 1984].

Durch den unterschiedlichen Gehalt an Phosphoserinresten, kann noch eine Differenzierung vorgenommen werden. Die Hauptkomponente enthält acht Phosphoserinreste, von denen sieben in den Positionen 43-80 lokalisiert sind und noch zwölf weitere Carboxylgruppen besitzen. Diese Positionen bilden dadurch einen extrem sauren und polaren Abschnitt. Die Nebenkomponekte ist zusätzlich an Ser 41 phosphoryliert.

Die Aminosäure Prolin, welche gleichmäßig über die Kette verteilt ist, stoppt die Ausbildung regulärer Strukturen mit größerem Umfang. Die Positionen 100-199 hingegen sind sehr apolar und haben eine starke Assoziationsneigung, die durch die Abstoßung der Phosphatgruppen aber limitiert wird [Belitz et al., 2008].

2.5.4. α -_{s2}-Casein

Es besteht aus 207 Aminosäureresten, hat ein Molekulargewicht von 25 000 Dalton und bildet eine dipolare Struktur, wobei sich die anionischen Gruppen im Bereich des N-Terminus und die kationischen Gruppen eher im C-Terminus befinden. Weiters besitzt es zwei Cystein- und elf Phosphoserinreste, und im Gegensatz zu α -_{s1}-Casein kann es viel leichter mit Calcium gefällt werden. Aufgrund des unterschiedlichen Phosphorylierungsgrads wurde früher zwischen α -_{s3}-, α -_{s4}-, α -_{s5}-, α -_{s6}-Casein unterschieden, die heutzutage zu α -_{s2}-Casein gezählt werden. Es scheint auch, dass über Disulfidbrücken verknüpfte Dimere vorliegen [Belitz et al., 2008]. Folgende vier

genetische Varianten des α -_{s2}-Caseins sind bekannt: A, B, C und D [Eigel et al., 1984; Rollema, 1992; Swaisgood, 1992]. Gemeinsam mit dem kappa-Casein bilden sie 26% des Gesamtcaseinanteils [Dumas et al., 1989].

2.5.5. β -Casein

Folgende genetische Varianten von β -Casein sind bekannt: A, A², A³, B, C, D, E und F [Eigel et al., 1984].

Die genetische Variante A² mit einem Molekulargewicht von 24 000 Dalton, wird aus einer Peptidkette mit 209 Aminosäureresten gebildet. Auf den Positionen 1-40 sind die fünf Phosphoserinreste verteilt und bilden somit auch den ganzen ionisierbaren Rest des Moleküls, während die Positionen 136-209 zum größten Teil Reste mit apolaren Seitenketten enthalten. Das beta-Casein bildet das stärkste hydrophobe Casein.

Wie auch schon α -_{s1}-Casein enthält auch β -Casein kein Cystein [Belitz et al., 2008].

2.5.6. κ -Casein

Die genetische Variante B mit einem Molekulargewicht von 18 000 Dalton wird aus einer Peptidkette mit 169 Aminosäureresten gebildet. Folgende genetische Varianten liegen vor: A, B, C, E, F und G, wobei die am häufigsten auftretende Variante A ist. Es liegt eigentlich als Trimeres oder höheres Oligomeres vor, wobei auch eine Verbrückung über Disulfidbindungen möglich ist. Die Hauptkomponente kommt in kohlenhydratfreier Form vor und die zumindest sechs Nebenkompenten, die unterschiedliche Mengen an Kohlenhydraten enthalten, sind über die Aminosäurereste des Threonins 131, 133, 135 oder 136 an die Peptidkette gebunden [Belitz et al., 2008].

Eine Unterscheidung zu den anderen Caseinen ist, dass das κ -Casein nicht calciumsensitiv ist, weshalb es zu deren Stabilisierung beitragen kann. Durch *Chymosin* kann es an der Phe-Met-Bindung gespalten werden und es entstehen dadurch das stark hydrophobe para- κ -Casein und das polare Glykomakropeptid [Foissy, 2005]. Durch diese Abspaltung kommt es zur Beseitigung der sterischen, elektrostatischen und polaren Stabilität an der Mizellenoberfläche mit der auch die Hydrophobizität steigt. Dadurch ist eine Mizellenassoziation möglich und führt zwangsweise zu einer Aggregation und Fällung des Caseins [Swaisgood, 1992].

2.5.7. γ -Casein

Die wichtigsten Minorkomponenten der Caseinfraction sind die γ -Caseine. Sie entstehen bei der Hydrolyse des β -Caseins durch die milchoriginäre Proteinase, *Plasmin*, und stellt ein C-terminales Bruchstück des β -Caseins dar. Die drei bekannten Formen γ_1 -, γ_2 -, γ_3 -Casein bestehen aus den Aminosäureresten 29-209, 106-209 bzw. 108-209 [Eigel et al., 1984; Rollema, 1992; Swaisgood, 1992].

2.5.8. Caseinmizelle

Die Caseinkomponenten liegen bis auf einen als Serumcasein bezeichneten Anteil von $\leq 10\%$ in der Milch nicht als Monomere vor, sondern aggregieren zu Caseinkomplexen und Caseinmizellen, was Abbildung 3 verdeutlichen sollte [Belitz et al., 2008].

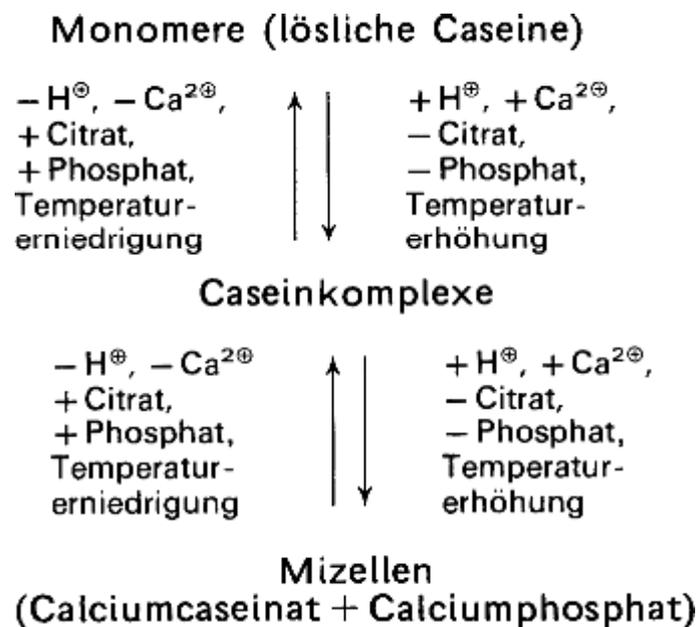


Abbildung 3: Bildung von Caseinkomplexen und Caseinmizellen [Belitz et al., 2008]

Auf molekularer Ebene gibt es einige Ansätze, die das Mizellenmodell erklären. Das dargestellte Modell (Abb. 4) besteht aus Submizellen mit einem Molekulargewicht von gesamt 760 000 Dalton die aus ungefähr 30 verschiedenen Casein-Monomeren bestehen und sich dann zu einer großen Mizelle vereinigen [Belitz et al., 1992]. Der Zusammenhalt der Submizellen ist durch hydrophobe Wechselwirkungen, Calciumphosphatbrücken (CCP-Brücken) und Wasserstoffbrücken möglich. Den Kern der Submizellen bilden die calciumsensitiven Caseine der Gruppe α_s und β . Die Aufteilung von κ -Casein zwischen den Submizellen ist heterogen. Submizellen mit

einem hohen Grad an κ -Casein werden auf der Mizellenoberfläche lokalisiert während die mit einem niedrigen Grad an κ -Casein im Inneren zu finden sind.

Die Aggregation der Mizelle wird durch das Herausragen der hydrophilen C-Termini aus der Oberfläche verhindert. Die effektive Schicht aus den hydrophilen C-Termini beträgt ungefähr 5 nm. Im Inneren der Mizelle befindet sich hingegen aber nur ein kleiner Teil des κ -Caseins [Belitz et al., 2008].

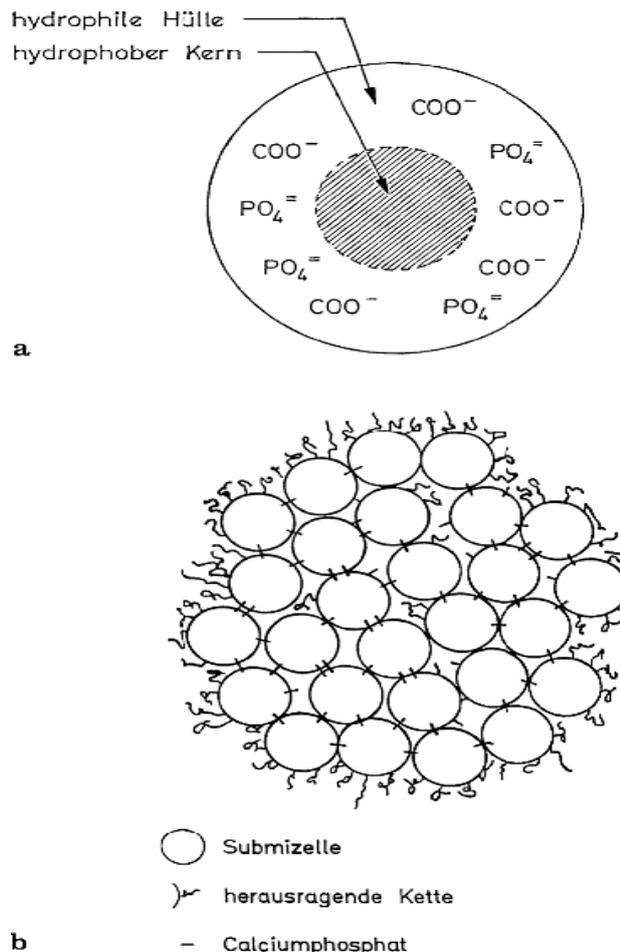


Abbildung 4: schematisches Caseinmizellenmodell [Belitz et al., 2008]
a Subeinheit aus α -s₁-, β -, γ - und κ -Casein; **b** Mizellen aus Subeinheiten, die durch Calciumphosphat verbrückt sind

2.5.9. Caseinfällung

Die sichtbare Folge der Caseingerinnung kann mit folgenden Termini bezeichnet werden: Koagulat, Gel, Gerinnsel, Bruch, Präzipitat, Flocken. Die Caseinfällung kann entweder durch Säure oder Lab eingeleitet werden [Foissy, 2005].

- **Säuregerinnung**

Wenn der pH-Wert unter den nativen Milch-pH-Wert von 6.7 fällt, dann dissoziieren colloidales Calciumphosphat (CCP) und Calcium von Serinphosphatbindungen ab.

Abgeschlossen ist dieser Vorgang bei ca. pH 5. Die hierbei verwendete Säure ist zumeist Milchsäure, kann aber auch Salzsäure sein [Foissy, 2005].

Bei Erreichen von pH 4.6 (bis 4.8) in Milch kommt es zusätzlich zum CCP-Verlust auch bei pH 4.6- 4.8 zu einem Ladungsgleichgewicht im Casein-Eiweiß. Dieser Punkt wird als *isoelektrischer Punkt* bezeichnet. Die Folgen sind eine geringere Hydratation, sowie ein Überschuss an hydrophoben Bindungen, was zu einer "momentanen" Destabilisierung führt und als Resultat gerinnt und koaguliert das Säurecasein [Foissy, 2005].

Wenn nun eine langsam gesäuerte Milch in Ruhe stehen gelassen wird, kommt es zur Bildung eines zusammenhängenden, stark hydratisierten Casein-“Gels“ (= weiche Gallerte), welches sich in Folge zusammenzieht, was als Gelkontraktion bzw. Synärese bezeichnet wird [Foissy, 2005].

Je nach Geschwindigkeit des pH-Abfalles kommt es zu einer unterschiedlichen Textur der resultierenden Gallerte [Foissy, 2005].

Das Koagulat oder auch Bruch genannt, enthält noch eine große Menge an Wasser und auch Milchfett. Die Molke entsteht durch die Abtrennung des Säurekoagulates [Foissy, 2005].

- **Labgerinnung**

Bei der Labgerinnung kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des kappa-Caseins. Es wird bei nativem Milch-pH-Wert der Mizellen-Stabilisator, kappa-Casein, in zwei Teile zerlegt. Sehr effizient hierbei ist das „echte“ Lab (*Chymosin*; EC 3.4.23.4.) aus Kälbermägen, aber auch andere Proteasen sind sehr wirksam. Das besondere von Lab ist, dass die Spaltung primär nur auf eine Bindung im kappa-Casein ausgerichtet ist. Diese Phe-Met-Bindung ist an Position 105-106 zu finden [Foissy, 2005].

erste Phase der Labgerinnung

Das Resultat der kappa-Casein-Spaltung ist ein hydrophober, N-terminaler Rest, das *Para-kappa-Casein*, welches an der Caseinmizelle assoziiert bleibt, und ein hydrophiler, C-terminaler Rest, das *Glykomakropeptid (GMP)*, welches in die Molke übergeht und ein Teil des Molkenproteins wird. Wenn nun das GMP abgespalten wird, dann wird die Schutzkolloidfunktion gestört (Abb.5). Dadurch kommt es zu einer Änderung negativer Nettoladung des „Zetapotenzials“ der Caseinmizellen. Bevor zusätzliche Serinphosphatpositionen mit ionalem Calcium besetzt werden, muss eine kritische Konzentration an intaktem Rest-kappa-Casein unterschritten werden. Auch noch

zusätzliche Calcium-Brücken können ausgebildet werden, womit die negative Nettoladung noch weiter absinken könnte [Foissy, 2005].

zweite Phase der Labgerinnung

Durch die überwiegenden hydrophoben Bindungen flockt das Labcasein aus. Somit haben die ersten zwei Phasen der Labgerinnung nur ein Ziel, nämlich das Dicklegen des Eiweißes. Wieder bildet sich bei ruhigem Stehen lassen ein "Casein-Gel", welches Synärese zeigt. Die abtrennbare Flüssigkeit ist die Molke [Foissy, 2005].

dritte Phase der Labgerinnung

Als Restmolke wird der restliche Wassergehalt im Gel bezeichnet. Weiters findet auch hier ein Fetteinschluss im Gerinnsel statt. Später kommt es auch zu einer Überlagerung einer unspezifischen Proteolyse durch Chymosin, wo das β -Casein an Pos.189/190 gespalten wird [Foissy, 2005].

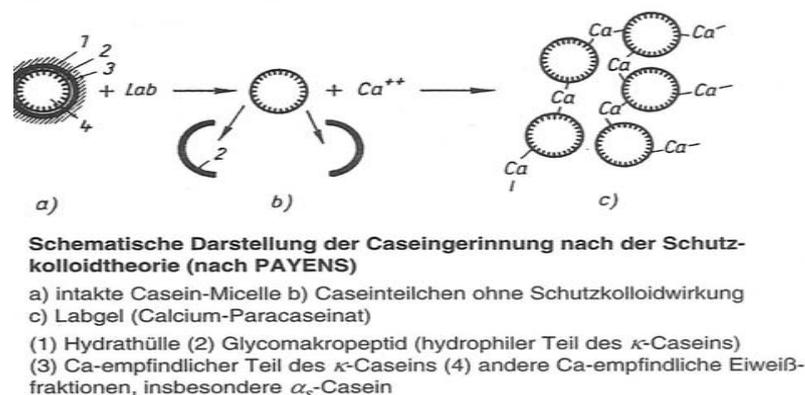


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Caseingerinnung nach der Schutzkolloidtheorie (nach PAYENS) [Spreer, 2005]

2.6. Molkenproteine

Laut Definition handelt es sich beim Terminus Molkenprotein, um alle Eiweißkörper, die nach Caseinfällung bei pH 4.6 und 20°C in Lösung bleiben. Sie bestehen aus vier Hauptkomponenten, dem beta-Lactoglobulin, dem alpha-Lactalbumin, dem Blutsrumalbumin und den Immunglobulinen, deren mengenmäßige Anteile in Tabelle 6 dargestellt sind. Sie zählen zu den globulären Proteinen, welche durch kovalente Disulfidbrücken, Ionen- und Wasserstoffbrücken stabilisiert werden und eine Tertiärstruktur bilden [Foissy, 2005; Dumas et al., 1989].

Tabelle 6: mengenmäßige Anteile der Molkenproteine in Kuhmilch (g/L) [Köller, 1992; Hanser, 1992]

Molkenproteine	Kuhmilch
beta-Lactoglobulin	3.2
alpha-Lactalbumin	1.2
Blutserumalbumin	0.4
Immunoglobulin	0.7
Gesamt	5.6 – 10.4

2.6.1. *beta-Lactoglobulin*

Beta-Lactoglobulin, ein Dimer, besteht aus 162 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von je 18 000 Dalton pro Einheit. Es macht 50% der Molkenproteine und 12% des Totalproteins aus. Außerdem ist es ein typisch globuläres Protein. Beta-Lactoglobulin ist das Hauptmolkenprotein in der Milch von Kühen, Schafen, Ziegen und Büffeln [Thompson et al., 2009]. Beständig ist das Monomer nur bei einem pH < 3.5 während es dazwischen zur Oligomerisierung neigt. Bei einem pH über 8.6, sowie bei Erhitzung und wenn eine hohe Konzentration an Calcium vorbeugt, kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung [Belitz et al., 2008; Dumas et al., 1989].

Beta-Lactoglobulin kommt in neun genetischen Varianten vor, wobei die Variante A und B die häufigsten sind [Jakob, 1994].

Neben den zwei Disulfidbrücken besitzt auch jedes Molekül der beta-Lactoglobulinvariante eine freie SH-Gruppe auf Position 119 oder 121 [Eigel et al., 1984]. Außerdem ist es sehr resistent gegen proteolytische Enzyme [Dumas et al., 1989].

2.6.2. *alpha-Lactalbumin*

20% der Molkenproteine in Kuhmilch bildet das alpha-Lactalbumin [Thompson et al., 2009]. Es ist ein Monomer und besteht aus 123 Aminosäurenresten mit einem Molekulargewicht von 14 200 Dalton. Weiters zählt es zu den Metalloproteinen [Dumas et al.; 1989]. Alpha-Lactalbumin kommt in den genetischen Varianten A und B vor und es enthält acht Cysteinreste.

Zur Stabilisierung der Tertiärstruktur tragen Calciumionen und Disulfidbindungen bei. Außerdem hat es eine biologische Funktion als Untereinheit B der *Lactosesynthase*. Die Untereinheit A bildet eine wenig spezifische *Galactosyltransferase* und die Untereinheit B sorgt dafür, dass der Transfer des Galactoserests selektiv auf Glucose erfolgt [Belitz et al., 2008].

2.6.3. *Blutserumalbumin*

Das bovine Blutserumalbumin enthält 582 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66 267 Dalton. Außerdem besitzt es siebzehn Disulfidbrücken und eine freie SH-Gruppe an der Position 34. Sein Gehalt in der Milch beträgt ungefähr 0.4 g/L. Weiters kann es auch mehrere Liganden binden [Fox, 1989].

2.6.4. *Immunglobuline*

Sie bilden eine sehr komplexe und heterogene Gruppe von Proteinen und ihre Einteilung erfolgt in fünf Klassen, IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Das einzige IgD ist nicht in der Rindermilch enthalten [Eigel et al., 1984]. Die wesentlichste Aufgabe der Immunglobuline gilt der passiven Immunisierung der Kälber nach der Abkalbung [Löffler, 1983]. Am höchsten ist der Immunglobulingehalt in der Kolostralmilch [Fox, 1989].

2.6.5. *Minorkomponenten*

Zu den Minorkomponenten zählen noch die beiden eisenbindenden Proteine *Lactoferrin*, welches im Eutergewebe synthetisiert wird, und *Transferrin*, welches Bestandteil des Blutserums ist.

2.7. **Käseherstellung**

Die Käseherstellung ist eine Dehydrierung bei dem Fett und Casein stark aufkonzentriert werden. Je nach Käsesorte variieren die Herstellungsweisen. Das wichtigste bei der Käseherstellung ist aber die „Käsereimilch“ bzw. auch „Kesselmilch“ genannt. Sie muss qualitativ einwandfrei und vor allem hochwertig sein. Die Käsetauglichkeit setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen, die aus Tabelle 7 zu entnehmen sind. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann ein gutes Endprodukt entstehen [Rimbach, 2010].

Tabelle 7: Anforderungen an die käsetaugliche von Milch [Rimbach et al., 2010]

Merkmale	Anforderungen
1 Hemmstoffe	keine; würden die Starterkulturen hemmen
2 Soxhlet-Henkel-Zahl	6-7.4°SH (entspricht frischer, nicht bereits ansauer Milch)
3 Zellgehalt	<300 000/mL, sonst würden erwünschte Inhaltsstoffe evtl. wegen subklinischer Mastitis gesenkt
4 Keimzahl	so niedrig wie möglich (<50 000/mL), da hitzestabile, bakterielle Enzyme, Eiweiß und Fett negativ beeinflussen können
5 Verderbniserreger	frei von Clostridien (Spätblähungen) und coliformen Keimen (Frühblähungen)
6 Labgerinnungszeit	Milch mit verzögerter Labgerinnungszeit nicht verwenden (Ursache Punkte 1-4)
7 Säuerungsaktivität	Nach Beimpfung mit Säuerungskulturen rasche Säuerung, Verzögerung bedingt durch Punkte 1-4
8 Wärmebehandlung	Falls ja, so schonend wie möglich, da Proteine sonst denaturiert werden
9 Sensorik	einwandfreier Geruch und Geschmack

Nicht nur Rohmilch oder wärmebehandelte Milch von Kuh, Schaf, Ziege, Büffel, sondern auch andere Produkte können der Kesselmilch zugesetzt werden wie Sahne- und Buttermilcherzeugnisse, Süß- und Sauermolke und Molkenrahm [Rimbach, 2010].

In groben Zügen kann die Käseherstellung mit folgendem Schema erklärt werden:

Dicklegen Zerteilung der Gallerte

Milch + Koagulantien (Lab/Säure)-----→Gallerte-----→Bruch/Käse/Frischkäse/Quark + Molke
[Heiss R., 2004]

Anfangs wird die Kesselmilch mittels Zentrifuge oder Filter gereinigt und der Fett- und Eiweißgehalt wird standardisiert. Nach diesem Vorgang folgt die Wärmebehandlung der Milch entweder durch Pasteurisierung, wo auch pathogene Keime abgetötet werden, oder nur durch Thermisierung. Umso stärker der Effekt einer Synärese sein sollte, umso niedriger muss die Temperatur sein. Somit wird bewirkt, dass dem Bruch viel Molke entzogen wird und das Endprodukt hart wird. Genau das Gegenteil will man bei Sauermilchprodukten erreichen, wo versucht wird eine Synärese durch hohe Temperatur zu unterbinden [Rimbach et al., 2010].

2.7.1. Gereifte Käse

Als gereiften Käse werden Erzeugnisse, die aus standardisierter Milch, Mager- oder Buttermilch auf säure- oder labgefälltem Casein basieren, meist unter Einschluss von Milchfett, selten auch unter Anreicherung von Molkeneiweiß, bezeichnet.

Nach der so genannten Drainage, Abscheidung der Molke, wird die zurückgebliebene Masse, unter Pressen geformt, gesalzen und unter Ausnützung mikrobieller und enzymatischer Prinzipien je nach sortentypischer Sensorik gereift. Jede Sorte hat ihre eigenen Wasser-/Trockenmassegehalte sowie Casein : Milchfett-Verhältnisse [Foissy, 2005].

Die Käsesorten lassen sich durch die Art ihrer Caseinfällung, ob Lab- oder Säuregerinnung, einteilen:

- **Labkäse** sind Sorten, bei denen die Caseinkoagulation enzymatisch (Lab und Labersatzenzyme) erfolgt und die Reifung kann von einigen Tagen bis Jahre dauern.
Zu ihnen zählen die meisten Hart-, Schnitt- und Weichkäse.
- **Sauermilchkäse** sind Sorten, bei denen die Caseinkoagulation durch Säurefällung erfolgt und die Reifung kann von einigen Tagen bis Wochen dauern.
Zu ihnen zählen z.B. Quargel, Tiroler Graukäse und Harzerkäse [Foissy, 2005].

Detaillierter wird die Labkäseherstellung durch das Labproduktionsschema dargestellt.

Produktionsstufenschema von Labkäse [nach Foissy, 2005]

Rohmilch
Vorstapelung / Vorreifung
Vorwärmung
[Zentrifugalreinigung]
Standardisierung
[Homogenisierung]
[Thermisierung / Pasteurisierung /
ggf. spezielle Sporenreduktionsmethoden]
[ggf. Vorkonzentrierung mittels Ultrafiltration (bei Weichkäsen)]
Befüllen des Käsekessels / Käsefertigers mit "Kesselmilch"
Temperieren ("Einlabungstemperatur")
Zusatz von Labenzympräparaten, Käsereikulturen,
Käsereisalze und ggf. Käsefarbe
Dicklegung / Bruchbearbeitung
Bruchabfüllung / Molkendrainage / Formung
Pressen / Wenden
Salzen / Salzbad
Lagerung / Reifung / sortenspezifische Behandlungsverfahren
Bonitierung / Portionierung / Verpackung

Die Rohmilch, die für den Käse verwendet wird, muss in einem sehr guten Qualitätszustand sein. Sie sollte möglichst hohe Eiweißgehalte, einen geringen Mastitismilchanteil, wenn möglich Antibiotika frei sein und auch eine gute bakteriologische Qualität haben [Foissy, 2005].

Als Vorstapelung bzw. Vorreifung wird der Zeitraum von der Milchübernahme vom Verarbeitungsbetrieb bis zur Verkäsung verstanden [Foissy, 2005].

Die Standardisierung dient der Fett- und EiweißEinstellung [Foissy, 2005].

Die Homogenisierung ist besonders bei Blauschimmel ein wichtiger Schritt, da sie wichtig für die Lipolyse ist [Foissy, 2005]. Somit können Aromastoffe, die im Fett enthalten sind flüchtig gemacht werden [Spreer, 2005].

Die Thermisierung bzw. Pasteurisierung wird verwendet, um Keime bzw. Enzyme zu inaktivieren [Foissy, 2005].

Der Käsekessel ist ein spezieller Behälter, indem es zur Koagulation der Milch für den Käse, auch Kesselmilch genannt, kommt. Weiters wird danach, auch bei der richtigen Temperierung, der Bruch bearbeitet [Foissy, 2005].

Die Bruchbereitung und -bearbeitung ist sicherlich einer der wichtigsten Schritte für die Eigenschaften des Endproduktes. Anfangs findet die Caseingerinnung, wo der entstandene Bruch von der Molke getrennt wird, statt. Danach kommt es zur Ausdickung, was der Zeitraum von Gerinnung bis zur Weiterbearbeitung des Bruchs ist. Der Bruch wird in würfelförmige Stücke geschnitten und im Zuge dessen entstehen auch Bruchkörner. Letztere werden vorsichtig ausgerührt, um danach eine kurze Rast einzuschieben, was den Effekt der Selbstpressung der Bruchkornmasse hat, bevor es erneut zum Ausrühren kommt [Foissy, 2005].

Die Käseformen bestehen aus Boden- und Seitenteil und bei härteren Käsen noch zusätzlich aus einem Deckel. Das verwendete Material kann entweder Holz oder Metall sein. Die Dimensionen sind sehr variabel [Foissy, 2005].

Die Bruchabfüllung des Bruch-Molkegemisches wird nach Erreichen des angestrebten Säuregrades in der Molke bzw. nach Festigkeit der Bruchkörner vorgenommen. Es wird bei diesem Schritt versucht, eine geformte Käsemasse ohne Molke zu erhalten [Foissy, 2005].

Das Pressen dient der nochmaligen Förderung der Molkendrainage und zur Verdichtung der Bruchkörner [Foissy, 2005].

Das Salzen bzw. das Salzbad ist für die Geschmacksgebung und zur weiteren Molkendrainage [Foissy, 2005].

Unter dem Begriff Käsereifung wird die Lagerzeit bei charakteristischem Umgebungsmilieu verstanden. Anfangs ist der Käseteig noch geschmacklos aber nach dieser Zeit sollte es zur typischen Geschmacksbildung gekommen sein. In dieser Zeit passieren alle relevanten biochemischen Prozesse, die für das Endprodukt von Relevanz sind [Foissy, 2005].

Einer der letzten Schritte ist die Bonitierung, bei welcher eine stichprobenweise Überprüfung und Beurteilung stattfindet. Danach erfolgen die Portionierung und die jeweilige Verpackung [Foissy, 2005].

2.7.2. Zusätze bei der Herstellung von Käse und Mittel zur Oberflächenbehandlung von Käse

Folgende Stoffe dürfen zugesetzt werden:

- Labstoffe :
- Lab (aus Kälbermägen bzw. Kitz- oder Lämmermägen) mit mindestens 75% Chymosinanteil
 - Labmischungen von Lab und Pepsin von Wiederkäuern mit mindestens 25% Chymosinanteil
 - Labaustauschstoffe (z.B. mikrobielles Lab)

Durch gentechnologisch veränderte Organismen hergestellte Labstoffe werden nicht verwendet.

- gesundheitlich unbedenkliche Bakterien-, Hefe- und Pilzkulturen
- Kochsalz
- Gewürze, Kräuter sowie daraus hergestellte Extrakte
- Trinkwasser
- geschmacksgebende Lebensmittel
- Calciumchlorid (E 509) bis max. 20 g pro 100 kg Käsemilch
- Natrium- und Kaliumnitrat (-salpeter) (E 251/E 252) bis max. 15 g pro 100 kg Käsereimilch bei der Herstellung von Schnittkäse, sofern die Restmenge im verzehrfertigen Käse 50 mg pro kg nicht überschreiten werden darf
- Kaliumchlorid (E 508) als Ersatz für Kochsalz, wobei nach dem Prinzip „*quantum satis*“ vorgegangen wird
- Beta Carotin (E 160a) für Schnittkäse und gereifte Weichkäse, wobei max. 25 mg pro kg Käse verwendet werden soll
- Lysozym (E 1105) für gereifte Käse nach dem Prinzip „*quantum satis*“, wobei keines aus gentechnologischen Hintergrund produziert, verwendet werden darf
- Gärungsäuren (E 270) und Zitronensäure (E 330) zur Fällung des Eiweißes bei Molken-Eiweiß-Käse, wobei auch wieder nach „*quantum satis*“
- Raucharomen, die durch naturbelassene Hölzer entstanden sind, wobei der durchschnittliche Gehalt Benzo(a)pyren 0.03 µg pro kg nicht überschreiten darf
- Natriumhydrogencarbonat (E 500) und Calciumcarbonat (E 170) als Zusatz zu Sauermilchtopfen bei der Herstellung von Sauermilchkäsen nach Prinzip „*quantum satis*“ [Codexkapitel_B32]

Für die Oberflächenbehandlung von Käsen:

- Speiseöl, Bienenwachs, natürliche Hartparaffine, mikrokristalline Wachse
- Kunststoffdispersionen zur Plastifizierung
- Natamycin (E 235) für einige Sorten als Antimykotikum bis max. 1 mg/dm² Käseoberfläche, wobei der Stoff 5 mm unter der Oberfläche nicht nachweisbar sein darf
- Holzasche
- frisch entwickelter Rauch aus naturbelassenen Hölzern und Zweigen
- Röstmalzmehl [Codexkapitel_B32]

2.8. Definition von Schimmelkäse und Beispiele der einzelnen Sorten

Schimmelkäse sind Käse, wo die Geschmacks-, Konsistenz- und Aussehenskomponente maßgeblich durch Wachstum eines gezielt verabreichten Edelschimmels bestimmt ist. Je nachdem, wo sich der Schimmel befindet, z.B. innen Roquefort oder außen Camembert, wird unterschieden.

In der Gruppe der Schimmelkäse wird je nach Schimmelbildung unterschieden:

- Oberflächenschimmel (z.B. Camembert und Brie)
- Innenschimmel (z.B. Roquefort, Gorgonzola)

Oberflächen- und Innenschimmel

Die Schimmelstämme, wie z.B. *Penicillium roqueforti* oder *Penicillium camemberti* bewirken eine Spaltung des Milchfettes, weshalb es zur Bildung des spezifischen Geschmacks kommt. Die wichtigste Einstellung, um ein gutes Schimmelmyzel bilden zu können, ist für eine gute Luftzufuhr zu sorgen aber auch ein Medium, dem er Nahrung entziehen und an das er Ausscheidungsprodukte abgeben kann. Die Vermehrung des Schimmelpilzes erfolgt durch Sporenbildung. Bei dieser entsteht ein Myzel, welches sich durch den ganzen Käse zieht und dabei meist unsichtbar bleibt. Je nach Art gibt es Wuchsformen an der Oberfläche, die sich nach Aussehen und Farbe unterscheiden lassen [Hanreich, 1995]. Für die Farbe des Schimmels, ob grün, blau oder gar braun, ist das Alter verantwortlich [Cantor et al., 2004]. Außerdem wird auch zwischen schädlichen und schmackhaften Schimmelformen unterschieden. In der Käseindustrie wird aber auf eine Veredelung des Käses gesetzt, weshalb ein

Ansatzschimmel kultiviert wird, um Fremdschimmelbefall zu vermeiden. Oberflächenschimmel tragen zur Reifung und Geschmacksbildung von außen nach innen bei. Während Innenschimmel den ganzen Käseteig durchwachsen. Die Luftzufuhr kann durch das so genannte „Pikieren“ passieren, wo in den Käse mit einer Nadel eingestochen wird, um genügend Sauerstoff für die Kultur einbringen zu können [Hanreich, 1995].

Doppelschimmelkäse

Doppelschimmel wird aus Rohmilch hergestellt. Durch Beimpfung mit dem Blauschimmel und Pikieren zur Sauerstoffversorgung kommt es zu einer blauen Schimmeladerung im Inneren, während die Käseoberfläche einen weißen Edelschimmel vorweist. Für diese Art der Käsereifung ist einiges an Erfahrung betreffend der eingesetzten Schimmelkulturen nötig, da sie sich gegenseitig hemmen. Nach dem Salzbad wird der Käse pikiert, damit der Luftzutritt nach Innen gewährleistet ist. Je nach Stichanzahl kommt mehr oder weniger Luft ins Innere, womit eine stärkere Schimmelpilzentwicklung entsteht. Da sich diese Stichöffnungen nicht schließen sollten, wird die Käseoberfläche öfters abgeschabt, um den Luftweg offen zu lassen. Der Geschmack wird mit zunehmender Reife pilzig-pikant [Hanreich, 1995].

Blauschimmel

Der Blauschimmelkäse ist ein Käse, bei dem durch die speziellen Blauschimmelkulturen im Inneren des Käses eine blaue Schimmeladerung entsteht. Als Blauschimmelkäse werden halbfeste Schnittkäse in Laib- bzw. Stangenform bezeichnet, welche durch Zusatz von speziellen *Penicillium Roqueforti*-Kulturen aus pasteurisierter Milch hergestellt werden [Codexkapitel_B32]. Durch diese Kulturen erhalten sie auch ihr Aussehen, ihre blau-grüne Aderung, und ihren typischen Geschmack. Die Milchen, die von Kühen, Schafen und Ziegen stammen können, werden durch Labextrakt koaguliert. Der Bruch wird durch mesophile Milchsäurebakterien gesäuert und bei niedrigen Temperaturen gekocht. Die Salzung mancher Sorten kann durch wiederholtes Trockensalzen der Oberfläche passieren oder auch durch die Salzlake [Fox et al., 2004]. Die wohl bekanntesten Vertreter sind der italienische Gorgonzola aus pasteurisierter Kuhmilch, der französische Roquefort aus roher Schafsmilch, der englische Stilton aus pasteurisierter Kuhmilch und der dänische Danablu aus thermisierter Kuhmilch [Ardö, 2007].

Der Bruch wird teilweise gewaschen aber nicht gepresst. Um den Käse vor Austrocknung zu schützen, wird er entweder mit Öl behandelt, oder in eine Alufolie gewickelt [Codexkapitel_B32]. Die weiße und ziemlich trockene Rinde soll das Wachstum des Schimmels nach außen verhindern [Cantor et al., 2004].

Der Fettgehalt in der Trockenmasse beträgt 50% und der Höchstwassergehalt 47%. Die Reifung dauert meist sechs Wochen. Die Färbung des Käses ist danach weiß-gelblich [Codexkapitel_B32]. Blauschimmelkäse aus Schafsmilch sind auch weißer als jene aus Kuhmilch. Dennoch kann durch die Homogenisierung von Rahm bei Käsen aus Kuhmilch ein ähnlicher Effekt erzielt werden. Dieses Verfahren wird bei Danablu angewendet [Ardö, 2007].

Die Rinde der Blauschimmelkäse ist leicht narbige aber rißfrei. Der Käseteig selber hat eine rein weiße, mit leichtem Stich ins cremefarbige, Färbung und ist weichschnittig bis streichfähig mit etlichen Bruchspalten. Ein weiteres Merkmal ist auch die gleichmäßig verteilte Schimmeladerung, die durch das Pikieren des Käses entstanden ist und die mit Schimmel bewachsenen Stichkanäle, die sichtbar sein können. Der Geschmack kann als stark gesalzen und scharf-pikant bezeichnet werden [Codexkapitel_B32]. Hier spielen sicherlich der starke Fettabbau, bei denen freie kurzkettige Fettsäuren entstehen, aber auch Methylketone, Ester und Lactone eine Rolle [McSweeney, 2004].

Grünschimmel

Grünschimmel sind Käse, die durch ihre blau-grüne Schimmelkulturen im Inneren auffallen. Ein bekanntes Beispiel ist der Österkron. Der Grünschimmelkäse ist ein halbfester Schnittkäse in Laib- oder Stangenform, der unter Zugabe von *Penicillium Roqueforti*-Kulturen zur Käsereimilch aus pasteurisierter Milch produziert werden. Die Rinde entsteht durch die Reifung bei hoher Luftfeuchtigkeit. Der Oberflächenschimmel wird vor Abgabe an den Handel abgewaschen und die Rinde vor Austrocknung mit Öl oder Alufolie geschützt. Der Fettgehalt in der Trockenmasse beträgt 45% mit 50% Höchstwassergehalt bzw. 55% bei einem Höchstwassergehalt von 48%. Die Färbung der Rinde ist graugelb bis rötlich und nach dem Waschen weiß und rißfrei mit Einstichstellen. Teilweise kommt es auch leicht zum Rotschmieransatz sowie zu Grün- und Weißschimmelstellen. Die Färbung des Teiges ist weiß bis hellgelb und von der Konsistenz weichschnittig, leicht krümelig und eventuell leicht speckig mit einigen Bruchspalten. Die gleichmäßige Schimmeladerung kann grün bis blaugrün sein und die

mit Schimmel durchzogenen Kanäle sind erkennbar. Der würzig-pikante Geschmack entsteht durch den durch Edelschimmel-verursachten Fettabbau [Codexkapitel_B32].

Weißschimmelkäse

Weißschimmelkäse sind z.B. Camembert oder Brie, welche durch ihren weißen Oberflächenschimmel geprägt sind. Diese Käse werden aus zumeist pasteurisierter Milch und ohne Pressen des Bruchs unter Verwendung von mesophilen und thermophilen Milchsäurekulturen, Lab und durch Zugabe von Edelschimmelkulturen hergestellt [Codexkapitel_B32]. Der traditionelle Camembert wird aus Rohmilch hergestellt. Der charakteristische Filzüberzug auf der Oberfläche stammt vom Wachstum von *Penicillium camemberti*. Auch das Aroma und der Geschmack werden von diesem Stamm beeinflusst. Die Käsemilch wird mit Schimmelsporen versetzt oder mit ihnen nach der Herstellung auf den Käse besprüht. Der Bruch wird weder gewaschen noch nachgewärmt. Nach der Salzung wird der Käse in einen Raum bei 85% relativer Luftfeuchtigkeit, 12°C für 10-12 Tage gelagert um die Oberfläche des Bruchs zu trocknen, was ein wichtiger Schritt für die Entwicklung der Mikroflora ist. Charakteristisch ist der extensive Katabolismus von Laktat auf der Käsoberfläche durch den Schimmel, was zu einer Erhöhung des pH-Werts führt und zu einer Migration des Laktats vom Kern and die Oberfläche. Calciumphosphat fällt durch den pH der Oberfläche aus und lösliches Calciumphosphat wandert durch den Käse nach außen. Dies bewirkt eine Erweichung des Käses und es kommt zu einem Wachstum des Weißschimmels [Spinnler und Leclercq-Perlat, 2007].

Die Fettgehalte und Höchstwassergehalte sind wie folgt:

- bei 25% F.i.T → 63% → Bezeichnung für „Weichkäse nach Camembert-Art“
- bei 45% F.i.T → 60%
- bei 55% F.i.T → 56%
- bei 65% F.i.T → 52%

Die Käsehaut ist geschlossen aber nicht zäh. Die Färbung im Inneren ist hellgelb mit einem teilweise helleren, weißen Kern mit einzelnen Bruchlöchern. Der Teig reift von außen nach innen [Codexkapitel_B32]. Dauer der Reifung beträgt 4-6 Wochen [Hanreich, 1995].

Edelpilzkäse – Roquefort

Der echte Roquefort hat einen geschützten Namen und wird aus reiner Schafsmilch produziert. Die Grünschimmelkultur wird in die Lagen des Bruchs in die Form gestreut. Dem Rohling wird mehr Salz beigemischt als bei anderen Käsesorten. Nach dem Trockenprozess kommt es zu einer Besprühung mit Camembertkulturen. Danach kommt es erneut zu einer Trocknung. Nach dem Pikieren wird der Käse auf Gitterhorden für den Reifungsprozess in den Reifungskeller gelegt. Der Weißschimmelbelag wird mit Salzwasser abgewaschen. Während der Reifungszeit, die 4-6 Wochen dauert, wird der Käse oftmals abgeschabt und gewendet. Die Luftkanäle werden durch den Schimmel durchwachsen. Nach dieser Prozedur wird der Käse gut und fest in die Alufolie verpackt und bei einer Temperatur von 5°C für 4-6 Wochen gelagert [Hanreich, 1995].

Gorgonzola

Gorgonzola ist das Pendant zum Roquefort nur stammt er aus Norditalien. Je nach Herstellungs- und Reifungsart wird milder oder pikanter Gorgonzola gewonnen. Zuerst werden Abend- und Morgenmilch vermischt und mit Rahm sowie mit Säureweckern versetzt. In diesem Mix aus zwei Milchen wird nun die Gorgonzolakultur gemischt und für 30-45 Minuten stehen gelassen. Danach wird die Milch auf 30-32°C erwärmt und mit Lab versetzt. Die gebildete Gallerte wird in Würfel geschnitten und der Bruch wird gepresst, sowie geformt. Nach der zweitägigen Trocknungsphase kommt er in einen speziellen Lagerraum mit 10-12°C und 85-95% Luftfeuchtigkeit. Wenn der Schimmel sichtbar ist, wird der Käse mit Salz eingerieben und pikiert. Nach Abschluss der Verschimmelung kommt es zur Verpackung mit Alufolie und zur Kühlung bei 5°C [Hanreich, 1995].

2.9. Biochemie der Käsereifung

Der Reifungsprozess ist ein sehr komplexer Vorgang, welcher mikrobielle und biochemische Vorgänge im Bruch involviert, die als Resultat die charakteristische Entwicklung des Geschmacks und der Textur des jeweiligen Käses haben. Eine weiche Textur beispielsweise erhält der Käse durch die Hydrolyse von Caseinmizellen, was eine Veränderung der Wasserbindung und des pH-Werts im Bruch zur Folge hat. Der mikrobielle Vorgang beinhaltet den Tod und die Auflösung von Starterzellen, das Wachstum der ursprünglichen Flora und in vielen Sorten die Entwicklung einer

sekundären Mikroflora (z.B. *Propionibacterium freudenreichii* im Schweizerkäse, Schimmel in Schimmelkäse und eine komplexe Gram-positive Flora bei Schmierkäse) was eine Rolle für den Geschmack und die Textur spielen [McSweeney, 2004].

Die biochemischen Veränderungen bei der Reifung lassen sich in primäre und sekundäre Gruppen einteilen.

Zu den primären zählen folgende:

- Lipolyse
- Proteolyse
- Metabolismus der restlichen Laktose
- Metabolismus von Laktat und Citrat

Zu den sekundären zählen hingegen:

- Metabolismus der Fettsäuren
- Metabolismus der Aminosäuren

Die restliche Laktose wird schnell in den frühen Stadien der Reifung zu Laktat abgebaut. Benötigt wird dieses Laktat als ein wichtiger Ausgangsstoff für eine Vielzahl an Reaktionen wie z.B. Racematisierung, Oxidation oder für den mikrobiellen Metabolismus.

Auch der Citratmetabolismus ist für einige Käsesorten nicht unbedeutend.

Die Proteolyse mit ihren Reaktionen ist sehr wichtig. Katalysiert wird ihr Vorgang durch restliches Koagulans, Proteinasen und Peptidasen von Milchsäurebakterien, oder anderen Mikroorganismen, die im oder auf dem Käse wachsen [McSweeney, 2004].

Metabolismus der restlichen Laktose und Laktat

Der Metabolismus der Laktose zu Laktat wird durch ausgewählte Kulturen von Milchsäurebakterien, so genannten Startern, hervorgerufen. Der Beitrag und der Umfang der Säuerung beeinflusst die anfängliche Textur des Bruchs. Der pH-Wert ist wichtig, da er die Textur stark beeinflusst. Ein Käse mit hohem pH-Wert bewirkt ein Erweichen. Indirekt kann der pH auch die Aktivität der Reifungsenzyme und die Retention der Enzyme im Bruch während der Reifung beeinflussen. Der Großteil der

Laktose in der Milch wird an die Molke verloren bzw. auch als Laktat während der Herstellung. Eine geringe Menge bleibt am Ende der Herstellung jedoch im Bruch übrig. Die übrig gebliebene Laktose, die vom Bruch aufgenommen wird, wird schnell nach der Formung und dem Kaltwerden durch *Streptococcus thermophilus* metabolisiert [McSweeney, 2004].

Laktat wird durch Laktose und durch das Wachstum der Starter gewonnen und fungiert als ein wichtiges Substrat für eine Reihe von Reaktionen während der Käsereifung. Wenn Laktat durch Milchsäurebakterien im Käse oxidiert wird, dann entstehen Acetat, Ethanol, Formiat und Kohlendioxid.

Im anaerobe Metabolismus wird Laktat durch *Clostridium tyrobutyricum* zu Butyrat und Wasserstoff verstoffwechselt, was dann zu einer Fehlgärung („Spätblähung“) und einem negativen Geschmack führt. Zur Spätfehlgärung kommt es wegen der Zeit, die das Natriumchlorid benötigt, um in den Käse zu diffundieren und um eine inhibitorische Konzentration zu erreichen. Umgangen wird dies durch die Minimierung von Sporen in der Milch, was durch die Entfernung mittels Bactofuge oder Mikrofiltration möglich ist. Die wohl wichtigste Funktion des Laktatmetabolismus ist die Entwicklung von großen Käselöchern in der Reifung.

Geschmacksbildend sind die Stoffwechselprodukte Propionat und Acetat aus der Verstoffwechslung von Laktat, während Kohlendioxid nach oben aufsteigt, wo es sich dann anreichert, solange bis der Partialdruck gesättigt ist und ein Loch entsteht.

Dieser Metabolismus spielt auch bei Oberflächenschimmelkäsen z.B. bei Camembert und Brie eine wichtige Rolle. Sobald die Herstellung vollendet ist, wird die Oberfläche von sekundären Mikroorganismen besetzt, wobei *G. candidum* und *P. camemberti* schnell Laktat zu Kohlendioxid und Sauerstoff verstoffwechseln, was die Oberfläche entsäuert. Die Reduktion der Calciumphosphatkonzentration und die Erhöhung des pH-Wertes sowie die Proteolyse bewirken eine Weichmachung des Inneren von Camembert-artigen Käsen. Diese Veränderung der Matrix hat aber auch Folgen auf die Geschmackskomponenten, besonders auf flüchtige Geschmackskomponenten. Der Laktatmetabolismus und die pH-Steigerung auf der Oberfläche haben einen großen Einfluss auf die Proteolyse durch die Steigerung der Plasminaktivität. Das Plasmin und die restliche Koagulantien sind hauptsächlich für die Proteolyse verantwortlich [McSweeney, 2004].

Proteolyse

Die Proteolyse ist ein Vorgang bei der Proteine in kleinere Bruchstücke z.B. Peptide, die dann weiter zu Aminosäuren, abgebaut werden. Die Proteolyse ist der erste biochemische Vorgang, welcher in den meisten Käsen bei der Reifung stattfindet. Er bewirkt eine Erweichung der Textur durch Hydrolyse der Caseinmatrix des Bruchs, da es zur Senkung der Wasseraktivität im Bruch kommt und zu einem direkten Einfluss auf Geschmack, was durch die Produktion von kurzen Peptiden und Aminosäuren, welche geschmacksgebend, manchmal, auch bitter, sind, passiert. Die entstandenen freien Aminosäuren sind Substrat für eine Reihe von katabolen Reaktionen, die wichtig für die Geschmacksgebung sind [McSweeney, 2004].

Proteinasen und Peptidasen, die die Proteolyse katalysieren können, können aus sechs Quellen hervorgehen:

- Koagulans wie z.B. *Chymosin*
- Milch mit ihren originären Proteasen wie z.B. *Plasmin*
- Starter von Milchsäurebakterien
- Nicht-Startermilchsäurebakterien
- sekundäre Starter wie z.B. *P. freundenreichii*, *P. camemberti*, *P. roqueforti*
- exogene Proteinasen oder Peptidasen, die der Milch oder dem Bruch zugesetzt worden sind [McSweeney, 2004]

Außerdem kann die Proteolyse auch in eine primäre und sekundäre eingeteilt werden. Bei der primären, wo es zu elektrophoretisch messbaren Veränderungen von alpha-, beta- und gamma-Casein und höhermolekularen Peptiden kommt, sind vor allem die in die Gallerte übergegangenen Reste des Labenzym *Chymosin* und originäre Milchproteasen, wie *Plasmin* und *Cathepsin D* von Bedeutung. Die sekundäre Proteolyse wird vor allem durch die Aktivität der Starterkulturenzyme eingeleitet [Frister, 1996; Meisel, 1991].

Primäre Proteolyse

Unter primärer Proteolyse wird die Spaltung von Caseinen in große Bruchstücke verstanden. Eine sehr wichtige Quelle für proteolytische Enzyme ist das restliche Koagulans zumeist *Chymosin* aber auch *Plasmin*, *Cathepsin D* und andere Proteinasen somatischer Zellen. Sogar die Milchsäurebakterienproteinasen sind schwach proteolytisch. Sekundäre Starter wie z.B. *P. roqueforti* und *P. camemberti* besitzen

extrazelluläre Proteinasen, welche auf alpha-_{s1}- und beta-Casein wirken. Weiters besitzen auch Hefen Endopeptidasen, welche auf alpha-_{s1}- und beta-Casein wirken [Upadhyay et al., 2004].

Starterenzyme

Nicht nur milcheigene Enzyme wie *Plasmin*, oder somatische Zellen welche Proteinasen wie *Cathepsine B, D, G, H, L* und *Elastase* enthalten, sind wichtig für den Käsereifungsprozess, sondern auch Enzyme von Starterkulturen, sekundären Starterkulturen und von Nicht-Starterbakterien [McSweeney, 2004].

Die Starterenzyme können in zwei Gruppen eingeteilt werden, nämlich in extrazelluläre und intrazelluläre Proteinasen und Peptidasen. Es ist somit ein wichtiger Schritt die genaue Lokalisierung der Enzyme in der Zelle zu kennen, um ihre Funktion bei der Käsereifung richtig anwenden zu können. Caseinbruchstücke werden von extrazellulären Proteinasen hydrolysiert, um diese für die intra- und extrazellulären Peptidasen zugänglich zu machen, welche sie dann zu kleinen Peptiden und Aminosäuren abbauen und somit eine Vorstufe für das Käsearoma bilden [Visser, 1993]. Unterschieden wird auch bei den Peptidasen zwischen Endo- und Exopeptidasen [McSweeney, 2004].

Das *Chymosin* besteht aus 320 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 35 600 Dalton. Es ist eine *Aspartatprotease*, welche aus dem Labmagen von Saugkälbern gewonnen wird [Fox und McSweeney, 1997]. Am stabilsten ist es bei einem pH von 5.3-6.3. Ab pH 8 kommt es zur Denaturierung [Harper und Lee, 1975]. Es greift alpha-_{s1}- und beta-Casein an derselben Region an. Weiters ist es relativ hitzestabil [Sousa et al., 2001]. In Lösung spaltet *Chymosin* beta-Casein an sieben Stellen, vor allem jene welche nahe dem hydrophoben C-terminalen Ende von beta-Casein sind. Diese Ausschnitte können eine Bildung von kurzen hydrophoben Peptiden zur Folge haben, die bitter sein können. Die Aufgabe des *Chymosins* ist die Labgerinnung der Milch, die man in drei Phasen einteilen kann:

- *Enzymatische* Phase, wo es zur Spaltung der Phe105-Met106-Bindung im kappa-Casein, sowie zur Bildung des para-Caseins und Glykomakropeptids kommt
- *Gerinnungs- und Koagulationsphase*, wo es zur Bildung der Labgallerte kommt
- *Synärese*, wo es zur Gelschrumpfung und zur Abgabe von Molke kommt [Foissy, 2005]

Einflussfaktoren, die bei der Hydrolyse des kappa-Caseins besonders wichtig sind, sind der pH (Optimum für die Spaltung liegt bei pH 6.0), die Ionenstärke, die Temperatur (Optimum bei 45°C), der Grad der Glykosilierung und die Hitzebehandlung der Milch (zu hohe Temperaturen wirken sich negativ auf die Milchgerinnung aus). *Chymosin* spaltet alpha-_{s1}-Casein zuerst auf Position Phe23-Phe24, wobei kleine Peptide entstehen, welche von Starterproteinasen hydrolysiert werden. Es spaltet aber auch besonders an Leu101-Leu102 [McSweeney, 2004].

Das alpha-_{s2}-Casein ist resistenter als das alpha-_{s1}-Casein und seine Angriffsstellen sind limitiert auf die hydrophoben Stellen des Moleküls (Sequenzen 90-120 und 160-207) [McSweeney, 2004].

Das para-Casein hat auch einige durch Chymosin spaltende Angriffspunkte [McSweeney, 2004].

Milch ist eine wichtige Quelle für proteolytische Enzyme. Die Hauptproteinase der Milch ist *Plasmin*, welches zur Gruppe der Serinproteinase gezählt wird. Es stammt aus dem Blut und ist bei 37°C und pH 7.5 optimal aktiv. Gebildet wird es aus dem inaktiven Vorläufer *Plasminogen*, der durch plasminogene Aktivatoren zur Umwandlung zu *Plasmin* führt. In der Milch sind *Plasminogen*, *Plasmin* und plasminogene Aktivatoren hauptsächlich mit Caseinmizellen assoziiert (Abb. 6). Die Plasmininhibitoren befinden sich im Serum und gehen bei der Molkendrainage verloren. Lysin- und Argininbindungen des beta-Caseins werden durch *Plasmin* hydrolysiert und in einem nicht so großen Ausmaß auch die alpha-_{s2}-Caseine. Es ist sehr hitzestabil und seine Aktivität steigt mit erhöhter Kochtemperatur. Die Plasminaktivität ist vor allem bei Käsen, die mit hohen Temperaturen hergestellt worden sind, sehr signifikant und hat somit große Auswirkungen auf die Proteolyse, im Gegensatz zu Käsen, die bei niedrigeren Temperaturen „gebrannt“ werden. *Plasmin* ist bei Kochtemperaturen bis etwa 55°C relativ hitzestabil während viel Chymosinaktivität verloren geht. Der optimale Temperaturbereich liegt bei 35°C bis 45°C. Das wichtigste Substrat in Käse für *Plasmin* ist das beta-Casein, welches an drei Stellen angegriffen wird: Lys28-Lys29, Lys105-His106 und Lys107-Glu108. Es spielt vor allem bei Schimmel- und Schmierkäsen eine Rolle bei denen während der Reifung der pH steigt und sich vom *Chymosin*-pH-Optimum zum *Plasmin*-pH bewegt [McSweeney, 2004].

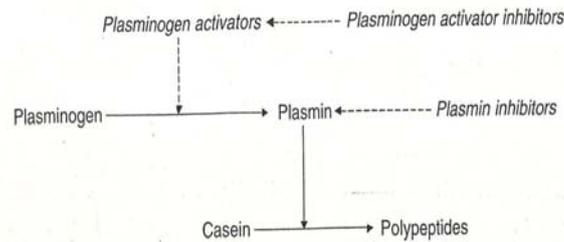


Abbildung 6: Plasmin/ plasminogenes System in Milch [McSweeney, 2004]

Auch andere originäre Proteinasen, welche ursprünglich von den Leukozyten der Körperzellen abstammen, beinhaltet die Milch wie z.B. *Cathepsin B, D, G, H, L* und *Elastase*. Dennoch sind nur *Cathepsin B* und *D* in der Milch bestätigt [McSweeney, 2004].

Cathepsin D ist eine *Aspartyl-Proteinase* mit einem Temperaturoptimum bei 37°C und pH 4. Sie ist eine typische Säugetier-Proteinase, die durch den Vorläufer *Procathepsin D* gebildet wird. Durch die Molkendrainage sowie Pasteurisierung geht ein Großteil verloren [McSweeney, 2004].

Sekundäre Proteolyse

Diese mikrobiellen Enzyme der Starterkulturen spalten, die in der primären Proteolyse entstandenen Proteinfragmente in kurzkettenige Peptide und freie Aminosäuren, die für die Geschmacksbildung im positiven, wie auch im negativen Sinne verantwortlich sind [Frister, 1996]. Die Menge an freien Aminosäuren ist in Rohmilchkäsen höher, da die Proteolyse höher durch die *Aminopeptidasen* der originären Milchorganismen ist. Die Zusammensetzung der freien Aminosäuren durch die Milchbehandlung ist signifikant variabel, weshalb Aminosäuren je nach Behandlung charakteristisch enthalten sein können [Upadhyay et al., 2004].

Primäre und sekundäre Starterkulturen

Starterkulturen, auch primäre Kulturen genannt, sollen der Ansäuerung des Käseteigs dienen. Dies passiert durch die Umwandlung von Laktose zu Milchsäure. Es handelt sich um mesophile und thermophile Bakterienkulturen z.B. *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc sp.* [Parente und Cogan, 2004]

Sekundäre Starterkulturen dienen nicht der Milchsäurebildung, sondern sind für organoleptische und biochemische Prozesse nötig. Zu ihnen zählen z.B. *Propionibacterium freundenreichii*, *Geotrichum candidum* [Parente und Cogan, 2004].

Propionibacterium sp., die als sekundäre Starter in Käsen nach Schweizer Art verwendet werden, sind schwach proteolytisch aber stark peptidolytisch. Das proteolytische System bei *P. camemberti* und *P. roqueforti* ist gleich. Beide Organismen synthetisieren *Aspartyl-* und *Metalloproteinasen* [McSweeney, 2004].

G. candidum wird oft in Käsen mit Schimmel und Schmiere gefunden. Seine Enzyme sind noch nicht sehr detailliert studiert worden, aber eine sehr komplexe bakterielle Flora entsteht auf der Oberfläche der Schmierkäse, welche am Schluss der Reifung aus Gram-positiven Organismen wie z.B. *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* und *Corneibacterium* besteht. Die Enzyme von *Brevibacterium linens* sind schon gut charakterisiert. Diese produzieren extrazelluläre Proteinasen und *Aminopeptidasen* zusätzlich zu einer Reihe von intrazellulären Enzymen [McSweeney, 2004].

Metabolismus von Citrat

Citrat ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Geschmacksbildung in einigen Sorten, welcher Gebrauch von mesophilen Starterkulturen macht [McSweeney, 2004].

Es wird durch Citrat-positive Stämme wie *Lactococccen* verstoffwechselt, welche ein Plasmid haben, um Citrat zu transportieren [McSweeney, 2004].

Aber auch *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* und *Ln. lactis* können Citrat verstoffwechseln. Das Stoffwechselprodukt, Kohlendioxid, ist für die kleinen Käselöcher verantwortlich und wichtig für den Geschmack des Käses [McSweeney, 2004].

Lipolyse

Lipide durchlaufen einer Hydrolyse oder einer Oxidation, um abgebaut zu werden. Jedoch sind oxidative Veränderungen im Käse sehr begrenzt bedingt durch das vorherrschende niedrigere Reduktionspotential [McSweeney, 2004].

Triglyzeride durchlaufen in allen Käsen eine Hydrolyse, welche die Bildung von freien Fettsäuren in der Käsereifung zur Folge hat [McSweeney, 2004].

Die Lipolyse kommt in allen Käsen vor, jedoch aber mit unterschiedlicher Intensität. Sie ist vor allem in italienischen Sorten und Blauschimmelkäsen sehr intensiv. Diese intensive Aktivität der Lipolyse ist zumeist unerwünscht, da es oft zu unbefriedigenden Geschmacksverschiebungen wie z.B. Ranzigkeit, kommen kann. Fettsäuren sind aber wichtige Vorstufen für flüchtige Geschmacksverbindungen. Lipolytische Agenzien in

der Milch sind vor allem, im Koagulans und in der Käsemikroflora enthalten. Die Milch selber enthält eine eigene Lipase namens *Lipoproteinlipase* mit einem Gewicht von 55 000 Da, die in Rohmilch sehr aktiv ist. Inaktiviert wird sie aber durch Pasteurisation. Die Hauptaufgabe dieser *Lipase* ist der Plasmatriglyzeridmetabolismus. Wenn es zu einer Lipolyse kommt, was durch die Zerstörung der Fettkügelchenmembran passiert, dann entwickelt sich ein negativer Geschmack. Die Lipolyse bevorzugt mittelkettige Fettsäuren. Labpasten enthalten auch viel Lipaseaktivität [McSweeney, 2004].

Penicillium roqueforti, die Bakterienkultur, die für Blauschimmelkäsen in Verwendung ist, ist das am intensivsten betreibende lipolytische Bakterium. Es besitzt zwei Lipasen mit einem pH-Optimum von 7.5-8 und 9-9.5 [McSweeney, 2004].

Penicillium camemberti produziert eine extrazelluläre Lipase, welches ein Optimum bei pH 9 und 35 °C hat [McSweeney, 2004].

Metabolismus von freien Fettsäuren

Kurzkettige Fettsäuren, sowie auch freie Fettsäuren können einen direkten Einfluss auf den Geschmack haben. Sie dienen als Ausgangsstoffe für die Produktion von flüchtigen Geschmackskomponenten [McSweeney, 2004].

Ester kommen in vielen Käsesorten vor und werden durch die Reaktion von freien Fettsäuren mit Alkohol produziert [McSweeney, 2004].

Lactone sind zyklische Komponente, die durch Hydroxysäuren entstehen, wobei gamma- und delta-Lactone in Käse gefunden wurden. Ihre Produktion ist jedoch begrenzt durch ihre Vorläuferverbindungen, den Hydroxysäuren [McSweeney, 2004].

Der freie Fettsäuremetabolismus ist signifikant in Blauschimmelkäse, wo die freien Fettsäuren durch die Aktivität der Sporen und des vegetativen Myzels des *P. roqueforti* zu 2-Methylketonen umgewandelt werden. Wie viele Methylketone entstehen, hängt von einigen Faktoren, wie z.B. der Temperatur, der physiologischen Lage des Schimmels und der Konzentrationen der Vorläufer Fettsäure ab. Die Herstellung ist bei einem pH-Wert zwischen 5 und 7, was die meisten Blauschimmelkäse auch haben, am stärksten. Bis jetzt sind elf Methylketone im Käse identifiziert worden. Das am häufigsten vorkommende ist z.B. das Pentan-2-on oder das Heptan-2-on [McSweeney, 2004].

Metabolismus von freien Aminosäuren

Durch freie Aminosäuren kommt es auch zur Geschmacksgebung. Aminosäuren in Käsen können durch einen von zwei Hauptwegen katabolisiert werden, welche durch die Aktion von *Aminotransferase* oder *Lyase* oder anderen katabolen Wegen initiiert wird. Beim ersten Weg, wo eine *Aminotransferase* tätig ist, wird eine Aminosäure in die korrespondierende alpha-Ketosäure umgewandelt. Diese alpha-Ketosäuren werden zu einer Reihe von anderen Verbindungen, entweder durch enzymkatalysierte Wege oder chemische Reaktionen, abgebaut. Alpha-Ketosäuren, die durch *Aminotransferasen* produziert wurden, werden durch weitere käseverwandte Mikroorganismen zu flüchtigen Geschmackskomponenten abgebaut [McSweeney, 2004].

Die Ketosäuren, gebildet aus aromatischen Aminosäuren, werden durch verschiedene Wege abgebaut und bilden viele wichtige flüchtige Geschmacksverbindungen für den Käse [McSweeney, 2004].

Aminosäuren können auch durch Desaminierung abgebaut werden, was oft zur Geschmacksgebung von vor allem Schmierkäsen führt [McSweeney, 2004].

Abbildung 7 sollte einen Überblick über die wichtigsten Prozesse zur Bildung flüchtiger Aromaverbindungen geben.

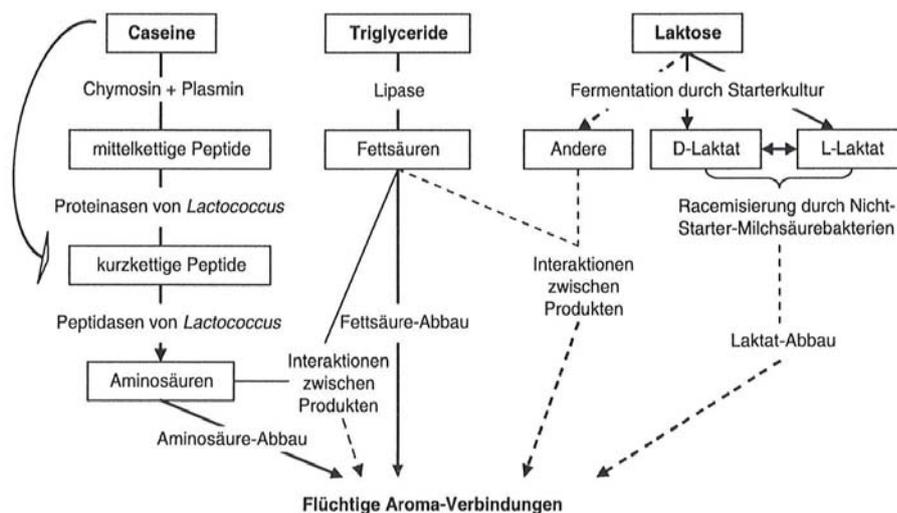


Abbildung 7: Übersicht zu den biochemischen Abläufen während der Käsereifung [Rimbach et al., 2010]

2.9.1. Methoden zur Überwachung der Proteolyse im Käse

Techniken für die Beurteilung der Proteolyse in Käse kann generell in 2 Kategorien eingeteilt werden:

- nicht-spezifische Methoden
- spezifische Methoden

Zu den nicht-spezifischen Methoden zählen die Bestimmung des löslichen Stickstoffgehalts nach der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln oder Puffern. Sie gibt adäquate Informationen über das gesamte Ausmaß der Proteolyse und der Aktivität der proteolytischen Agenzien aber keine Angaben zu spezifischen Peptiden, die während der Reifung abgebaut worden sind. Möglich wird dies durch die Anwendung der Makro-Kjeldahlmethode, welche gut wiederholbar jedoch auch sehr zeitintensiv ist. Solche Techniken sind allgemein leicht anwendbar und nützlich für Routinemessungen der Käsereifung [Upadhyay et al., 2004].

Methoden zur Grobfractionierung

Die Fraktionierung der Stickstoffkomponenten von im Käse vorkommende Proteine bzw. auch Peptide dient der Analyse. Diese Methode basiert auf einer selektiven Präzipitation, bei der mit verschiedenen Chemikalien, wie z.B. Trichloressigsäure oder Phosphorwolframsäure gearbeitet wird, um Proteine, Peptide und Aminosäuren zu erhalten. Sie zählt auch sicherlich zu den ältesten und am häufigsten eingesetzten Methoden zur Fraktionierung von Stickstoffkomponenten im Käse [Christensen et al., 1991].

Weitere Methoden sind:

- Fraktionierung mit Wasser: Je nach Zeit, Temperatur und Wahl der Verdünnung enthält die wasserlösliche Stickstofffraktion ca. 70% der löslichen Stickstoffkomponenten [Kuchroo und Fox, 1982]. Diese Gruppe ist sehr heterogen und beinhaltet auch Molkenproteine, niedermolekulare Abbauprodukte der Caseine und freie Aminosäuren [Ardö und Meisel, 1991].
- Fraktionierung bei pH 4.6: Der Anteil der löslichen Stickstoffverbindungen ist auch hier abhängig von den verwendeten Bedingungen. Es handelt sich hier um eine heterogene Gruppe, welche aus Molkenproteinen, die Proteose-Pepton-Fraktion, niedermolekulare Caseinabbauprodukte besteht [O'Keefe et al., 1978; Christensen et al., 1989b].

- Fraktionierung mit Trichloressigsäure (TCA): Je nach Konzentration der TCA zur Fraktionierung der Stickstofffraktion, ändert sich die Zusammensetzung der löslichen Fraktion [Yvon et al., 1989]. Diese Methode wird auch öfters für die weitere Fraktionierung der wasserlöslichen Fraktion verwendet, da das Verhältnis von TCA-löslicher Stickstoff/Gesamtstickstoff als besserer Reifungsindikator dient als nur das Verhältnis WSN/Gesamtstickstoff [Haasnoot et al., 1989].
- Fraktionierung mit Ethanol: Diese sehr häufig eingesetzte Fraktion enthält niedermolekulare Peptide und Aminosäuren und kann mit TCA verglichen werden, nur ist es einfacher mit verdampfbaren Ethanol zu arbeiten [Rohm et al., 1996].
- Fraktionierung mit Phosphorwolframsäure (PTA): Mit dieser selektiven Methode bleiben nur mehr Peptide mit einem Molekulargewicht von <600 Dalton löslich [Jarret et al., 1982]. Für eine Subfraktionierung des wasserlöslichen Extraktes von Käse bildet sie eine gute Methode.

Methoden zur direkten Messung der Proteolyse

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ist eine Standardmethode zur Quantifizierung von Stickstoff. Diese Methode zählt aber zu den zeitaufwendigeren Methoden. Um sich diese Zeit zu sparen, wurde versucht schneller Analysenmethoden zu etablieren [Ardö und Meisel, 1991].

- Bestimmung von Tryptophan und Tyrosin
- Farbstoffbindungsmethoden
- Bestimmung der freien Aminogruppen mittels z. B. Ninhydrin, Absorption, Fluorescamin usw.

Zu den spezifischen Methoden zählt die Messung individueller Peptide durch elektrophoretische und chromatographische Methoden. Mit Hilfe dieser Methoden ist es möglich, spezielle Peptide, die während der Reifung entstanden sind, auch zu isolieren und danach zu identifizieren. Die Urea-PAGE ist ein wichtiges Mittel für die Überwachung der Proteolyse, da schon in frühen Stadien der Reifung Vergleiche der Caseine vorgenommen werden können. Ihre Trennung basiert auf dem Ladungs- und

Massenunterschied. Vor allem auch die Unterscheidung der einzelnen Milchen verschiedener Spezies sind somit möglich [Fox und McSweeney, 2004].

Die SDS-PAGE ist daher nicht so gut anwendbar, da bei ihr nur nach Massenunterschied getrennt wird, und die Caseine eine sehr ähnlich oder gar manchmal die gleiche Masse besitzen können.

Aber auch die Kapillarelektrophorese und eine Vielzahl an chromatographischen Techniken, wie RP-HPLC werden verwendet, um Milchproteine zu fraktionieren [Fox und McSweeney, 2004].

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

Die Käse wurden kommerziell und in handeltypischen Mengen à 200-250 g in diversen Supermärkten (Tab. 8) erworben.

Tabelle 8 analysierte Schimmelkäse

Nr.	Käsename	Käsetyp	F.i.T ¹	MHD ²
1	Saint Agur Bongrain	Blauschimmel	60%	01.03.2010
2	Edelpilzkäse Bergader	Blauschimmel	50%	02.03.2010
3	Camozola Champignon	Blauschimmel	70%	03.03.2010
4	Montagnolo Affine	Edelschimmel	72%	25.02.2010
5	Saint Agur	Blauschimmel	60%	25.02.2010
6	Dor Blu	Blauschimmel	50%	25.02.2010
7	Gorgonzola Dolce	Blauschimmel	48%	k.A. ³
8	Galbani Dolcelatte Classico	Blauschimmel	55%	k.A.
9	Castello Blue	Blauschimmel	k.A.	k.A.
10	Dor Blue	Blauschimmel	50%	k.A.
11	Österkron	Grünschimmel	55%	k.A.
12	Bavaria Blue	Weiß-/ Blauschimmel	k.A.	k.A.
13	St. Ruperti Weiß-Blau	Weiß-/ Blauschimmel	70%	23.03.2010
14	Blauer Pirol	Blauschimmel	55%	k.A.
15	St. Ruperti „New Lifestyle“	Weißschimmel	45%	28.02.2010
16	Weiß-Blauer Pirol mild	Weiß-/ Blauschimmel	65%	k.A.
17	Naturkost- Casole del Sole Gorgonzola	Blauschimmel	48%	k.A.
18	Naturkost- Roquefort-Roquebelle	Grünschimmel	52%	k.A.
19	SPAR Blue	Weiß-/ Blauschimmel	42%	09.04.2010
20	Gran Bavarese	Blauschimmel	50%	01.05.2010
21	IGOR Gorgonzola Piccante	Blauschimmel	k.A.	k.A.
22	IGOR Gorgonzola	Blauschimmel	k.A.	k.A.
23	Roquefort Papillion	Blauschimmel	k.A.	k.A.
24	Camembert	Weißschimmel	50%	17.05.2010
25	Président Camembert L'Original	Weißschimmel	45%	16.05.2010
26	Bergbauern Camembert	Weißschimmel	55%	21.05.2010
27	Révèrend le Camembert	Weißschimmel	45%	04.06.2010
28	Joghurt Camembert	Weißschimmel	25%	29.05.2010
29	Sirius Camembert	Weißschimmel	45%	22.05.2010

¹ Fett in Trockenmasse

² Mindesthaltbarkeitsdatum

³ k.A...keine Angabe

3.2. Aufarbeitung der Käseproben

3.2.1. Caseingewinnung für die elektrophoretischen Analysen

Chemikalien

Petrolether 40-60%; p.a, Roth

Geräte und Hilfsmittel

Reibe

Umlufttrockenschrank, Heraeus

fettfreie Watte, Rauscher

Soxhletapparatur 810, BÜCHI

Extraktionshülsen 603 10x50 mm, Schleicher & Schuell

Durchführung

Der Käse wird gefroren und anschließend wird die Rinde mit einem Messer entfernt. Danach wird er mit einer handelstypischen Reibe direkt in eine große Glaspetrischale gerieben. Die Proben werden dann über Nacht im Umlufttrockenschrank bei 40°C getrocknet. Nach diesem Schritt wird die getrocknete Probe locker in eine Extraktionshülse gefüllt und mit fettfreier Watte verschlossen. Die präparierten Hülsen werden nun für 3 Stunden in der Soxhletapparatur mit Petrolether entfettet. Nach dem Trocknen der Extraktionshülsen, erneut im Umlufttrockenschrank für mindestens eine Stunde, werden die Proben auf einem Stück Alufolie pulverisiert und in Eppendorfreaktionsgefäße abgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -18°C.

3.2.2. Wasserlöslicher Stickstoff (WSN) in Käse

Die Caseine werden durch Einstellung des pH-Werts auf 4.4 mit Hilfe einer Säure z.B. Salzsäure ausgefällt. Nur noch wasserlöslicher Stickstoff (Peptide und Aminosäuren) bleiben übrig.

Chemikalien

RO-Wasser

Salzsäure 1M

Geräte und Hilfsmittel

Filter 595 ½ , Ø 150 mm, Whatman

Filter 520 A ½ , Ø 125 mm, Schleicher & Schuell

Zentrifuge, Multifuge X3FR, Heraeus

Homogenisator, Ultra Turrax T25, Janke und Kunkel

Microprocessor pH-Meter, pH 211, Hanna Instruments

Heizbad, Ultra-Thermostat, Lauda

Durchführung

Käseproben gefroren---> Rinde entfernt ---> reiben

Je 20 g Käse werden in ein 500 mL Becherglas eingewogen und in 180 g auf 50°C temperiert, UHQ-Wasser suspendiert.

Anschließend werden die Proben mittels Ultraturrax 2 min. bei 10 000 rpm homogenisiert (1 Minute homogenisiert- 1 Minute Rast-1 Minute homogenisieren).

Die homogenisierten Proben werden in eine 500 mL Schraubflasche überführt und der pH-Wert mit 1 M HCL auf pH 4.4 eingestellt. Anschließend werden die Proben im Schüttelbad bei 50°C für eine Stunde temperiert.

Anschließend werden die Proben in Kunststoffzentrifugenbecher überführt und für 30 min., 4°C und 4000 rpm zentrifugiert.

Die Filtrate werden für ESN benötigt, der Rest wird für die weiteren Untersuchungen portioniert, beschriftet und bei -18°C aufbewahrt (4 Eppendorfreaktionsgefäßen je 0.5 ml, 2 Polystyrolröhrchen je 3 ml)

3.3. Elektrophoretische Analyse**Elektrophoretische Methoden***Grundprinzip*

Das Prinzip einer Elektrophorese ist, dass Moleküle mit einer Nettoladung unter Einwirkung eines elektrischen Feldes wandern.

Wobei die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls v in diesem Feld von der elektrischen Feldstärke (E), der Nettoladung des Moleküls (z) und dem Reibungskoeffizienten (f) abhängt.

$$v = \frac{E \cdot z}{f}$$

Der Reibungskraft ($f \cdot v$) wirkt der elektrische Kraft ($E \cdot z$), die das geladene Teilchen zur entgegengesetzt geladenen Elektrode treibt, entgegen. Abhängig ist diese Reibungskraft von der Masse des Moleküls und von der Viskosität des Mediums [Stryer, 1991].

Zusätzlich beeinflussende Faktoren sind noch die Temperatur, Art, Konzentration und pH-Werte der verwendeten Puffersysteme und die elektrophoretische Mobilität der zu trennenden Komponenten. Ein charakteristischer Parameter eines geladenen Moleküls ist diese elektrophoretische Mobilität [Westermeier, 1997].

Einteilung der elektrophoretischen Methoden

Es gibt folgende Arten:

- *Isoelektrische Fokussierung*: Amphotere Substanzen wie z.B. Proteine wandern zwischen Anode und Kathode in einem Medium mit stabilen pH-Gradienten, bis sie jene Stelle im Gradienten finden, wo ihre Nettoladung Null ist [Westermeier, 1997].
- *Isotachphorese*: Die Durchführung erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Zwischen einem „leading“-Elektrolyt (L^-) mit hoher Mobilität und einem „terminating“-Ion (T^-) mit niedriger Mobilität wandert ein elektrisch geladenes Teilchen. Die Geschwindigkeit ist jedoch bei allen gleich. Zonen ohne Zwischenbereiche werden durch die Wanderung der zu trennenden Komponenten gebildet [Westermeier, 1997].
- *Zonenelektrophorese*: Während der gesamten Trennzeit, sowie Trennbereich, wird ein homogenes Puffersystem verwendet. Zu ihr zählen Papier- und Plattenelektrophorese, trägerfreie Elektrophorese und die Gelelektrophorese, die sich weiter in Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE), Stärkegel-Elektrophorese und Agarosegel-Elektrophorese unterteilt. Diese drei Arten von Elektrophorese teilt man wieder in diskontinuierliche Elektrophorese, SDS-PAGE und Native DISK-PAGE, sowie in Gradienten Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein [Westermeier, 1997].

Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen

Diese Proteintrennung wird mit Gelen durchgeführt, wodurch Konvektionsströme verhindert werden und die Molekularsiebwirkung der Gele verbessert die Auflösung [Stryer, 1991].

Die Polyacrylamidgele sind chemisch, sowie mechanisch stabil und von der optischen Erscheinung klare und durchsichtige Gele mit einer sehr geringen Elektroosmose.

Durch die Polymerisation von Acrylamid sind sie leicht herstellbar. Durch die Totalacrylamidkonzentration (T) und dem Quervernetzungsgrad (C) kann die Porengröße exakt und reproduzierbar eingestellt werden. N,N'-Methylenbisacrylamid dient als quervernetzendes Reagens [Westermeier, 1997].

Die Gelporengröße wird durch folgende Punkte bestimmt [Westermeier, 1997]:

- Acrylamidmenge pro Volumseinheit
- Methylenbisacrylamidmenge

$$T = \frac{(a + b) * 100}{V} [\%]$$

$$C = \frac{b * 100}{a + b} [\%]$$

C...Quervernetzungsgrad

T... Totalacrylamidkonzentration

V... Volumen in ml

a... Acrylmenge in g

b... N, N' - Methylenbisacrylamidmenge in g

Eine kleinere Porengröße wird durch einen konstant gehaltenen Quervernetzungsgrad und einer erhöhten Totalacrylamidkonzentration erzielt. Wenn nun aber die Totalacrylamidkonzentration konstant gehalten wird und der Quervernetzungsgrad steigt, dann folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion [Westermeier, 1997].

3.3.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen können mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) vorgenommen werden. Es kommt durch die Kombination der anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) mit Reduktionsmitteln, meist Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) zu einer Denaturierung der Proteine. Somit werden alle nicht kovalenten Bindungen und auch Disulfidbrücken gespalten, die Polypeptidketten gestreckt und Konformationsunterschiede eliminiert. Ein SDS-Anion bindet etwa an jeden zweiten Aminosäurerest, überlagert somit die Proteineigenladung und führt zu einer starken negativen Nettoladung, die annähernd proportional zur Molekülmasse ist. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in Abhängigkeit von der Kettenlänge, die mit

der Molekülmasse, der Nettoladung und der Gelporosität korreliert. Proteine mit 2% Molekülmassenunterschied, entspricht etwa zehn Aminosäureresten, können noch aufgetrennt werden. Durch die lineare Proportionalität zwischen elektrophoretischer Mobilität und dem Logarithmus des Molekulargewichts lässt sich dieses über Standardgeraden errechnen. Visualisierung der Proteinbanden kann mittels verschiedener Färbetechniken (Silberfärbung, Coomassie Blau) oder durch radioaktive Markierung erfolgen [Berg et al., 2006; Lodish et al., 2003; Westermeier, 1997].

Chemikalien

UHQ-Wasser

RO-Wasser

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), $\geq 99.3\%$, Roth[®]

Natriumlaurylsulfat (SDS), $\geq 99\%$, Roth[®]

Salzsäure, 32% (v/v), reinst, Roth[®]

Acrylamid-Bis Lösung (37.5:1), 40% (w/v), Serva

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), $\geq 99\%$, Fluka

Ammoniumperoxodisulfat (PER), $\geq 98\%$, Ultra, Fluka

n-Butylalkohol, p.A., Merck

Glycin, $\geq 99\%$, p.A., Roth[®]

Essigsäure, 100%, p.A., Rotipuran[®], Roth[®]

Coomassie Färbetabletten, PhastGel[™] Blue R-350, GE Healthcare

Dithiotreitol (DTT), min. 99.5%, AppliChem

Glycerin, 87%, AppliChem

Bromphenolblau (pH 3.0-4.6), Merck

Ethanol, absolut, $\geq 99.9\%$, p.A., Merck

Proteinmarker-Stammlösung, Perfect Protein[™] Marker 10-225 kDa, Novagen

Acrylamid/Bis-Stammlösung (T=40%, C=2.67%) fertig von Fa. AppliChem

Geräte und weitere Hilfsmittel

Analysenwaage, AE 163, Mettler Toledo

Heizblock, TECHNE DRI-BLOCK DB-2D

Vortex, MS1 Minishaker, IKA[®]

Steuereinheit Microcomputer- Elektrophoresis Power Supply, Type E455, Consort

Spacer, Spacer-Mate, Amersham Biosciences

Zentrifuge, SIGMA 113, Sigma

Ultraschallbad, Branson 32, Branson[®]

Elektrophorese Apparatur für vertikale 18x17 cm Gele, SE 600 Series, HSI

Inkubationsschrank, 50°C, Heraeus Incubator, Thermo scientific

Magnetrührer, IKAMAG RCT, IKA[®]

Blockthermostat, Digital Heatblock III, VWR[™]

Laborzentrifuge, Centrifuge 542, Eppendorf

Microprocessor pH-Meter, pH 211, Hanna Instruments

Wipptisch, Biometra[®]

Scanner, JX-330-3FG, Sharp

Heizbad, Ultra-Thermostat, Lauda

Lösungen:

- *SDS-Lösung 10%*

5 g SDS in ein 50 mL Becherglas einwiegen und in ~40 mL UHQ-Wasser unter langsamen Rühren lösen, quantitativ in einen 50 mL Meßkolben überführen und bis zur Marke mit UHQ- Wasser auffüllen.

- *50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.2*

0.3028 g Tris in ein 50 ml Becherglas einwiegen und in ~45 mL UHQ-Wasser lösen, mit 10% Salzsäure (ca. 750 µL) den pH-Wert auf pH 7.2 einstellen, quantitativ in einen 50 mL Meßkolben überführen und bis zur Marke auffüllen.

- *2.6 M Dithiothreitol-Lösung (DTT)*

250 mg DTT einwiegen und in 500 µL UHQ-Wasser lösen.

- *Probenpuffer 1*

600 µL Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7.2,
400 µL SDS 10 %,
10 µL DTT 2.6 M vereinen.

- *6 M Salzsäure*

68 mL 32% HCl mit Wasser auf 100 mL auffüllen.

- *Trenngelpuffer-Stammlösung (1.5 M Tris, 0.4% SDS) pH 8.8*
4fach Konzentrat
18.15 g Tris und 400 mg SDS in ein 120 mL Becherglas einwiegen, in ~70 mL UHQ-Wasser lösen, mit 6 M Salzsäure (ca. 16 mL) auffüllen, den pH-Wert auf pH 8.8 einstellen, quantitativ in einen 100 mL Meßkolben überführen und mit UHQ-Wasser bis zur Marke auffüllen.
- *Sammelgelpuffer-Stammlösung (0.5 Mol Tris, 0.4% SDS) pH 6.8*
4fach Konzentrat
3.028 g Tris und 200 mg SDS in 50 ml Becherglas einwiegen, in ~40 mL UHQ-Wasser lösen und mit 6 M Salzsäure (ca. 11 mL) den pH-Wert auf pH 6.8 einstellen, quantitativ in einen Meßkolben (50 mL) überführen und mit UHQ-Wasser bis zur Marke auffüllen.
- *Trenngel-Überschichtungspuffer*
Trenngelpuffer-Stammlösung 1:4 verdünnen
7.5 mL Puffer mit 22.5 mL UHQ-Wasser mischen.
- *Butanol mit Wasser gesättigt*
50 mL n-Butanol mit 5 mL UHQ-Wasser mischen.
- *Ammoniumpersulfat 10%*
100 mg PER in 1000 µL UHQ-Wasser lösen.
- *Elektrodenpuffer, 250 mM Tris, 1% SDS, 1.92 M Glycin, pH ~8.3*
30.28 g Tris und 144 g Glycin in 2-3 L RO-Wasser lösen und in einem Kanister auf ca. 8 L auffüllen. 10 g SDS in ein Becherglas einwiegen, in RO-Wasser lösen und vorsichtig zur Lösung im Kanister füllen und quantitativ auf 10 L auffüllen.
- *Färbelösung (für 2 Gele)*
200 mL Essigsäure 100% und
1800 mL RO-Wasser auf 50°C erwärmen,

1 Farbstofftablette (PhastGel™ Blue R-350, GE Healthcare) dazugeben und bis zum Lösen rühren.

- *Entfärbelösung, 10% Essigsäure*

200 mL 100% Essigsäure und
1800 mL RO-Wasser mischen.

- *Marker* (Novagen Perfekt Protein Marker) Mischung aus 6 µL Marker und 14 µL Markerpuffer.

- *Regenerieren der Entfärbelösung*

Gebrauchte Entfärbelösung in einer Flasche mit Aktivkohle über Nacht entfärben und durch ein 595 ½ Faltenfilter in eine saubere Flasche filtrieren.

Aufbereitung der Käseproben für SDS-PAGE

- 2.5 mg getrockneter, entfetteter Käse in Eppendorfergefäß einwiegen
- 500 µl Probenpuffer zugeben und vortexen
- Dazupipettieren von Puffer 1 (SDS/Tris-HCl) + 10 µl DDT-Lsg. 2.6 M (= > 1Vol%)
- Vortexen der Proben
- Durchstechen des Deckels mittels einer Nadel
- Im Heizblock bei 100°C für 10 min. kochen
- Abkühlen lassen
- Zugabe von 10 µl DDT-Lsg. 2.6 M
- Vortexen der Proben
- Zentrifugieren bei 13 500 rpm für 5 Minuten und anschließend bereit für die Auftragung aufs Gel (10µL)
- Aliquotieren und einfrieren bei -18°C

Probenaufbereitung bei Wiederverwendung:

- Auftauen der Proben
- Vortexen der Proben
- Durchstechen des Deckels mittels einer Nadel

- Kochen bei 100°C für 3 Minuten
- Abzentrifugieren der Proben
- Abkühlen lassen
- 1 Vol% DTT-Lsg. 2.6 M zugeben
- Vortexen
- Zentrifugieren bei 13500 rpm für 5 Minuten

SDS-Gelbereitung

Zur Erzielung einer besseren elektrophoretischen Effizienz wird hier das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE mit Trenn- und Sammelgel, die sich hinsichtlich pH-Wert, Ionenkonzentration und Vernetzungsgrad unterscheiden, angewandt.

Zusammensetzung der Gellösungen für SDS-PAGE

15%iges Trenngel für Caseine (für 1 Gel):

Alle Reagenzien werden in ein 25 mL Becherglas pipettiert

- 11.25 mL UHQ-Wasser
- 7.50 mL Trenngelpufferstammlösung
- 11.25 mL Acrylamid 40% AA
- entgasen des Becherglases im Ultraschallbad für 5 Minuten
- 15 µL TEMED
- 150 µL PER (10%)

Die verwendete Gelapparatur macht es möglich, 2 Gele gleichzeitig laufen lassen zu können. Der Gelgießstand wird laut Herstellerangaben zusammgebaut. Die Gellösungen werden, nach oben stehender Zusammensetzung, zubereitet, bei der Zugabe von TEMED und PER-Lösung muss schnell agiert werden, wobei beide Flüssigkeiten sorgfältig homogen eingemischt werden müssen. Beim Gießen des Trenngels sollen mindestens 3.5 cm für das Sammelgel freilassen werden.

Um eine gerade Gelkante zu bekommen, wird eine Butanolschicht (1 mL), etwa 3 mm hoch, auf das Trenngel gegossen. Nach 30 min. sollte das Trenngel fest geworden sein, weshalb das Butanol abgegossen und mit UHQ-Wasser gespült wird. Nach dem Spülen wird mit Hilfe eines Filterpapiers getrocknet und mit Trenngelüberschichtungspuffer (2

mL) überschichtet. Nun muss das Gel für mindestens 3 Stunden polymerisieren, bevor das Sammelgel vorbereitet und aufgegossen wird.

Sammelgel (für 1 Gel):

- 3.25 mL UHQ-Wasser
- 1.25 mL Sammelgelpuffer- Stammlösung
- 0.50 mL Acrylamid 40% AA
- entgasen im Ultraschallbad für 5 Minuten
- 2.50 µL TEMED
- 25 µL PER 10%

Die bereitete Sammelgellösung wird per Trichter auf das feste, polymerisierte Trenngel gegossen und danach werden die Probenkämme eingesteckt bis die Unterkante der Probenaschen etwa 1.5 cm vom Trenngel entfernt sind. Nach 30 min. Polymerisieren, werden die Kämme vorsichtig unter spülen Spritzen befüllt mit Elektrodenpuffer herausgelöst. Die Probenaschen nochmals sorgfältig mit Elektrodenpuffer spülen, um möglichen Schlierenbildung entgegenzuwirken. Anschließend kann man mit der Probenauftragung nach folgendem Schema beginnen:

Probenauftragung für SDS-PAGE

- 10 µL Probe
- 18 µL Marker (Novagen Perfekt Protein Marker)
- 28 µL Labmolke und Labcaseingemisch

Elektrophoretische Auftrennung:

Die Auftrennung wird bei 15°C vorgenommen. Die Kühlung wird durch eine Wasserkühlung vollzogen.

Folgende Einstellungen werden für ein Gel verwendet:

- Sammelgel: 200 V 30 mA 0.9 Stunden
- Trenngel: 400 V 60 mA 2.5 – 3.5 Stunden

Das Ende der elektrophoretischen Auftrennung ist erreicht, wenn die Lauffront ca. 1-0.5 cm vom unteren Ende der Glasplatte entfernt ist. Nachdem man die Geräte abgeschaltet hat, werden die Glasplatten herausgenommen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und in die vorbereitete Färbelösung mit einem Netz gelegt. Das Gel

samt Lösung wird dann über Nacht bei 50°C im Brutschrank gefärbt und am nächsten Morgen mit einer Entfärbelösung, 10%ige Essigsäure, auf einem Schwenker entfärbt, wobei die Lösung einmal pro Stunde gewechselt wird und es 2-3 Wiederholungen gibt. Nach diesem Schritt folgt das Scannen am Computer mit spezieller Software und Scanner. Die Einstellungen erfolgen sehr individuell, da jedes Gel verschieden hell bzw. dunkel ist, aber jedenfalls werden vor allem die Helligkeit und manchmal auch der Kontrast neu eingestellt.

3.4. Urea- PAGE

Harnstoff in Kombination mit einem Reduktionmittel z.B. Mercaptoethanol, sind nötig für eine gute Caseintrennung. Urea macht die Aufspaltung von intermolekularen Aggregaten möglich. Das Reduktionsmittel spaltet intermolekulare Disulfidbrücken von alpha-_{s2}- und kappa-Casein auf [Dumas et al., 1989]

Die Urea-PAGE bedient sich zur Trennung der einzelnen Caseine nicht nur der Molekularmasse, sondern auch der Ladung. Proteine und größere Polypeptide in Käse sind komplett in 4-6 mol/L Urea löslich, somit Proben für die Analysen durch Chromatography oder Elektrophorese prepariert werden [McSweeney et al., 1997].

Sie ist eine wichtige Methode bei der Charakterisierung der Proteolyse während der Käsereifung. Allerdings ist diese Möglichkeit limitiert durch die Sichtbarmachung von größeren Peptiden [Mayer et al. 1992].

Chemikalien

2-Mercaptoethanol, p.A., Merck

Harnstoff Ultra, p.A., 99.5%, Roth[®]

Zitronensäure wasserfrei, p.A., 99.5% , Roth[®]

UHQ-Wasser

RO-Wasser

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), ≥ 99.3%, Roth[®]

Salzsäure, 32% (v/v), reinst, Roth[®]

Acrylamid-Bis Lösung (37.5:1), 40% (w/v), Serva

Acrylamid-Bis Lösung (29:1), 40% (w/v), Serva

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), ≥ 99%, Fluka

Ammoniumperoxodisulfat (PER), ≥ 98%, Ultra, Fluka

Glycin, ≥ 99%, p.A., Roth[®]

Essigsäure, 100%, p.A. Rotipuran[®], Roth[®]

Glycerin, 87%, AppliChem

Methanol, techn., VWR[™]

Geräte und weitere Hilfsmittel

Analysenwaage Mettler Toledo, AE 163

Vortex, MS1 Minishaker IKA[®]

Steuereinheit Microcomputer- Elektrophoresis Power Supply der Type E455, Consort

Zentrifuge J2-21, Rotor JA 14, Beckmann

Ultraschallbad, Branson 32, Branson[®]

Elektrophorese Apparatur für vertikale 18x17 cm Gele, SE 600 Series, HSI

Magnetrührer, IKAMAG RCT, IKA[®]

Laborzentrifuge, Centrifuge 542, Eppendorf

Microprocessor pH Meter, pH 211, Hanna Instruments

Wipptisch, Biometra[®]

Scanner, JX-330-3FG, Sharp

Spacer, Spacer-Mate, Amersham Biosciences

Lösungen:

- *Überschichtungspuffer-Stammlösung (0.16 M Zitrsre./1.5 M Tris)*
4fach Konzentrat (=Trenngelpuffer-Stammlösung für Native PAGE)
18.4 g Tris
3.677 g Zitronensäure, wasserfrei = 16 mL Zitronensäure 1 M
auf 100 mL mit RO-Wasser auffüllen.
- *Trenngel-Überschichtungspuffer*
Trenngelpuffer-Stammlösung 1:4 verdünnen
7.5 mL Puffer mit 22.5 mL RO-Wasser mischen.
- *PAGE-Probenpuffer (6.25 M Harnstoff)*
3.754 g Harnstoff
0.12 g TRIS
0.5768 g Glycin vermischen.

- *Entfärbelösung*
3000 mL Methanol techn.
7000 mL RO-Wasser
700 mL 100% Essigsäure vermischen.
- *Färbelösung*
4.5 g Coomassie Blue G-250
1200 mL Methanol techn. 1800 mL RO-Wasser, 45 min rühren und 300 mL Essigsäure 100% dazu mischen.
- *Anoden- und Kathodenpuffer (pH 8.3)*
57.68 g Glycin und 12 g Tris mit RO-Wasser auf 10 L auffüllen.
- *PER-Lösung 1.4% (w/v)*
1.4 g Ammoniumpersulfat ad 100 mL mit UHQ-Wasser auffüllen (im Kühlschrank aufbewahren).

Aufbereitung der Proben

Die Aufarbeitung wird gleich gemacht, wie bei der SDS-PAGE.

Einwaage

5 mg Casein, getrocknet und entfettet mit 500 µL PAGE-Probeklösung unter Zugabe von 2 Tropfen 2-Mercaptoethanol lösen.

Herstellung der 11%igen Trenngellösung:

Alle Reagenzien werden auf einer Waage in einem 25 mL Becherglas eingewogen

- 1.47 g Tris
- + 9.61 g Harnstoff
- + 8.8 mL Acrylamid 40% AA
- + 1.28 mL Zitronensäure
- bis 35.31 g mit RO-Wasser auffüllen und lösen
- entgasen im Ultraschallbad für 5 min.
- 150 µL TEMED

- 175 μ L PER 1.4%

Sammelgel

Alle Reagenzien werden in ein 25 mL Becherglas mit Magnetrührer pipettiert.

- 3 g Harnstoff
- + 3 mL RO-Wasser
- + 1 mL Acrylamid 3.3%C
- + 1 mL Tris (150 mg/mL RO-Wasser)
- + 250 μ L Zitronensäure
- pH-Wert auf 7.2 mit 1 M bzw. 0.5 M Zitronensäure einstellen
- auf 10 mL mit destilliertem Wasser auffüllen
- 70 μ L TEMED
- 250 μ L PER 1.4%

TEMED und PER müssen schnell und durch rühren miteinander gemischt werden.

Die verwendete Gelapparatur macht es möglich, 2 Gele gleichzeitig laufen zu lassen. Der Gießstand wird laut Herstellerangaben zusammengebaut.

Danach muss das Sammelgel per Trichter in die vorgefertigte und markierte Apparatur gegossen werden, wobei mindestens 3.5 cm für das Sammelgel freigelassen werden sollten. Danach wird mit 1 mL Trenngel-Überschichtungspufferschicht überschichtet und das Gel wird für 30-40 Minuten polymerisiert. Wenn das Gel fest geworden ist, dann wird der Puffer abgegossen, mit Filterpapier nachgetrocknet und anschließend das Sammelgel aufgegossen.

Das fertige Sammelgel wird per Trichter auf das feste, polymerisierte Trenngel gegossen und danach werden die Probenkämme eingesteckt. Nach dem Herauslösen der Kämme unter permanenten spülen mit Elektrodenpuffer, kann man mit der Probenauftragung begonnen werden. Nach diesen Schritt nochmals sorgfältig mit ebenfalls Elektrodenpuffer spülen, um möglicher Schlierenbildung entgegenzuwirken. Nun kann mit der Probenauftragung nach folgendem Schema begonnen werden:

Probenauftragung für Urea-PAGE

- 10 μ L Probe
- 28 μ L Labmolke- und Labcaseingemisch

Elektrophoretische Auftrennung:

Die Auftrennung wird bei 15°C vorgenommen. Die Kühlung wird durch eine Wasserkühlung vollzogen.

- Sammelgel: 200 V 30 mA 0.9 Stunden
- Trenngel: 400 V 60 mA 2.5 – 3.5 Stunden

Nach der Laufzeit werden die Gele in eine Färbelösung entweder über Nacht, oder, wenn die Färbelösung frisch ist für eine Stunde gegeben. Am nächsten Tag wird 3–5 mal entfärbt bis der Hintergrund ausreichend hell ist. Nach diesem Schritt wird das Gel mittels Gelscannsoftware gescannt. Die Einstellungen erfolgen sehr individuell, da jedes Gel verschieden hell bzw. dunkel ist, aber jedenfalls werden vor allem die Helligkeit und manchmal auch der Kontrast neu eingestellt.

3.5. Bestimmung des Stickstoffgehalts**Prinzip**

Das organische Material der Probe wird durch Schwefelsäure zu Kohlendioxid oxidiert, wobei diese selbst zu Schwefeldioxid reduziert wird. Der Stickstoff liegt nach dem Aufschluss als Ammoniumsulfat gelöst in der Schwefelsäure vor. Durch Zugabe von Natriumhydroxid wird die Schwefelsäure neutralisiert und Ammoniak quantitativ ausgetrieben, welcher anschließend durch eine Wasserdampfdestillation in die Borsäure eingeleitet wird. Das Borat wird anschließend mit Salzsäure titriert. Anhand der verbrauchten Menge an Salzsäuremaßlösung bei der Titration kann der Stickstoffgehalt und in weitere Folge auch der Proteingehalt der Probe berechnet werden [Matissek und Steiner, 2006].

Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Um den Proteingehalt einer Käseprobe korrekt angeben zu können, ist es notwendig den Gesamtproteingehalt mittels der *Kjeldahl*-Methode zu bestimmen, da das Protein je 100 g Protein angegeben wird.

Neben den Proteinen und freien Aminosäuren werden bei diesem Aufschluss auch Nukleinsäuren, Ammoniumsalze und organisch gebundener Stickstoff frei gesetzt. Da dieser in Lebensmitteln in vernachlässigbaren Mengen enthalten ist, erfolgt die Angabe des organisch gebundenen Stickstoffs als „Gesamtstickstoff, berechnet als Protein“ oder als Gesamtprotein [Matissek und Steiner, 2006].

Die Berechnung des Gesamtprotein- oder Rohproteingehalts erfolgt nach der folgenden Formel unter Berücksichtigung des Faktors 6.38 für Milch und Milchprodukte [Matissek und Steiner, 2006].

$$P = (a - b) \cdot 1.4008 \cdot 6.38 / E$$

Erläuterungen zur Berechnung des Gesamtproteingehalts [Matissek und Steiner, 2006]

- a* Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0.1 mol/L) im Hauptversuch in mL
- b* Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0.1 mol/L) im Blindversuch in mL
- F* Umrechnungsfaktor zu Errechnung des Proteingehalts [* 6.38]
- E* Käseeinwaage in g

1.4008 1 mL Salzsäure-Maßlösung (0.1 mol/L) entspricht 1.4008 mg Stickstoff

Chemikalien

RO-Wasser

Borsäure $\geq 99.8\%$, p.A., Roth[®]

Salzsäure Maßlösung, 4 M, Roth[®]

Natriumhydroxid $\geq 99\%$, Roth[®]

Kaliumsulfat krist. $\geq 99\%$, Roth[®]

Kupfer-(II)-sulfat, wasserfrei, p.A., Roth[®]

Mischindikator 5 für Ammoniaktitration, Roth[®]

Schwefelsäure 98% für N-Bestimmung, p.A., Roth[®]

Geräte und weitere Hilfsmittel von BÜCHI und VELP

Aufschlussapparatur Digestor 430 BÜCHI

Destillationseinheit Destillation Unit 315 BÜCHI

Aufschlussapparatur, Heating Digestor DK 30S, Scientifica VELP

Destillationseinheit, UDK 142 Automatic Distillation Unit, Scientifica VELP

Titriergerät, Titroline, Scientifica VELP

SMS-Scrubber, Scientifica VELP

Water-pump, Scientifica VELP

Analysenwaage, Electronic Balance FX-300

Glaskugeln Kalk-Natron-Glas, 10 mm, Roth[®]

Rundkolben 250 mL PYREX

Käsereibe

Weithals-Erlenmeyerkolben

Abzugrohr

Wasserstrahlpumpe

Aufschlusskolben

Tiegelzange

Bechergläser à 1 L

Magnetrührer

Spartel

Messkolben à 1 L

Lösungen:

- 35% ige Natronlauge
1000 mL destilliertes Wasser in einem Gefäß vorlegen und 700 g Natronlauge hinzugeben, vorsichtig umrühren und mit destilliertem Wasser auf 2000 mL auffüllen.
- 2% ige Borsäure
20 g Borsäure in einem 1000 mL Messkolben einwiegen und diesen zu 2/3 mit destilliertem Wasser auffüllen, einen Magnetrührer hinzugeben und mischen bis sich die Borsäure vollständig aufgelöst hat. Nach dem Entfernen des Magnetrührers, den Messkolben mit destilliertem Wasser bis zur Markierung füllen.
- 0.1 M HCl
In einem 1000 mL Messkolben etwa 500 mL destilliertes Wasser vorlegen, 25 mL Salzsäure (4 M/L) hinzufügen, den Kolben mit destilliertem Wasser auffüllen und mischen.
- Katalysatorgemisch:
1000 g Kaliumsulfat mit 4 g Kupfersulfat gut vermischen.

Zusätzlich zu den anderen Lösungen bei VELP-Apparatur:

- 10%ige Natronlauge oder 20%ige Natriumcarbonatlösung + Bromthymolblau ca. 30 mg/L
- 0.01 M Salzsäure -> 1:10 Vol von 0.1 M HCl für die WLN-Proben

Aufbereitung der Proben für Gesamtstickstoffbestimmung im Käse

Von allen eingefrorenen Käsen wird die Käserinde entfernt, um anschließend den ganzen Käse per Käseschreibe zu reiben. Somit wird eine homogene Käsemasse geschaffen mit der, der Versuch starten kann. Außerdem ist die Käserinde in Bezug auf die proteolytische Aktivität nicht relevant. Da nur ein gewisser Teil entnommen wird, wird der andere Teil aliquotiert und derweil bei -18 Grad gelagert. Außerdem wird mit einem dreifachen Ansatz gearbeitet.

Stickstoffbestimmung im Käse mit BÜCHI-Kjeldahl-Apparatur

Aufschluss des organisch gebunden Stickstoff

- => 1000 g K_2SO_4 und 4 g $CuSO_4$ homogen (Katalysatorgemisch) vermischen
- => In die Ausflußröhrchen ca. 7.5 g des Katalysatorgemisches, was einem Löffelspitze entspricht, und 2 Glaskugeln zugeben
- => Danach ca. 200 mg geriebenen Käse einwiegen, die Einwaage auf 0.1 mg genau notieren, wobei immer eine Dreifachbestimmung durchgeführt wird
- => Danach die Kolben mit 20 mL Schwefelsäure (98%) versetzen
- => Auf die Kolben wird ein Absaugrohr befestigt und die Lufteinströmöffnung wird mit etwas Watte locker verschlossen
- => Die Kolben in die Aufschlussapparatur einsetzen und die Wasserstrahlpumpe einschalten
- => Die Proben werden dann erhitzt, indem die Heizstufe von 2 auf 6 hinaufschaltet wird bis die Proben klar werden
- => Nach dem Klarwerden die Proben 90 min. bei Heizleistung 7 weiter erhitzen
- => Nach dem Aufschluss die Proben für 20 min. abkühlen lassen und mit 50 mL RO-Wasser versetzen

Wasserdampfdestillation

- => Hauptschalter am Gerät einschalten, Wasserhahn öffnen und den Hahn für den Dampfgenerator waagrecht stellen

-
- => Rundkolben mit 20 mL Borsäure (2%) füllen und 3 Tropfen Mischindikator zugeben
 - => Rundkolben unter das Destillationsablaufrohr stellen bis das Rohr in der Flüssigkeit untergetaucht ist
 - => Aufschlussröhrchen in die Destillationsapparatur einsetzen
 - => Den obersten Hahn für Zugabe von Natronlauge öffnen und bis max. 200 mL offen halten-> Probe schlägt von braun auf blau um
 - => Die beiden darunter liegendenen Hähne um 90° drehen und die Probe destillieren, wobei in der Vorlage ein Farbumschlag von pink auf grün erfolgt.
 - => Wenn ca. 100 mL überdestilliert sind, wird der Rundkolben entfernt und das Ablaufrohr kurz mit RO-Wasser gespült. Weiters wird der mittlere Hahn um 90° gedreht und somit die Dampfdestillation gestoppt.
 - => Den unteren Hahn um 90° drehen, das Aufschlussröhrchen aus der Apparatur entnehmen und für 20 min. abkühlen lassen.

Titration

- => Das Destillat wird mit 0.1 N HCl von grün auf schwach rosa titriert.

Stickstoffbestimmung in WSN mit VELP-Kjeldahl-Apparatur

Aufbereitung der Probe: WSN wird direkt eingewogen.

Aufschluss

- 2 Liter 10%ige Natronlauge oder 20%ige Natriumcarbonatlösung mit Bromthymolblau als Indikator herstellen (blaue Lösung = okay; orange Lösung = wechseln) = Neutralisationslösung
- Neutralisationslösung in das größere Gefäß des Scrubbers füllen und am hinteren Gewinde ins Gerät schrauben
- Das kleinere Gefäß am vorderen Gewinde des Scrubbers bleibt leer.
- Proben in die Aufschlusskolben einwiegen und mit 7.5 g Katalysatormischung und Siedekugeln versetzen, WSN-Einwaage von ca. 900 mg
- Proben mit jeweils 20 mL konz. Schwefelsäure versetzen
- Aufschlusskolben in die Halterung geben und in Aufschlussapparatur stellen, Abdeckung aufsetzen
- Wasserfüllstand in der Pumpe kontrollieren, Pumpe einschalten
- linken Wasserhahn aufdrehen (für Kühler am Scrubber)

- Aufschlussapparatur einschalten, durch Drücken von „Down“ und „Enter“ gelangt man zum Programmmenü
- Programm durch Drücken der Tasten „Up“ oder „Down“ auswählen, „Enter“ drücken
- für WSN Programm 3 durch drücken von „Enter“ auswählen
 - => Temperatur 1: 150°C für 15 min
 - => Temperatur 2: 250°C für 15 min
 - => Temperatur 3: 380°C für 60 min
 - => Temperatur 4: 420°C für 90 min
- für andere Parameter ein leeres Programm auswählen und die Parameter wie gewünscht einstellen
- nachdem das Programm ausgewählt wurde „Enter“ drücken und das Programm startet
- wenn der Aufschluss beendet ist, die Halterung mit den Kolben nach hinten in die vorgesehene Ablage stellen.
- wenn die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, die Abdeckung entfernen (kann auf der linken Seite der Aufschlussapparatur abgelegt werden), die Halterung mit den Kolben kann jetzt außerhalb des Abzugs abgestellt werden

Destillation

- Titrator einschalten
- pH-Elektrode durch drücken von „Cal“ kalibrieren
- Füllstände der Vorratsgefäße kontrollieren (Borsäure, Natronlauge, destilliertes Wasser, HCl-Maßlösung)
- Gefäß zum Auffangen von Destillat, Wasserresten aus dem Dampfgenerator, etc. bereitstellen und den betreffenden Schlauch daran befestigen, Achtung: nach der Destillation tritt immer etwas heißer Wasserdampf aus dem Schlauch aus
- Wasserhahn ganz aufdrehen
- Aufschlusskolben mit ca. 50 mL RO-Wasser einsetzen
- Vorlagegefäß anbringen
- Gerät einschalten, nach ca. 5 Minuten ist das Gerät einsatzbereit
- einmal Programm 2 ohne Probe laufen lassen, „Down“ und „Enter“ drücken, um zum Programmmenü zu gelangen, solange „Down“ bzw. „Up“ drücken, bis

Programm 2 angezeigt wird, „Enter“ so oft drücken, bis am Display „Start P02“ erscheint

- Programm 2 durch drücken von „Enter“ starten
- Wenn am Display „Titration“ angezeigt wird, zweimal hintereinander die „Start/Stop“-Taste am Titrator drücken, wenn am Titrator „Titration beendet“ angezeigt wird, nochmals die „Start/Stop“-Taste drücken
- nach Beendigung des Programms können die Proben destilliert werden
- für die Proben ebenfalls Programm 2 auswählen
- falls andere Parameter benötigt werden, ein leeres Programm auswählen und die Parameter wie gewünscht einstellen: „Enter“ drücken, Wert blinkt, „Up“ bzw. „Down“ bis zum gewünschten Wert drücken, mit „Enter“ bestätigen
- Aufschlusskolben in die Apparatur einsetzen, Programm starten
- Wenn am Display „Titration“ angezeigt wird, Rührer einschalten und am Titrator die „Start/Stop“-Taste drücken
- bis zum pH-Endpunkt 4.7 titrieren
- nach Beenden der Titration Verbrauch ablesen und am Titrator „Start/Stop“ drücken, Rührer ausschalten
- nach dem Absaugen des Destillats und des Waschvorgangs der Destillationseinheit „Esc“ drücken; „Start P02“ erscheint wieder
- für neuen Destillationsvorgang „Enter“ drücken.
- nach dem Arbeitsende das Programm 1 (= Reinigung) starten
- wenn das Programm beendet ist, Aufschluss- und Vorlagegefäß entfernen, Wasserhahn schließen, Gerät und Titrator ausschalten.
- Schutzkappe mit Aufbewahrungslösung auf die pH-Elektrode stecken, Erlenmeyerkolben unter die Schläuche stellen, da sie etwas nachtropfen
- Gefäß, in dem die Wasserreste etc. gesammelt wurden, ausleeren
- ev. Lösungen in die Vorratsgefäße nachfüllen

Tabelle 9 gespeicherte Programme der Destillationseinheit

	<u>Programm 2</u>	<u>Programm 1</u>
Wasser	50 mL	50 mL
Borsäure	20 mL	0 mL
Natronlauge	100 mL	0 mL
Pause	0 min	0 min
Dampfreichweite	50%	50%
Zeit Destillation	4 min	5 min
Destillat absaugen	ja	ja
Titrationbeginn	100%	100%
Titrationrückstand absaugen	ja	ja
Waschen	ja	ja

3.6. Peptidmapping für Schimmelkäse mittels UPLC

Die RP-UPLC wird für die Charakterisierung und zum Vergleichen des Proteolysegrades verschiedener Altersstufen von Käse verwendet. Die Trennung der Peptide kann auf dem Molekulargewicht, der Ladung oder auch einer Kombination von beiden basieren. RP-UPLC wird zur Trennung von einer Mischung von Peptiden verwendet.

Für die Analyse der Peptide wurde die WSN-Fraktion verwendet. Diese ist ein Indikator für die Reifung und wenn viel WSN vorhanden ist, dann werden die Peaks im UPLC-Fingerprint auch hoch sein.

Komponenten

Zum Peptidmapping in Käseproben wurde ein Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC™) System der Water Corp. Verwendet besteht aus:

Binary Solvent Manager, Waters

Sample Manager, Waters

Säulenheizmodul, Waters

Tunable Ultraviolet (TUV) Detektor (190-700 nm) mit 500 nl Flusszelle, Waters

Säule für Peptidanalyse

Acquity UPLC™ BEH300 C₁₈, 1.7 µm, 2.1x100 mm, Waters

Software

Empower 2 Chromatography Software, Waters

Chemikalien

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Rotisolv[®], Roth[®]

UHQ-Wasser, SG Ultra Clear UV-System, Siemens Water Technologies

Trifluoressigsäure (TFA), ≥ 99.5%. für Proteinanalysen

Geräte und weitere Hilfsmittel

Vortex, Vortex-Genie, Bender&Hobein

Heizblock, QBT 1, Grant Instruments

Pyrolyseofen, Heraeus

Filtrationsanlage, 1000 mL, Millipore[®]

Vakuumpumpe, Millipore[®]

Tischzentrifuge, Eppendorf

Nylonfilter (für organisch L.), 0.45 µm, ø 47 mm, Magna, Roth[®]

Cellulosefilter (für wässrige L.), 0.22 µm, ø 47 mm, MicroSep, Roth[®]

Luer Spritzen, 2 mL, Injekt, B/Braun

Spritzenfilter, RC-Membran, 0.22 µm, Minisart RC 4, Sartorius

Inserts, 300 µl, 6x29 mm, Waters

Vials 12x32 mm, Waters

Screw Cap für 12x32 mm Vials, Waters

Gefriertrockner, Modulyo, Edwards

Aufbereitung der Käse-WSN-Proben für Peptidmapping

Von der gewonnenen WSN-Käsefraktion werden 2 mL eingefroren, danach gefriergetrocknet. Der Rückstand wird anschließend wieder in 2 mL Solvent A (UHQ + 0.1% TFA) gelöst. Danach wird gevortext und bei Raumtemperatur für 15-20 min. geschüttelt. Sobald dieser Schritt getan ist, wird 1 mL für 15 min., 4°C und 13 200 rpm zentrifugiert. Die Probe wird nochmals filtriert (Spritzenfilter), in ein Insert und Vial transferiert und ist somit bereit für die Injektion.

Laufmittel für UPLC Peptidmapping

Die Gradientenelution (Tab. 10) für das UPLC-Peptidmapping erfolgt über einen binären Gradienten bei dem der Anteil der unpolaren Phase (Acetonitril) langsam gesteigert wird, um die Peptide nach ihrer Hydrophobizität zu trennen.

Laufmittel für den binären Gradienten:

- *Polare mobile Phase* (Solvent A):
 - ⇒ UHQ Wasser + 0.1% TFA
 - ⇒ 500 mL UHQ mit Cellulosefilter filtrieren + 500 µL TFA

- *Unpolare mobile Phase* (Solvent B):
 - ⇒ Acetonitril + 0.1% TFA
 - ⇒ 500 mL + 500 µL TFA

Alle Laufmittel, mit Ausnahme der 100% organischen, werden je nach Zusammensetzung, wässrig oder organisch, mit den entsprechenden Filtern steril filtriert und in pyrolysierte Glasflaschen überführt.

Tabelle 10: Gradientenelution für Peptidmapping mittels UPLC

<i>Zeit</i> [min]	<i>Fluss</i> [mL/min]	<i>Mischungsverhältnis</i>		<i>Kurve</i>
		<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>	
Initial	0.2	100	0	initial
90	0.2	50	50	6
92	0.2	5	95	6
104	0.2	5	95	6
106	0.2	100	0	6
128	0.2	100	0	6

(Nach 128 Minuten kann die nächste Injektion erfolgen.)

Optimale Säulentemperatur: 40°C

Optimale Flussrate: 0.2 ml/min

Injektionsvolumen: 4 µL

UV-Detektor: 214 nm

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Tabelle 11: analysierten Stickstoffwerte der Käseproben (EW%, TN%, WSN%, WSN/TN%)

Probe	EW[%]	TN[%]	WSN[%]	WSN/TN [%]
<i>Camembert</i>				
24	18.34	2.93	0.90	30.7
25	20.18	3.23	1.06	32.8
26	19.24	3.08	0.70	22.8
27	19.24	3.08	0.90	29.3
28	26.41	4.23	1.10	26.0
29	22.31	3.57	1.16	32.5
<i>Roquefort</i>				
18	18.46	2.96	2.60	88.0
23	18.52	2.96	2.40	81.1
<i>Weißschimmel</i>				
15	21.07	3.38	0.60	17.8
<i>Grünschimmel</i>				
11	19.83	3.19	1.90	59.6
<i>Mischkäse</i>				
3	13.03	2.09	1.00	48.0
12	13.85	2.22	0.60	27.1
13	15.11	2.42	0.90	37.2
16	16.59	2.65	1.10	41.5
<i>Blauschimmel</i>				
1	16.08	2.58	1.80	69.9
2	18.21	2.91	1.85	63.6
4	15.62	2.44	1.20	49.3
6	18.28	2.93	1.10	37.6
9	12.01	1.93	1.00	51.9
14	19.53	3.13	2.30	73.6
19	15.72	2.52	0.90	35.8
20	19.02	3.05	1.20	39.4
<i>Gorgonzola</i>				
7	20.30	3.25	1.50	46.2
17	20.36	3.26	1.70	52.2
21	21.44	3.43	2.20	64.1
22	19.99	3.20	1.50	46.9

Die Berechnung des Totalstickstoffgehalts (TN%) ist wichtig, um den Eiweißgehalt des Käses zu erhalten. Dieser wird dann schlussendlich aber in g pro 100 g [%] angegeben. Das Verhältnis WSN/TN gibt den Grad der Reifung bzw. die Proteolyse, die im Käse stattgefunden hat, an. Je nach Höhe des Ergebnisses kann gesagt werden, dass die Reifung bzw. Proteolyse sehr fortgeschritten ist.

Die Eiweißgehalte (EW%) der sechs Camembertproben sind sich ähnlich. Fünf Proben haben Werte von 18.3%-22.3%. Nur ein Wert mit 26.4% weicht sehr stark von den anderen ab. Das Verhältnis WSN/TN weist ein geteiltes Bild auf, da drei Proben Werte über 30.7% aufweisen und die anderen drei Proben Werte von 22.8%-29.3% haben. Im Vergleich zu den anderen analysierten Käsegruppen zeigen die Camembertproben mit 30% WSN/TN eher eine niedrigere Proteolyse und es kann deshalb auf eine nicht sehr fortgeschrittene Reifung geschlossen werden.

Beide Roquefortproben zeigen sehr homogene Werte hinsichtlich des EW-Gehalts, der WSN-Fraktion und des WSN/TN-Verhältnisses. Die Werte des WSN/TN-Verhältnisses von über 80% geben Aufschluss auf eine starke Proteolyse bei dieser Käsesorte.

Die einzig untersuchte Weißschimmelprobe hat einen EW-Wert (21%), der den EW-Werten der anderen Proben ähnlich ist. Das Verhältnis WSN/TN (18%) weist auf eine schwache Proteolyse hin und bildet auch den niedrigsten Wert, der bei dieser Berechnung berechnet worden ist.

Auch die einzige Grünschimmelprobe hat einen EW-Wert (20%), der im Bereich der anderen Proben liegt. Das Verhältnis WSN/TN (60%) weist auf eine stärkere Proteolyse hin.

Bei den vier Mischkäseproben weisen zwei Proben niedrigere EW-Werte zwischen 13.0% und 13.8% auf und die anderen beiden Werte von 15.1% und 16.5% auf. Das Verhältnis WSN/TN variiert zwischen 27.1% und 48.0%. Diese Werte geben Aufschluss auf eine mittlere Proteolyse.

Die größte Analysengruppe bildet die Gruppe der Blauschimmelkäse mit acht Proben. Sie ist eine sehr heterogene Gruppe, da die EW-Werte sehr variieren (12.0%-19.5%). Das Gleiche gilt für das Verhältnis WSN/TN (35.8%-73.6%). Einige haben höhere Werte, was Rückschlüsse auf eine stärkere Proteolyse zulässt aber andere wiederum haben eher niedrige Werte, womit auf eine nicht so starke Proteolyse geschlossen werden kann.

Bei den vier Gorgonzolaproben sind die EW-Werte sehr ähnlich, da sie von 19.9%-21.4% reichen. Die WSN/TN-Werte jedoch reichen von 46.2% bis 64.1%. Dennoch geben diese Werte Auskunft über eine höhere Proteolyseaktivität.

Die Kjeldahlversuche wurden im Dreifachansatz analysiert und die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte der ermittelten Ergebnisse.

Berechnung:

$$V(\text{HCl}) * n(\text{HCl}) * M(\text{N}) * 100$$

$$\text{TN} [\%] = \frac{\text{V(HCl)} * n(\text{HCl}) * M(\text{N}) * 100}{\text{EW}}$$

V (HCl).....Verbrauch HCl [mL]

N (HCl).....Molarität HCl [mol/L]

M (N).....Molekulargewicht Stickstoff mit 14,008 g/mol

EWEinwaage [mg]

TN.....totaler Stickstoffgehalt [%]

4.2. Alkalische PAGE

Sie ist eine von vielen Methoden zur Evaluierung der Käsureifung um hydrolytische Vorgänge während des Reifungsprozesses verfolgen zu können. Die Trennung von den einzelnen Caseinen in diesen harnstoffhaltigen Gelen gibt Auskunft über den enzymatischen Abbau von Caseinmolekülen und die damit verbundene Bildung von Caseinbruchstücken anhand der Intensitätszunahme sowie –abnahme von der beobachteten Banden. Dennoch ist es mit Hilfe der alkalischen PAGE nur möglich Proteine und größere Peptide zu erfassen.

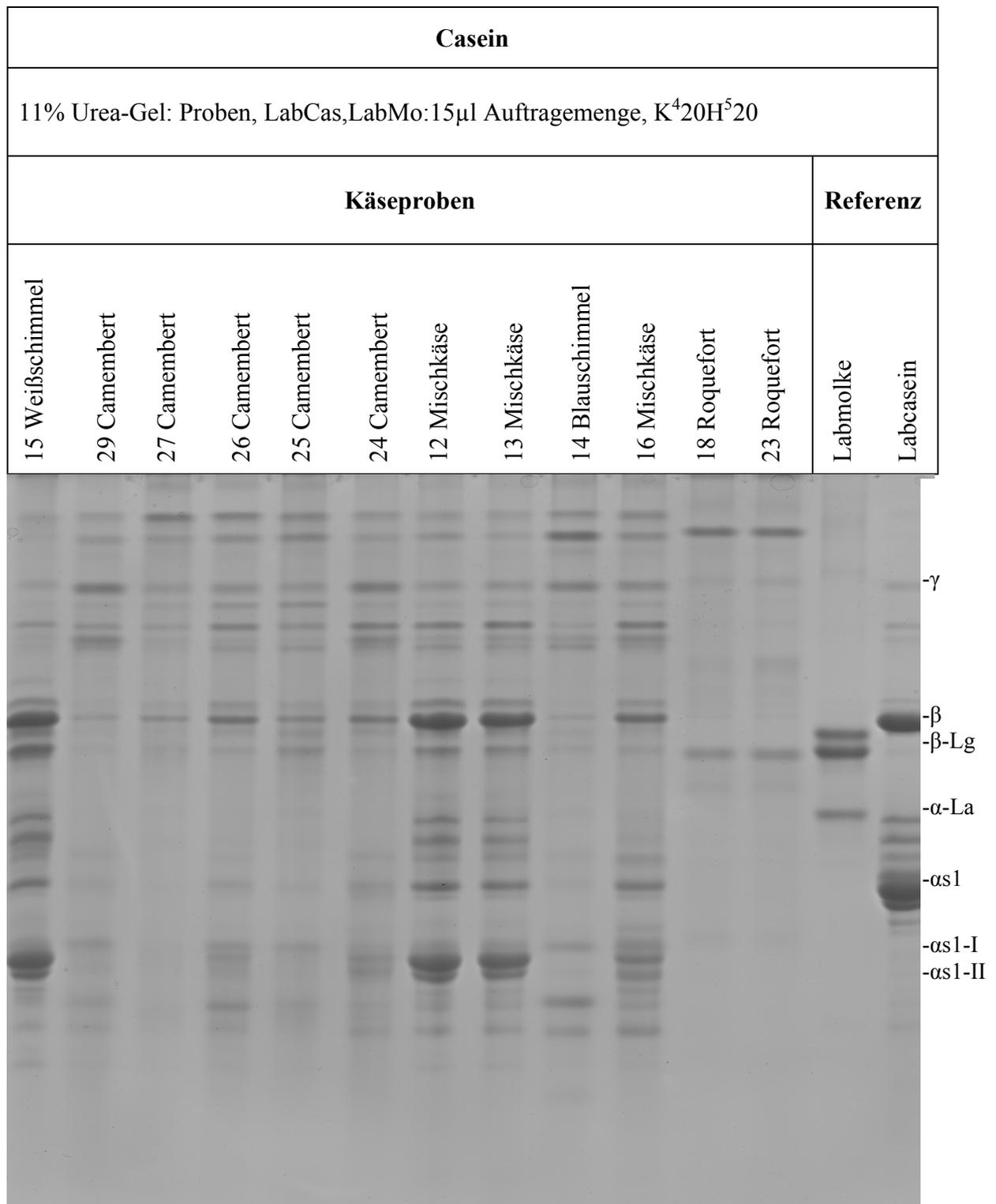


Abbildung 8: Urea-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 1)

⁴ K...Kontrast⁵ H...Helligkeit

Weißschimmelkäse:

Die γ -Caseinbande ist nur schwach erkennbar, während β - und α_{s1} -I-Casein stark erkennbar sind. α_{s1} -Casein ist nicht so intensiv, wie dessen Abbauprodukt α_{s1} -I- und α_{s1} -II-Casein.

Camembert:

In dieser Gruppe bilden die fünf Proben eine relativ homogene Einheit. Intensiv sind die γ -Caseinbanden. Schwächer jedoch ist die β -Caseinbande und schwach bis komplett abgebaut ist die α_{s1} und α_{s1} -I/ α_{s1} -II-Caseinbanden. Möglich könnte dies durch die hohe Anwesenheit von *Chymosin* sein und durch die längere Reifung von 4-6 Monaten.

Mischkäse:

Die Gruppe der Mischkäse bildet mit Ausnahme kleiner Abweichungen auch eine homogene Gruppe. Hier bilden vor allem die Proben 12 und 13 eine idente Bandenmuster mit einer ausgeprägten β - und α_{s1} -I-Caseinbande. Bei Probe 16 ist die β -Caseinbande intensiv und α_{s1} -I-Caseinbande weniger intensiv ausgeprägt.

Roquefort:

Die beiden Proben der Gruppe Roquefort bilden ein homogenes Paar. Beide machten eine starke Proteolyse durch, da die γ -Caseine nur schlecht zu erkennen sind und sonst nur mehr das β -Lactoglobulin. Die α_{s1} -Banden sind nicht mehr vorhanden, da der Abbau zu stark vorangeschritten ist.

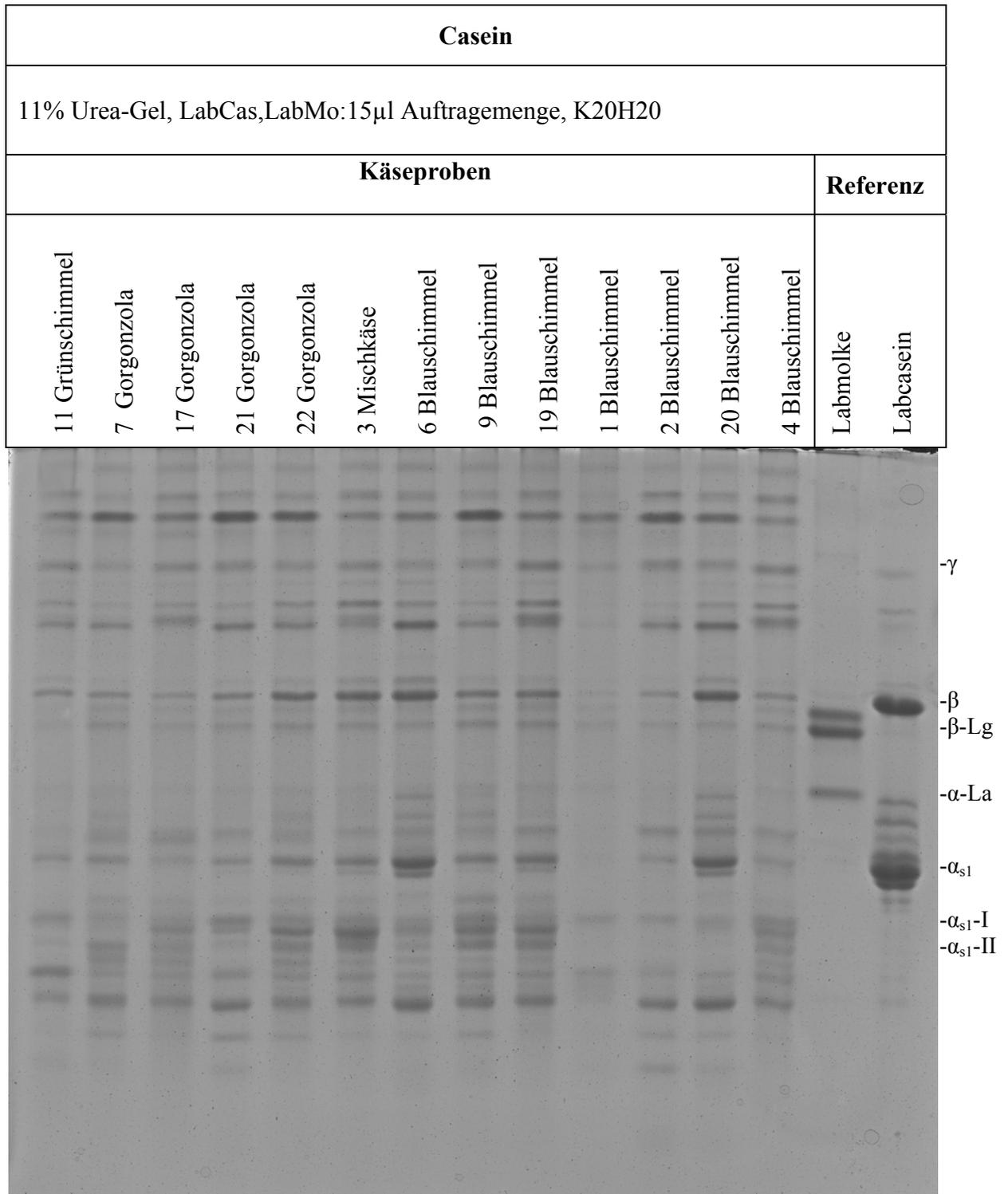


Abbildung 9: Urea-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 2)

Grünschimmel:

Die intensiven Banden in der einzigen Grünschimmelprobe sind die γ - und die α_{s1} -I-Caseinbanden. Die β - und α_{s1} Caseinbanden sind nur schwach vertreten. Der Grund für die schwache β -Caseinbande kann die erhöhte Plasminaktivität sein und bei der α_{s1} -Bande könnte die erhöhte Chymosinaktivität der Grund sein. Die schwachen Banden könnten ein Indikator für eine längere Reifung sein.

Gorgonzola

Die vier Proben bilden eine homogene Gruppe, da sie relativ gleich intensive Caseinbanden vorweisen. Bei Probe 22 ist eine intensivere β - und eine α_{s1} -Caseinbande zu sehen. Die intensivere β -Caseinbande kann durch eine geringere Plasminaktivität entstanden sein, oder bedingt durch eine nicht so starke Wärmebehandlung der Milch, die zu keiner Steigerung der Plasminaktivität geführt hat. Auffallend ist, dass vor allem im niedermolekularen Bereich der Laufstrecke vermehrt Banden vorhanden sind. Intensiver sind auch die α_{s1} -II-Banden, die durch den Abbau von α_{s1} -Casein entstanden sind.

Blauschimmel:

In dieser Gruppe kommt es nicht zu einer einheitlichen Erscheinung, da entweder in einer Probe zu sehr das Casein abgebaut ist, oder in der anderen weniger stark.

Die Proben 6 und 20 könnten als Paar angesehen werden, wo eine idente Intensität bei der γ -, β - und vor allem der sehr intensiven α_{s1} -Caseinbande gegeben ist.

Unterschiede finden sich bei beiden in der α_{s1} -I-Bande, die bei Probe 6 noch stärker vorhanden ist und bei 20 schon relativ stark abgebaut ist.

Die zwei Proben 9 und 4 ähneln sich in der γ - und β -Caseinbande aber die α_{s1} -Caseinbande ist intensiver bei 9 und die Abbauprodukte dieser Bande auch.

Die Probe 1 zeigt eine sehr stark ausgeprägte Proteolyse, wo nur mehr leicht die α_{s1} -I- und α_{s1} -II-Caseinbande erkennbar ist. Diese Bandenkonstellation, die nur sehr schwach erkennbar ist, könnte ein Indiz für eine längere Reifung sein, da die Caseine sehr stark abgebaut worden sind.

Ein ähnliches Bild aber dennoch noch relativ gut erkennbar zeigen die Banden von der Probe 2, wobei die α_{s1} -II-Bande sehr intensiv ist. Aber auch hier weisen die schwachen Banden auf eine längere Reifung hin.

4.3. SDS-PAGE

Bei dieser Variante der Elektrophorese erfolgt die Proteintrennung aber auch Peptidtrennung nach dem Molekulargewicht. Wie gut die Trennleistung ist, hängt vom Acrylamidanteil und auch vom Vernetzungsgrad ab. Eine gute Trennung von Proteinen und Peptiden wird durch ein 15%iges Gel erzielt.

Durch den Abbau von β -Casein durch *Plasmin* entstehen die γ -Caseine. Das α -_{s1}-Casein wird durch *Chymosin* abgebaut. Bei Käsen, wo β -Casein weniger stark abgebaut ist, sollte die Konzentration von γ_1 - und γ_2 -Casein hoch sein [Sousa et al., 2001]. Während bei Käsen, wo fast das ganze β -Casein abgebaut wurde (z.B. Roquefort) sollte γ_1 - und γ_2 -Casein und vor allem γ_3 -Casein weniger präsent sein, da die Plasminwirkung sehr stark war [Sousa et al., 2001].

Auch in der Bildung von bitteren Peptiden spielt *Chymosin* eine Rolle. Diese werden vor allem durch Koagulantien und Starterproteinasen gebildet [Upadhyay et al., 2004]. Dominant werden die extrazellulären Proteinasen von *Penicillium roqueforti* und Peptide mit niedriger Mobilität sind das Resultat ihrer proteolytischen Aktivität [Fox et al., 2004].

Durch die endogene Proteinase entstehen γ_1 -, γ_2 - und γ_3 -Casein. Die γ -Caseine sind das Resultat von β -Casein, das durch *Plasmin* abgebaut worden ist. α -_{s1}-Casein ist wichtig für die Bildung von einer weichen Textur. Resistent gegen das *Plasmin* ist κ -Casein, aber die restlichen Caseine werden nach Präferenz folgender abgebaut β - \sim , α -_{s2}- \gg , α -_{s1}-Casein [Fox et al., 2004].

Beta-Casein wird schnell im ersten Jahr der Reifung hydrolysiert. Die gamma-Caseine akkumulieren nach dem β -Abbau. α -_{s1}-Casein ist für die Proteolyse im frühen Reifungsstadium verantwortlich. Dessen Abbauprodukt α -_{s1}-I-Casein steigt auch im ersten Jahr z.B. wird es weiter zu anderen Peptiden abgebaut [Mayer et al., 1997].

β -Casein zur späteren Reifung kaum mehr da [Fox et al., 2004].

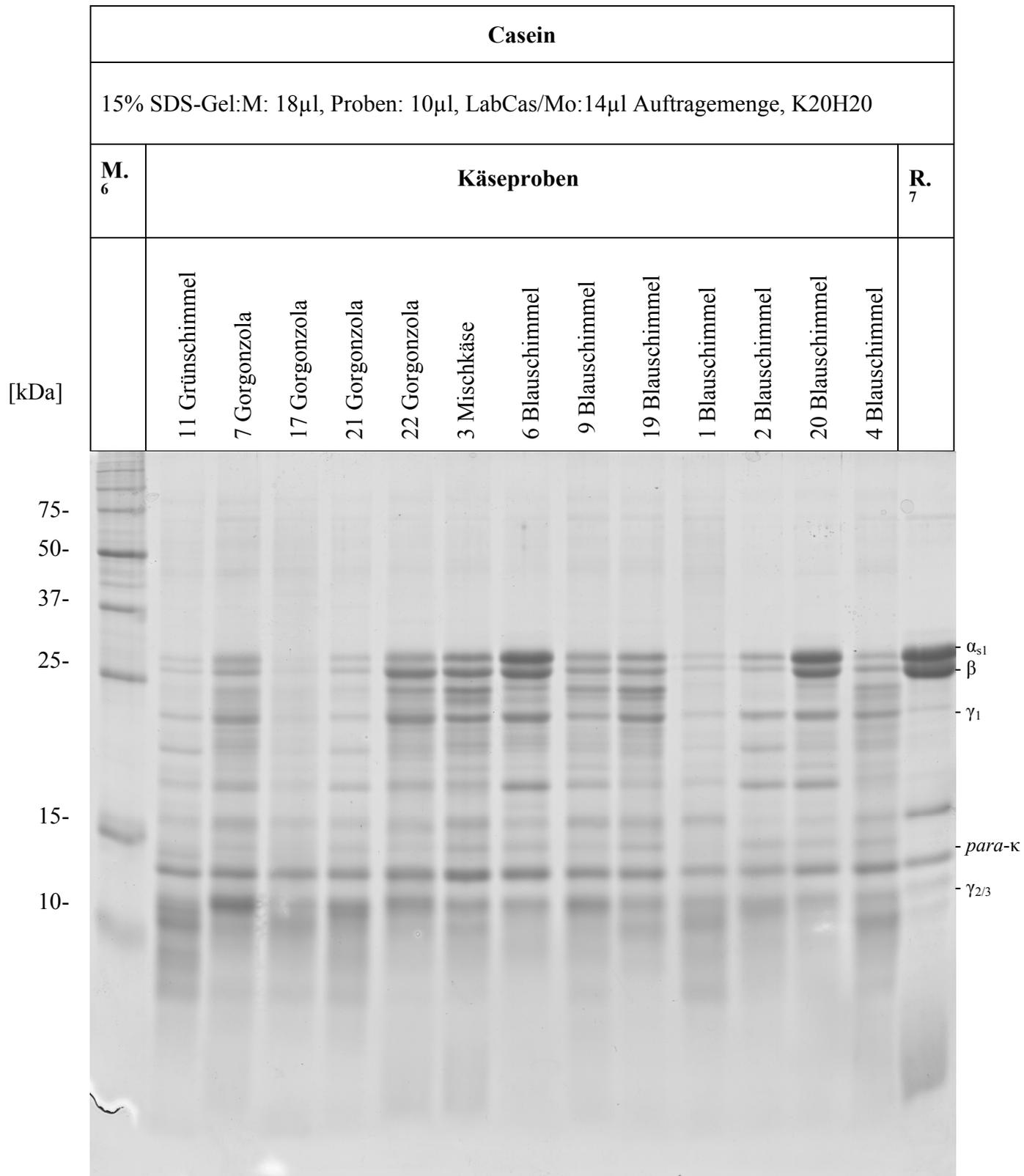


Abbildung 10: SDS-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 1)

⁶ Marker Novagen Perfect

⁷ Referenz Labmolke/-caseingemisch

Grünschimmel:

Die einzig analysierte Grünschimmelprobe weist eine starke Proteolyse auf, da die α -_{s1}-, β - und γ ₁-Caseinbanden fast komplett abgebaut sind. Das kann an der langen Reifung bzw. auch an den Grünschimmelkulturen liegen. Stärker vorhanden sind die Abbauprodukte des β -Caseins, γ ₂- und γ ₃-Casein aber auch das para- κ -Casein.

Gorgonzola:

In der Gruppe der Gorgonzola gibt es keine durchgehende Homogenität mehr. Die Probe 7 und 22 zeigen intensivere α -_{s1}-, beta-Caseinbanden, wobei diese noch nicht so stark wie α -_{s1}-Casein abgebaut worden sind. Die γ ₁-Caseinbande, sowie auch para- κ -, γ ₂- und γ ₃- Casein sind noch intensiv vorhanden, während diese bei Probe 17 einer sehr starken Proteolyse unterzogen worden sind, was vielleicht an der längeren Reifung liegt. Probe 21 hat eine nicht so starke Proteolyse, wie sie bei Probe 17 auftritt.

Blauschimmel:

In der größten Gruppe der Käseproben gibt es die meisten Unterschiede innerhalb der Gruppe. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Reifungsdauer sein, die für eine nicht so ausgeprägte oder sehr extensive Proteolyse verantwortlich ist. Aber auch die Temperatur, pH, Salzkonzentration und Bakterienkulturen können ein anderes Ergebnis zur Folge haben [Cantor et al., 2004].

Faktum ist, dass der Blauschimmelkäse zu den am stärksten proteolytischen Käsen zählt. Durch zunehmende Reifung wird mehr β -Casein abgebaut. Die Proteolyse in pasteurisierter Milch ist auch geringer [Cantor et al., 2004]. Ident von der Bandenintensität sind die Probenpaare 6 und 20 mit sehr intensiven α -_{s1}-, beta- und γ ₁-Caseinbanden und 3 und 19 mit noch immer intensiven α -_{s1}-, β - und γ ₁-Caseinbanden. Die Probenpaare 9 und 4 sind schon schwächer von der Intensität aber nicht so schwach, wie bei Probe 1, wo kaum mehr Banden sichtbar sind außer para- κ -, γ ₂ und γ ₃-Casein.

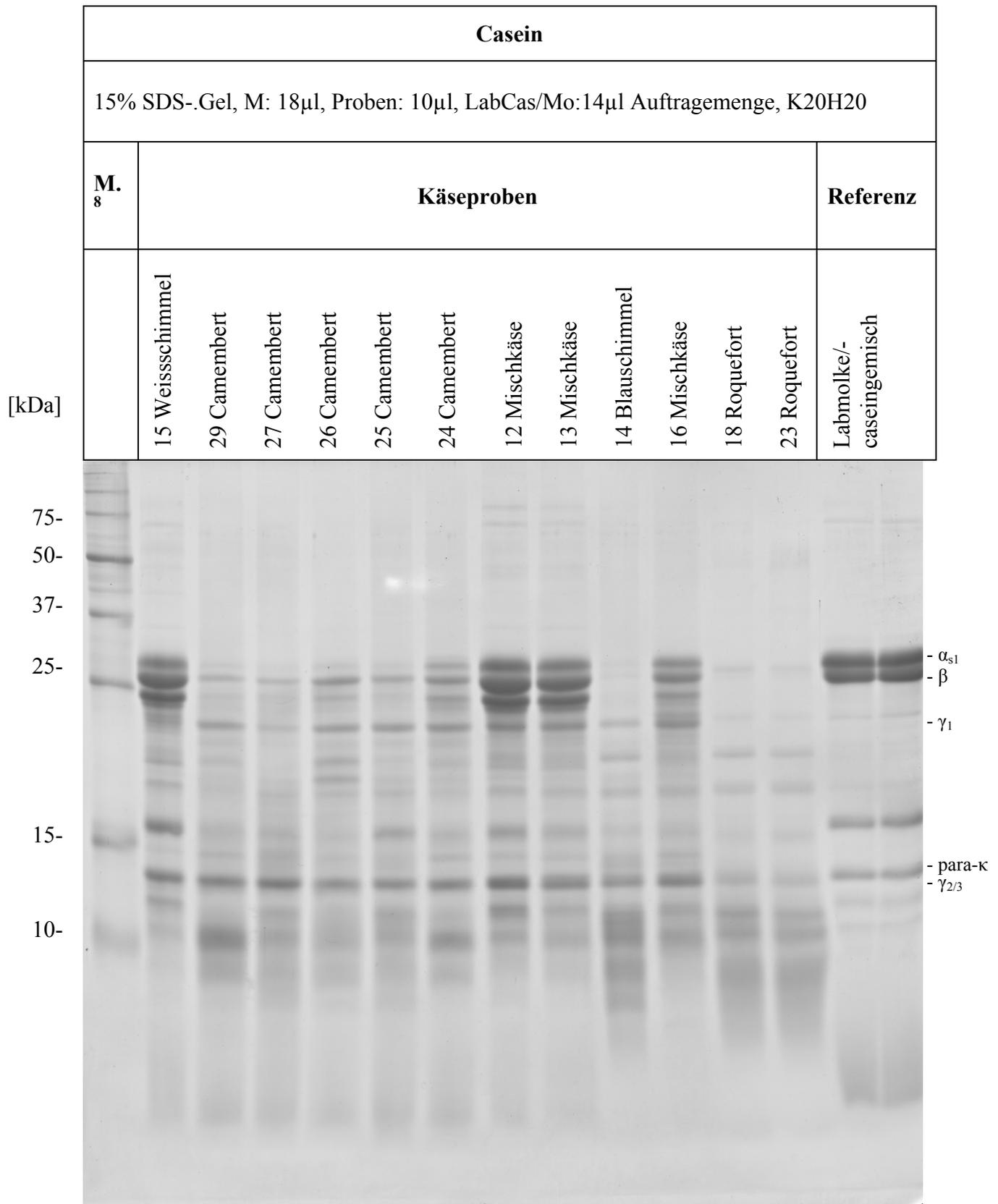


Abbildung 11: SDS-PAGE der Milchproteine in Schimmelkäseproben (Teil 2)

⁸ Marker Novagen Perfect

Camembert:

Die fünf Käseproben in der Gruppe der Camemberts zeigen ein homogenes Bild. Die zwei Käse aus französischer Herstellung, Probe 27 und 25, sind vor allem durch eine starke Proteolyse gekennzeichnet. Probe 24 aus österreichischer Produktion weist die am wenigsten ausgeprägte Proteolyse auf, da die Banden α -_{s1}- und β -Casein noch am intensivsten zu sehen sind. Der Abbau des β -Caseins, am Ende der Reifung, zeichnet sich durch die Akkumulation der gamma-Caseine aus, die bis auf Probe 27 gut erkennbar sind. α -_{s1}-Casein wird im ganzen Käse stark abgebaut und bildet dann α -_{s1}-I-Caseine. β -Casein wird vor allem stark in den äußeren Schichten abgebaut, während im Käsekern eher wenig davon abgebaut wird [Spinnler und Gripon, 2004]. Eine starke Proteolyse durch Anwesenheit von Lab, *Plasmin* und mikrobiellen Proteinase ist möglich. Je nach *Penicillium camemberti*-Stamm kommt es zu unterschiedlich weichen Oberflächen, Farbe, Wachstum und Aussehen des Käses. Natriumchlorid spielt aber auch eine wichtige Rolle, da es bei hohen Mengen das *G. candidum*-Wachstum hindern kann, oder bei zu wenig Natriumchlorid und ungenügender Drainage das Wachstum von *G. candidum* die Implantation von *P. camemberti* hindert [Spinnler und Gripon, 2004].

Mischkäse:

Bei den drei Mischkäsen ist deutlich eine schwache Proteolyse erkennbar, da die Banden sehr gut erhalten sind. Vor allem die Intensität der α -_{s1}- , β - und γ ₁-Caseinbanden. Auch die para- κ -Caseinbande ist intensiv. Bei den Proben 12 und 13 ist besonders die β -Caseinbande schwach abgebaut. Auch γ ₂- und γ ₃-Casein sind noch relativ gut erkennbar. Insgesamt kann gesagt werden, dass die Bandenintensitäten aller drei Proben gleich stark sind und sie eine homogene Gruppe bilden.

Roquefort:

Die Probe 18 und 23 sind von der Bandenintensität gleich. Hier findet eine starke Proteolyse statt, da nur mehr leicht erkennbare Banden vorhanden sind. Vor allem die α -_{s1}- , β - und γ ₁-Caseinbanden sind fast komplett abgebaut. Der Abbau der β -Caseinbande wird durch eine starke Plasminaktivität verursacht. Die Hauptaktivität des Labs liegt auf α -_{s1}-Casein zu α -_{s1}-I- und α -_{s1}-II-Casein. Das *Plasmin* hydrolysiert β -Casein zu γ -Casein und Proteose-Peptonen. *Penicillium roqueforti* exprimiert zwei extrazelluläre Proteasen:

- Metalloproteinase

- Aspartatproteinase

Die Metalloproteinase hydrolysiert α -_{s1}-Casein in acht Peptide und β -Casein in neun Peptide [Cantor et al., 2004].

Weißschimmelkäse:

Die einzig analysierte Weißschimmelprobe zeigt eine nicht sehr ausgeprägte Proteolyse und kann von der Bandenintensität mit den Mischkäsen verglichen werden. Der einzige Unterschied liegt vielleicht in der schwächeren γ ₁-Caseinbande bzw. bei den gesamt schwächeren γ -Caseinen.

4.4. Peptidmapping

Eine wichtiger Teil in der Analyse, von in der Reifung entstehenden Peptide, nimmt die chromatographische Untersuchung der Peptidmuster mittels UPLC ein. Zum Einsatz kommt das chromatographische Peptidmapping vor allem bei Proteolysegradbestimmungen aber auch bei Authentizitätsprüfungen und für die qualitativen Fingerprints einzelner Käsetypen.

In dieser Arbeit wurden die wasserlöslichen Extrakte (WSN) von Mischkäsen, Camemberts, Roqueforts, Gorgonzola, Blauschimmel-, Weißschimmel- und Grünschimmelkäse mittels UPLC untersucht, um charakteristische Peptidprofile für einzelnen Käsegruppen festzustellen, und mögliche Gemeinsamkeiten aufzudecken.

Peptide werden hierbei anhand von Hydrophobizitätsunterschieden chromatographisch getrennt, wodurch sich käsetypische Peptidmaps (Fingerprints) ergeben.

Der Vorteil des UPLC Peptidmappings gegenüber der HPLC-technik, liegt neben der möglichen Reduktion der Analysezeit, vor allem in der effizienteren Trennung und verbesserten Auflösung, wodurch qualitativ hochwertige Peptidmaps erzielt werden können.

Als Beispiel für den Einsatz von UPLC-Peptidmapping in der Milch/Käseanalytik sind Peptidprofile von Sauermolke (Abb.12) und Labmolke (Abb.13) dargestellt.

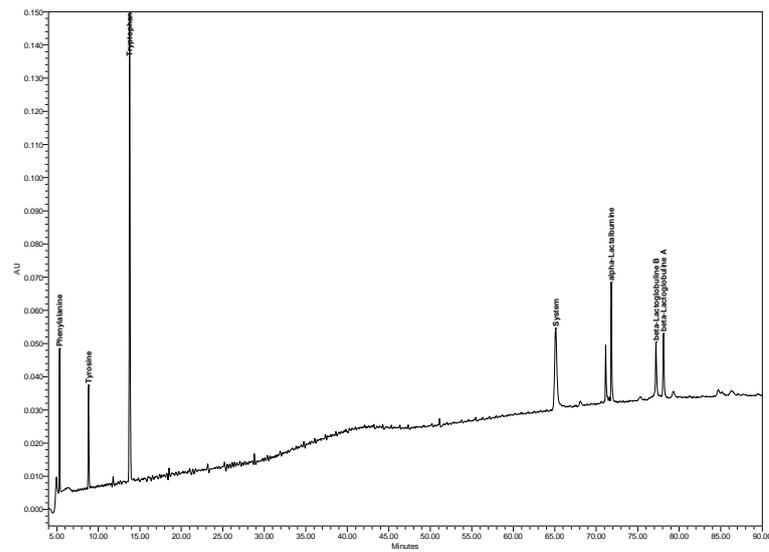


Abbildung 12: Peptidmap einer Sauermolke (aromatische Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan; Glukomakropeptid und Molkenproteine: α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin)

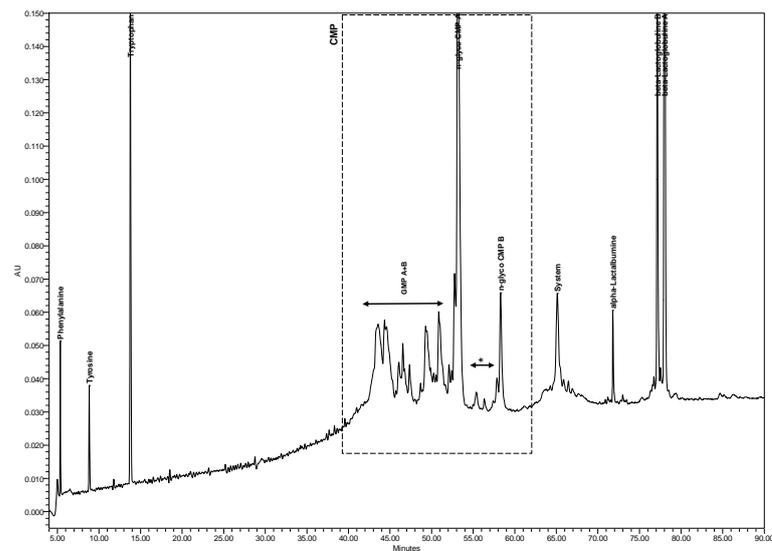


Abbildung 13: Peptidmap einer Labmolke (aromatische Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan); und Molkenproteine: α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin)

Gorgonzola

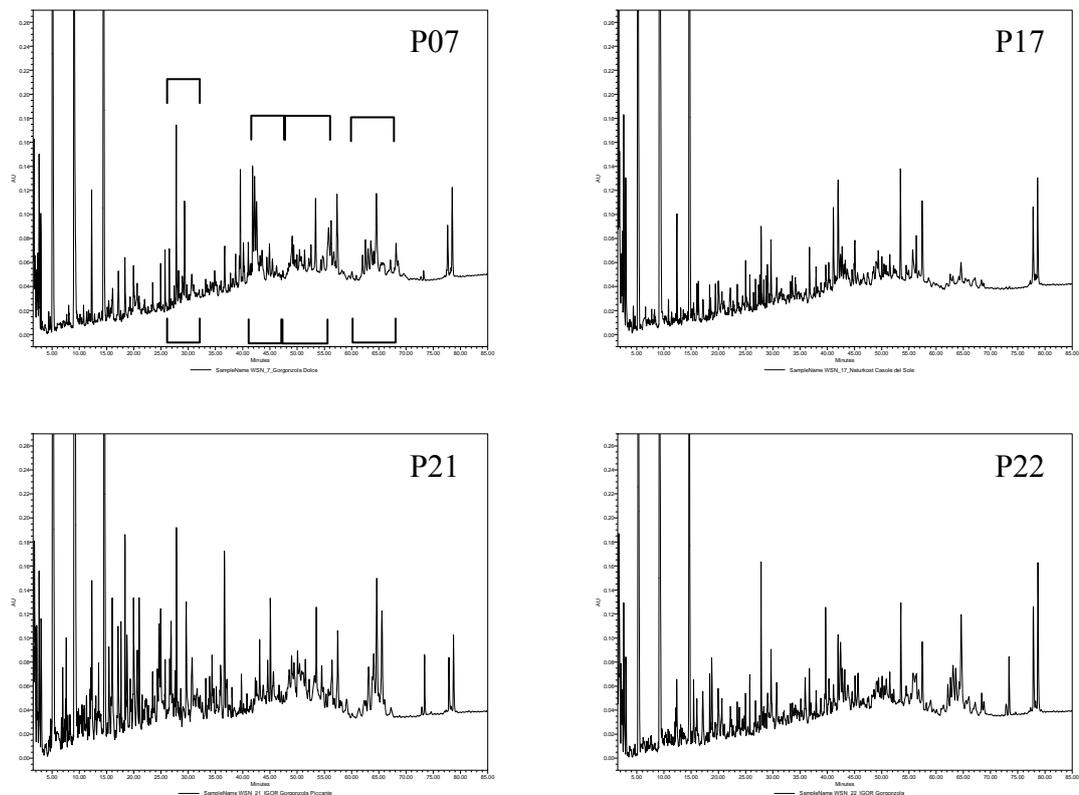


Abbildung 14: Peptidmapping der Gorgonzolaproben (WSN)

Das Peptidmapping der Gorgonzolaproben (Abb. 14) weist auf eine hohe Proteolyseaktivität hin, da viele Peptide erkennbar sind. Vor allem im hydrophilen Bereich sind die meisten Peptide zu finden. Weniger werden es in Richtung Mitte bzw. hin zum hydrophoben Bereich. Besonders die Probe 21 sticht durch viele Peptide im hydrophilen Bereich hervor. Markante Peakmuster für alle vier Gorgonzolaproben lassen sich bei Minute 26-32, 41-47, 47-56 und 60-68 finden. Weiters weisen alle Proben einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren auf.

Camembert

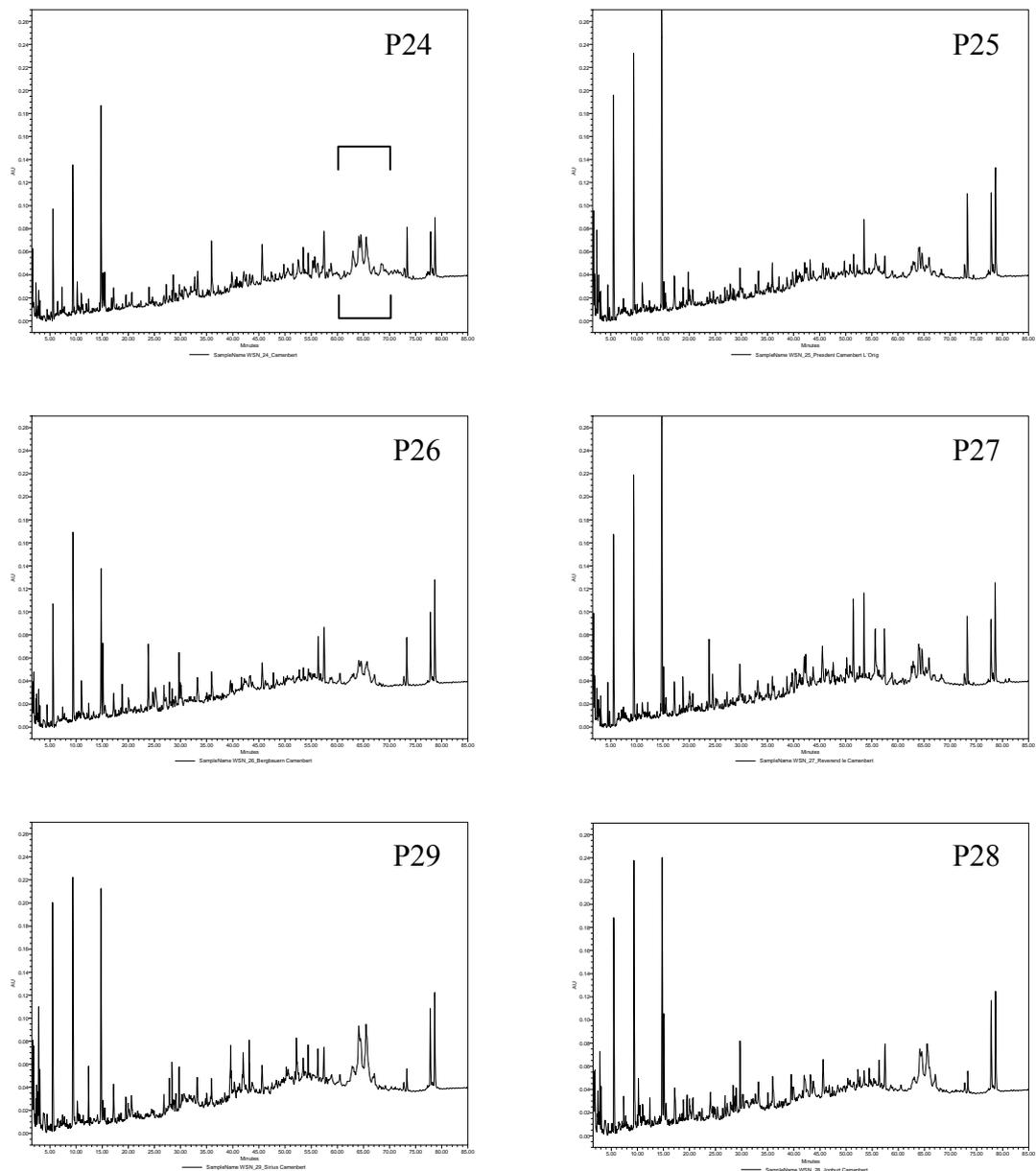


Abbildung 15: Peptidmapping der Camembertproben (WSN)

Anhand der UPLC-Chromatogramme (Abb. 15) der verschiedenen Camembertkäse wird deutlich, dass diese Art von Käse weniger Peptide aufweist, was durch die schwächere Proteolyseaktivität hervorgerufen wird. Die sechs Chromatogramme weisen ein homogenes Bild auf, da bei allen weniger Peptide im hydrophilen Bereich, aber mehr im mittleren Bereich zu finden sind. Weiters sind die aromatischen Aminosäurepeaks im Vergleich zu Roquefort oder Gorgonzola viel geringer. Markant für diese Käsesorte ist das Peptidmuster bei Minute 60-70. Dieses ist ebenfalls bei den Mischkäsen zu finden.

Mischkäse

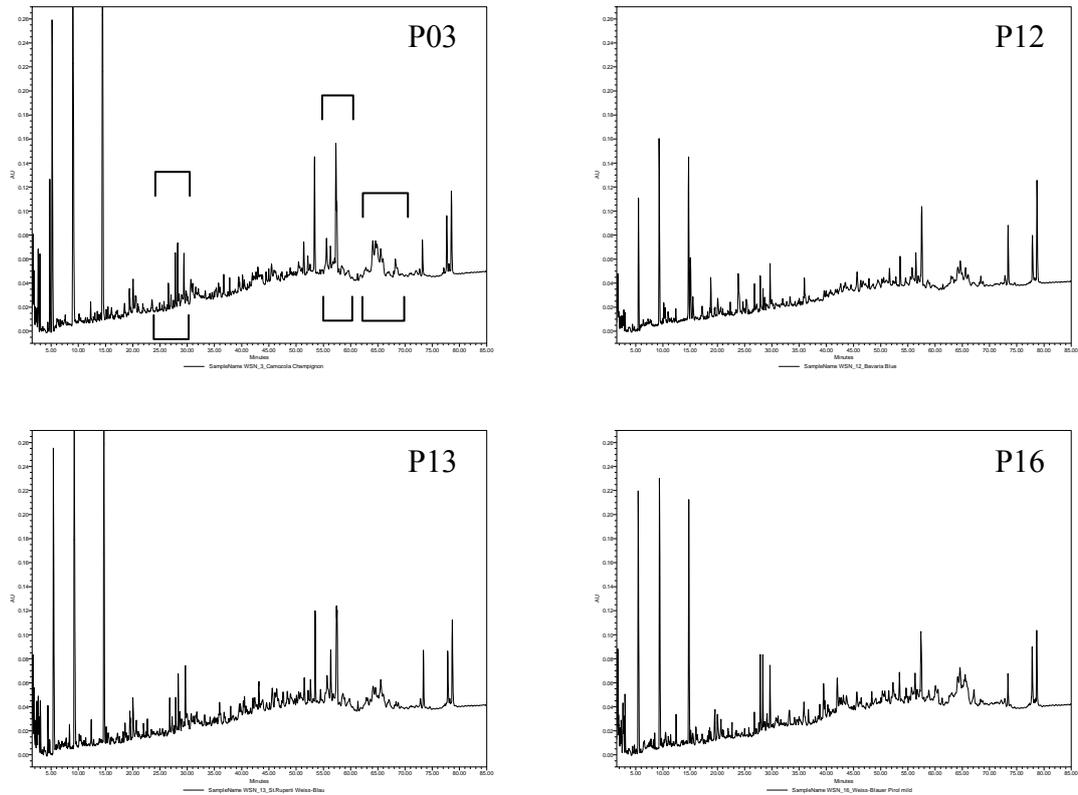


Abbildung 16: Peptidmapping der Mischkäseproben (WSN)

Die vier Mischkäseproben (Abb. 16) weisen eine geringe Proteolyseaktivität auf. Es sind nur wenige Peptide im hydrophilen Bereich sichtbar, wo eigentlich mehrere durch die Blauschimmelkultur erwarten wären. Die aromatischen Aminosäurepeaks sind auch nicht homogen in dieser Gruppe, da sie bei Probe 3 und 13 ähnlich denen von Gorgonzola und Roquefort, aber bei Probe 12 und 16 eher denen von Camembert ähneln. Drei Peakmuster fallen dennoch auf, die bei allen Proben vorkommen. Das erste Muster ist bei Minute 25-30. Die zweite Formation ähnelt sehr, der von Gorgonzola und beginnt bei Minute 55-58 und die dritte Peakgruppe hat eine Ähnlichkeit mit der von Camembert und befindet sich bei Minute 62-70. Weil die Mischkäse eine Mischung aus Camembert und Gorgonzola darstellen, sind Ähnlichkeiten mit diesen Käsesorten zu erwarten.

Weißschimmelkäse

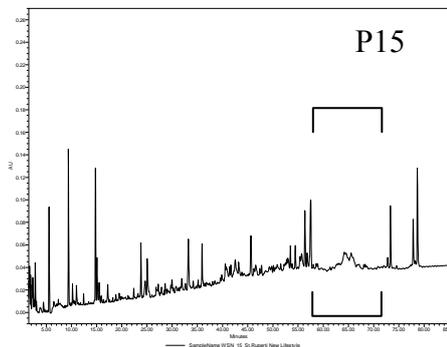


Abbildung 17: Peptidmapping der Weißschimmelprobe (WSN)

Die einzige Weißschimmelprobe (Abb. 17) weist eine geringe Proteolyseaktivität auf. Auch die aromatischen Aminosäurepeaks sind geringer als bei den Gorgonzolaprobe. Generell ähnelt das Chromatogramm sehr denen von Camembert. Dies wird auch durch das Peakmuster von Minute 62-70 verdeutlicht.

Grüenschimmelkäse

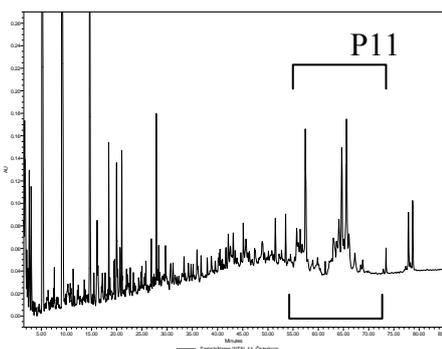
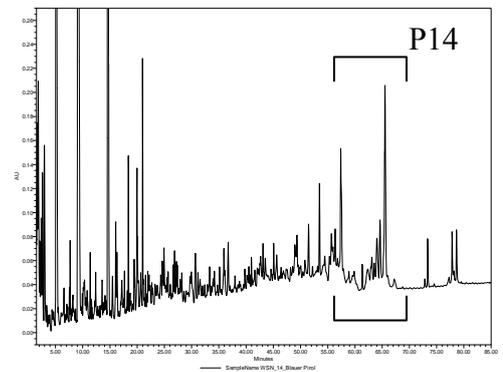
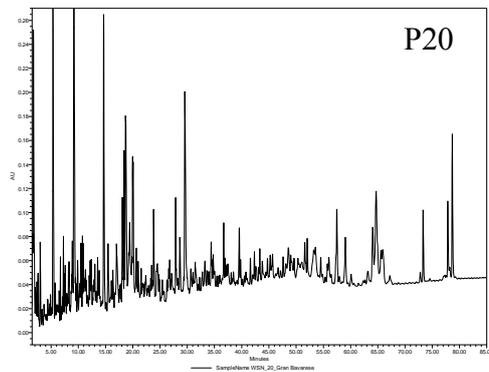
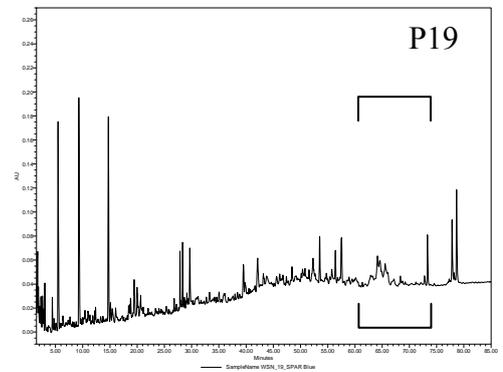
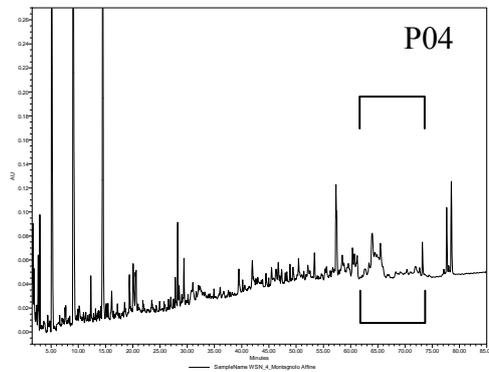
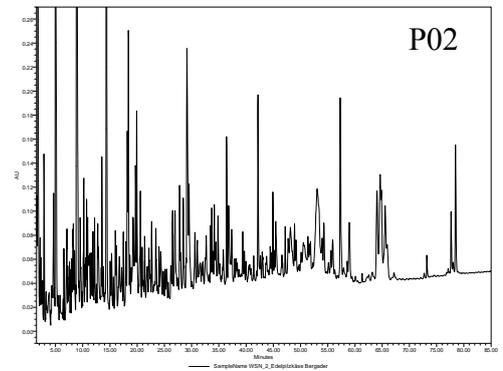
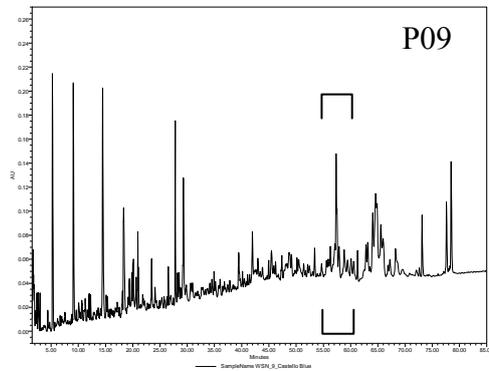
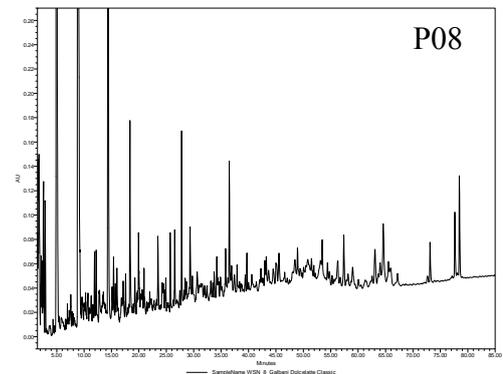
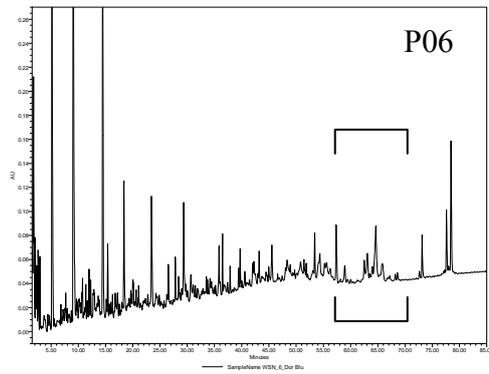


Abbildung 18: Peptidmapping der Grüenschimmelprobe (WSN)

Die einzige Grüenschimmelprobe (Abb. 18) weist eine sehr hohe Konzentration an aromatischen Aminosäuren auf. Die Proteolyseaktivität ist auch relativ hoch, da es ein sehr ausgeprägtes Peptidprofil zeigt. Das Peptidprofil ab Minute 65 ähnelt dem von den Gorgonzolaprobe 7, 21 und 22. Auch als markant lässt sich das Peptidmuster bei Minute 54-60 ansehen.

Blauschimmelkäse



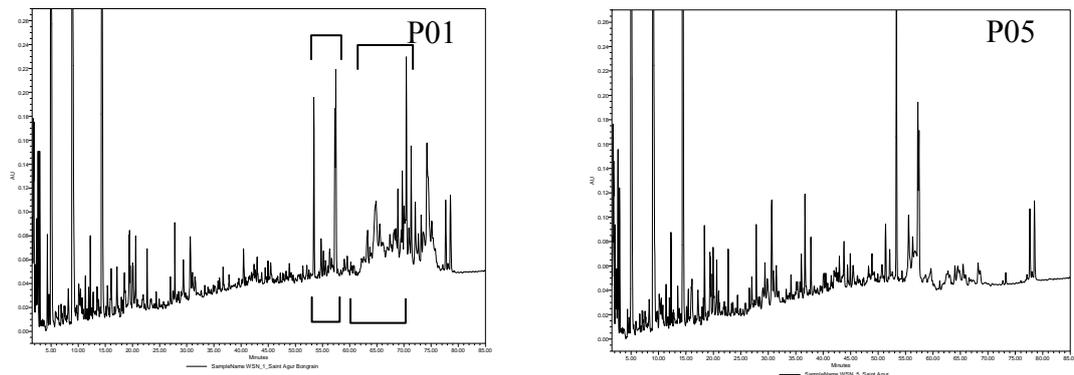


Abbildung 19: Peptidmapping der Blauschimmelproben (WSN)

Allgemein kann anhand der Chromatogramme (Abb. 19) gesagt werden, dass die WSN-Fraktion der Blauschimmelkäse viele Peptide aufweisen, welche durch die erhöhte Proteolyseaktivität dieser Käseart entstehen. Eine starke Proteolyse lässt sich z.B. bei Probe 2 erkennen, während bei Probe 4 und 19 eine schwache Proteolyse vorherrscht. Die Blauschimmelgruppe bildet eine sehr heterogene Gruppe, da es selten ähnliche Fingerprints gibt. Bei allen Proben findet sich ein Peak bei Minute 57. Bei Probe 1, 2 und 5 ist dieser Peak sehr hoch. Markant ist auch, dass einige Chromatogramme die meisten Peaks im hydrophilen Bereich haben und die andere Mehrheit jedoch im hydrophoben Bereich. Dies kann vor allem bei Probe 1 und 2 beobachtet werden. Außerdem ist bei Probe 1 eine einzigartige Peakformation im hydrophoben Bereich (62-75 min.) zu erkennen, die in dieser Form einzigartig ist.

Die Proben 4 und 19 sind sich von ihrem Fingerprint her sehr ähnlich, da beide eine geringe Proteolyse, gekennzeichnet durch wenige Peptide, aufzeigen und durch die Peakformation bei Minute 61-70, eine Ähnlichkeit mit den Camembertproben zeigt. Bei Probe 9 fällt das Peakmuster bei Minute 55-60 auf, das Ähnlichkeiten mit der der Mischkäse/Gorgonzola hat. Bei Probe 14 ist auch das Peptidprofil von Minute 60-70 sehr dem von Gorgonzola ähnlich.

Roquefort

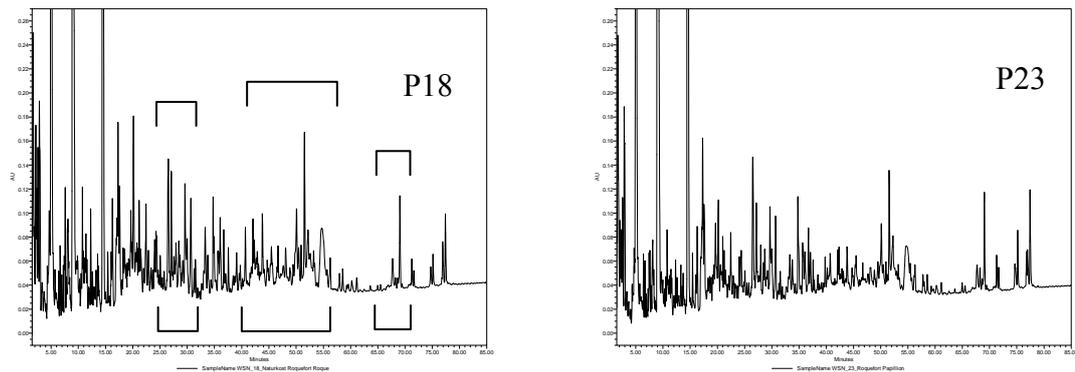


Abbildung 20: Peptidmapping der Roquefortproben (WSN)

Die beiden Roquefortproben 18 und 23 (Abb. 20) zeigen ein sehr ähnliches, wenn nicht fast identes Chromatogramm. Die Proteolyse ist auch hier sehr fortgeschritten, da viele Peptide, besonders im hydrophilen Bereich sichtbar sind. Die aromatischen Aminosäurepeaks sind mit denen von Gorgonzola vergleichbar. Die Peakformationen bei Minute 25-32, 41-57 und 65-71 sind markant für diese Sorte von Käse. Der Bereich von 50-65 ist in dieser Form nur bei den Roquefortproben so zu sehen, was vielleicht auch an der Schafsmilch liegen könnte.

5. Schlussbetrachtung

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, die Proteolyse ausgewählter Käseproben mit unterschiedlichen Methoden zu erfassen und miteinander zu vergleichen, sofern dies möglich war. Als Probe dienten 29 handelstypische Käsesorten à 200-250 g [Camembert (6), Weißschimmel- (1), Misch- (4), Blauschimmel- (8) und Grünschimmelkäse (1), Gorgonzola (4) und Roquefort (2)]. Die Proteolyse ist der Abbauvorgang im Käse, wodurch aus Proteinen in erster Linie Peptide und in weiterer Folge Aminosäuren entstehen, die charakteristisch für den jeweiligen Geschmack jeder einzelnen Käsesorte sind.

Die angewandten Methoden zur Erfassung der Proteolyse waren die SDS- und Urea-PAGE, womit die einzelnen Caseinbanden analysiert wurden, die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl für die Eruiierung des Gesamt- und wasserlöslichen Stickstoff (WSN) und die RP-UPLC, zur Analyse von käsetypischen Peptidmaps, verwendet.

Stickstoffbestimmung

Die Gesamtstickstoffwerte (TN%) bzw. Eiweißgehaltswerte (EW%) der sechs Camembertproben sind sich ähnlich. Vier Proben weisen Werte von 3.0% bis 3.5% bzw. 18.3% bis 26.4% auf, aber die anderen zwei haben einmal 2.9% und 4.2% bzw. 22,3% und 26,4%. Das Verhältnis WSN/TN weist ein geteiltes Bild auf, da drei Proben Werte über 30.7% aufweisen und die anderen drei Proben Werte von 22.8%-29.3% haben. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über die Proteolyse, die im Käse stattgefunden hat. Je nach Höhe des Ergebnisses kann gesagt werden, dass die Proteolyse bzw. Reifung sehr fortgeschritten ist. Bei den Camembertproben würde anhand der Werte auf eine nicht sehr fortgeschrittene Reifung geschlossen werden.

Die EW-Werte der beiden Roquefortproben sind sehr homogen. Auch WSN und das WSN/TN-Verhältnis (88.0% und 81.1%) beider sind sich ähnlich. Die hohen Werte weisen auf eine starke Proteolyse hin.

Die einzig untersuchte Weißschimmelprobe hat einen EW-Wert, der den EW-Werten anderer Proben ähnlich ist. Das Verhältnis WSN/TN weist auf eine schwache Proteolyse hin und bildet auch den niedrigsten Wert aller Proben.

Die einzige Grünschimmelprobe hat einen EW-Wert, der im Bereich der anderen Proben liegt. Das Verhältnis WSN/TN weist auf eine stärkere Proteolyse hin, wie sie bei z.B. Gorgonzola oder Blauschimmelkäse zu erkennen ist.

Die vier Mischkäse zeigen niedrigere EW-Werte, jedoch beim Verhältnis WSN/TN variieren sie, da die Bandbreite von 27.1% bis 48.0% reicht. Diese Variation lässt sich vielleicht auf die unterschiedliche Reifungsdauer und auf die unterschiedlichen Bakterienstämme zurückzuführen, da es möglich sein könnte, dass die Proben mit höheren WSN/TN-Werten mehr Blauschimmelkulturen beinhalten und somit mehr Proteolyse betrieben werden konnte.

Die größte analysierte Probengruppe bildet die Blauschimmelkäsegruppe mit acht Proben. Sie ist eine sehr heterogene Gruppe, da alle Werte sehr variieren. Das Verhältnis WSN-TN/TN kann bei 35.8% bis 69.9% liegen. Die Proben mit den höheren Werten dieses Verhältnisses, haben eine stärkere Proteolyse und die Proben mit niedrigeren Werten haben eine schwache Proteolyse.

Bei den vier Gorgonzolaproben sind die EW-Werte sehr ähnlich. Die WSN-TN/TN-Werte jedoch reichen von 46.2% bis 64.1%, welche ähnlich denen von Camembert sind. Dennoch geben diese Werte Auskunft über eine höhere Proteolyseaktivität.

Urea-PAGE

Diese Methode ist zur Analyse der Proteolyse bei Käse sicherlich eine der Wichtigsten. Der enzymatische Abbau der einzelnen Caseine kann durch die Trennung in harnstoffhaltigen Gelen gut mitverfolgt werden, da es zur Entstehung von Caseinbruchstücken kommt, die sich durch ihre Intensität unterscheiden lassen und somit leicht miteinander vergleichbar sind. Mit dieser Methode können aber nur größere Peptide erfasst werden.

Die fünf Camembertproben zeigen ein sehr ähnliches Bild. Das α -_{s1}-Casein ist stark abgebaut und das beta-Casein auch nur mehr schwach vorhanden ist, was vor allem bei Probe 27 und 29 deutlich erkennbar ist.

Bei den Mischkäsen ist vor allem die beta-Caseinbande sehr intensiv, aber auch die α -_{s1}-Caseinbande ist gut erkennbar. Auffallend ist die α -_{s1}-I-Caseinbande, die wie bei der Weißschimmelprobe sehr ausgeprägt ist. Diese Bande ist sicherlich signifikant für diese Gruppe, da sie sonst bis auf die Weißschimmelprobe nirgendwo sonst in diesem Ausmaß vorkommt.

Die beiden Roquefortproben zeigen ein sehr markantes Bild, da nur die beta-Lactoglobulinbande mehr zu sehen ist. Der Abbau der Caseine ist hier am stärksten ausgeprägt, was bedingt durch eine lange Reifung sein kann.

Die größte Probengruppe, die Blauschimmelkäse, zeigen ein unterschiedliches Ergebnis betreffend ihrer Caseinbanden. Die einzige Probe 1 weist eine starke Proteolyse auf, da nur mehr die Abbauprodukte von alpha_{s1}-Casein, alpha_{s1}-I- und alpha_{s1}-II-Casein schwach sichtbar sind.

Für die starke proteolytische Aktivität sind *Cathepsin D*, eine saure Milchprotease, und das Labenzym *Chymosin*, welche besonders auf alpha_{s1}-Casein einwirken und abbauen, verantwortlich. Je länger die Reifungsdauer der Käse dauert, desto mehr nimmt die alpha_{s1}-Caseinbande ab, während die alpha_{s1}-I- und alpha_{s1}-II-Caseinbanden intensiver werden [McSweeney, 2007].

Die einzige Weißschimmelprobe zeigt intensive Banden, vor allem für alpha_{s1}-I-Casein. Die Proteolyse ist somit sehr schwach, da eine vermehrte Schimmelbildung außen stattfindet und nur wenig im inneren des Käses.

Das gegenteilige Bild ist bei der einzigen Grünschimmelprobe zu erkennen, da nur sehr schwache Banden, vor allem für die Hauptbanden, alpha_{s1}- und beta-Casein, zu erkennen sind.

Bei den vier Gorgonzolaproben zeigt sich ein ähnliches Bandenmuster, da nur schwach die Hauptbanden zu sehen sind, jedoch vermehrt Abbauprodukte von alpha_{s1}-Casein.

SDS-PAGE

Die Trennung der Proteine und Peptide erfolgt bei der SDS-PAGE durch die verschiedenen Molekulargewichte. Eine wichtige Rolle bei der Trennung spielen auch der Vernetzungsgrad der Trenngele und der Anteil an Acrylamid.

Allgemein zeigen sich bei allen Proben die zwei Hauptbanden, welche alpha- und beta-Casein darstellen, im Bereich von 20 000-30 000 Da. Nach fortschreitender Reifung nimmt jedoch die Bandenintensität ab. Dies wird durch den enzymatischen Abbau der Caseine verursacht. Alpha_{s1}- und beta-Casein verringern sich, doch ihre Abbauprodukte wie z.B. alpha_{s1}-I- oder gamma_{2/3}-Casein häufen sich an. Der erhöhte alpha_{s1}-Caseinabbau bei Rohmilchkäsen wird vielleicht durch *Cathepsin D*, eine saure Milchprotease, verursacht. Diese wird jedoch bei der Pasteurisation inaktiviert [McSweeney et al., 2004].

Bei den Camembertproben sind die Banden im höhermolekularen Bereich (α_{s1} -, β -, γ_1 -Casein) schwach. Vor allem die α_{s1} -Caseinbande ist bis auf Probe 24 sehr stark abgebaut, was durch das Enzym *Chymosin* verursacht wird, im Gegensatz zu β -Casein, was erst zu einem späteren Zeitpunkt abgebaut wird [Iwasawa et al., 1996]. Im ganzen Käse wird α_{s1} -Casein stark abgebaut, während β -Casein nur in den äußeren Teilen stark abgebaut wird und nur wenig im Käsekern. Dies könnte an der Labmenge liegen, die im Bruch in größeren Mengen noch vorhanden ist. Die Labmenge, die im Bruch verweilt ist in Camembertkäsen viel größer als in anderen Käsen [Spinnler und Gripon, 2004].

Bei den Mischkäsen sind vor allem die α_{s1} - und β -Caseinbanden stark zu erkennen. Vor allem die β -Caseinbande ist stark vertreten, was an einer verminderten Plasminaktivität liegen könnte. Gesteigert werden würde die Plasminaktivität durch Pasteurisation der Milch, da es dann zu einer Inaktivierung von Plasmininhibitoren oder zur Erhöhung der Aktivität von Plasminogenaktivatoren kommen würde [McSweeney, 2004]. Die Aktivität von Endo- und Exopeptidasen von *Penicillium roqueforti* hängt von der Natriumchloridkonzentration ab, da bei einem niedrigeren Level die Schimmelkulturen schneller und früher wachsen können [Fox et al., 2004]. Die Hydrolyserate ist bei Blauschimmelkäsen am höchsten, da Caseine an mehreren Stellen und in höherem Ausmaß hydrolysiert werden. Vor allem Lab und Plasmin sind für den Abbau von α_{s1} - und β -Casein verantwortlich [Fox et al., 2004].

Die Blauschimmelproben zeigen innerhalb ihrer Gruppe verschiedene Bandenmuster. Die Proben 6 und 20 zeigen z.B. eine identische Bandenintensität. Ihre α_{s1} - und β -Caseinbanden sind stark ausgeprägt, was eine nicht sehr starke Proteolyse als Grund haben kann bzw. eine geringere Reifung als z.B. bei Probe 1, wo die Banden nur sehr schwach erkennbar sind, was eine intensive Proteolyse erwarten lässt. Bis zum Ende der Reifung ist fast das ganze α_{s1} -Casein verschwunden und auch das β -Casein ist nur mehr schwach erkennbar. Der Grund dafür sind die Proteinase der *P. roqueforti*-Kulturen [Larsen et al., 1998].

Bei den vier Gorgonzolaproben gibt es auch kein einheitliches Bild. Probe 7 und 22 weisen jedoch noch intensivere Banden auf und sind somit einer schwächeren Proteolyse ausgesetzt. Bei Probe 17 hingegen ist eine starke Proteolyse zu erkennen, da kaum Banden noch vorhanden sind. Die Urea-PAGE von Gorgonzola zeigte im Gegensatz zu anderen Blauschimmelkäsen einen intensiven Abbau von beiden

Caseinen, alpha_{s1}- und beta-Casein [Zampoutis et al., 1997], was auch bei den hier untersuchten Ureamustern gut erkennbar ist.

Die einzige Grünschimmelprobe weist eine starke Proteolyse auf, da die alpha_{s1}-, beta- und gamma₁-Caseinbanden fast komplett abgebaut sind. Das kann an der langen Reifung bzw. an der intensiven Proteolyse durch die Grünschimmelkulturen liegen.

Die beiden Roquefortsproben weisen ein ident schwaches Bandenbild auf, was auf eine sehr starke Proteolyse hindeutet.

Die einzige Weißschimmelprobe zeigt eine schwache Proteolyse und kann von der Bandenintensität her, mit den Mischkäsen verglichen werden. Vielleicht überwiegt die Weißschimmelkultur in den Mischkäsen, da ihre Banden ähnlich von der Intensität sind.

Peptidmuster (RP-UPLC)

Einen wichtigen Aspekt bei der während der Reifung entstehender Peptide, nimmt das Peptidmapping mittels UPLC ein.

In dieser Arbeit wurden die wasserlöslichen Extrakte (WSN) von Mischkäsen, Camemberts, Roqueforts, Gorgonzola, Blauschimmel-, Weißschimmel- und Grünschimmelkäse mittels UPLC untersucht, um mögliche charakteristische Veränderungen der einzelnen Käse untereinander feststellen zu können.

Peptide werden hierbei anhand von Hydrophobizitätsunterschieden chromatographisch getrennt, wodurch sich käsetypisch Peptidmaps (Fingerprints) ergeben.

Der Vorteil des UPLC Peptidmappings gegenüber der HPLC-Technik, liegt neben der möglichen Reduktion der Analysezeit, vor allem in der effizienten Trennung und verbesserten Auflösung, wodurch qualitativ hochwertige Peptidmaps erzielt werden können.

Die homogenen UPLC-Chromatogramme der Camembertkäse zeigen eine schwächere Proteolyseaktivität mit nur wenigen Peptiden im hydrophilen Bereich aber mehr im mittleren Bereich. Markant ist das Peptidmuster bei Minute 60-70, welches auch bei anderen Käsen, wie z.B. Mischkäsen oder bei zwei Blauschimmelkäsen zu finden ist.

Das Peptidmapping der Gorgonzolaproben weist auf eine hohe Proteolyseaktivität hin, da viele Peptide, vor allem im hydrophilen Bereich und weniger im hydrophoben Bereich zu erkennen sind. Alle Proben dieser Gruppe weisen auf vier markante Peakmuster (bei Minute 26-32, 41-47, 47-56 und 60-68).

Die beiden Roquefortproben zeigen ein sehr ähnliches, wenn nicht fast identes Chromatogramm. Die Proteolyse ist sehr fortgeschritten, da viele Peptide, besonders im hydrophilen Bereich, sichtbar sind. Markante Peakformationen finden sich im Bereich von Minute 25-32, 41-57 und 65-71. Der Bereich von 50-65 min. ist in dieser Form nur bei den Roquefortproben so zu sehen, was vielleicht auch an der Schafsmilch liegen könnte.

Die vier Proben der Mischkäse weisen eine geringe Proteolyseaktivität auf, da nur wenige Peptide im hydrophilen Bereich sichtbar, obwohl hier mit mehreren durch die Blauschimmelkultur gerechnet wurde. Drei Peakgruppen (bei Minute 23-30 und 55-58, welcher Ähnlichkeit mit dem von Gorgonzola zeigen; und im Bereich 62-70 min., welcher Ähnlichkeit mit dem von Camembert hat) fallen dennoch auf, da sie bei allen untersuchten Proben vorkommen.

Die einzige Weißschimmelprobe weist eine geringe Proteolyseaktivität mit einem ähnlichen Peptidmap wie bei den analysierten Camembertproben.

Die einzige Grünschimmelprobe weist eine relativ hohe Proteolyseaktivität. Das Peptidprofil ab Minute 65 ähnelt der von drei Gorgonzolaproben (7, 21, 22). Markant ist das Peptidmuster bei Minute 54-60.

Die Chromatogramme, der Blauschimmelkäse, weisen viele Peptide auf, welche durch die erhöhte Proteolyseaktivität entsteht (z.B. Probe 2). Die Blauschimmelgruppe bildet eine sehr heterogene Gruppe, da es selten ähnliche Peptid-Fingerprints gibt. Markant ist auch, dass sich bei einigen Peptidmapping die meisten Peaks im hydrophilen Bereich finden und bei anderen die Mehrheit im hydrophoben Bereich. Probe 1 hat auch eine einzigartige Peakformation am hydrophoben Ende, die nur bei ihr zu finden ist. Probe 4 und 19 sind sich von ihrem Fingerprint mit wenigen Peptiden und durch ihre Peakformation ab Minute 61-70, ähnlich. Bei Probe 9 fällt das Peakmuster bei Minute 55-60 auf, das Ähnlichkeiten mit dem der Mischkäse hat. Bei Probe 14 ist auch das Peptidprofil von Minute 60-70 sehr dem von Gorgonzola ähnlich. Bei Probe 16 hat das Peakmuster bei Minute 60-70 eine Ähnlichkeit mit dem der Camembertsproben.

Vergleich aller Proben

Gorgonzola weist eine hohe Proteolyse auf, da es sich um einen Blauschimmelkäse handelt, der durch eine längere Reifung gekennzeichnet ist. Diese Aussage wird das Peptidmapping, wo viele Peptide und auch hohe Peaks auftreten bekräftigen aber auch die hohen WSN/TN-Verhältnisse bestätigen das. Sowohl Urea-PAGE als auch SDS-PAGE zeigen nur schwache Caseinbanden.

Mischkäse sind durch eine geringe Proteolyse gekennzeichnet. Dies bestätigen die WSN-TN/TN-Werte und die Peptidmaps. Bei der SDS, sowie bei der Urea-PAGE sind starke Banden zu erkennen.

Die einzig untersuchte Weißschimmelkäseprobe zeigt die geringste Proteolyse und den geringsten WSN/TN-Wert. Es sind kaum Peptide als Peaks im UPLC-Chromatogramm sichtbar. Deshalb zeigen Urea und SDS sehr intensive Caseinbanden, da kaum ein Caseinabbau stattgefunden hat.

Der Grünschimmelkäse ist durch eine starke Proteolyse gekennzeichnet. Dies wird von allen vier Methoden bestätigt, da sowohl SDS- als auch Urea-PAGE schwache Caseinbanden aufzeigen und im Peptidmap eine starke Proteolyse erkennbar ist. Auch das WSN/TN-Verhältnis fällt höher aus.

Eine starke Proteolyse bei Roquefort wird durch alle vier Methoden aufgezeigt, da bei SDS- und Urea-PAGE kaum Banden vorhanden sind und die Peptidmaps zeigen viele hohe Peptide. Die WSN/TN-Verhältnisse sind außerdem die höchsten von allen analysierten Käsproben.

Die beiden PAGES von Camembert sind kontrovers, da sie nur schwache Banden zeigen, obwohl diese Käseart keine starke Proteolyse aufweist. Vielleicht liegt dies am fixierten Lab im Bruch, da keine Ansäuerung während der Drainage stattfindet. Dennoch passen aber die Peptidmaps und die WSN/TN-Verhältnisse gut zu einem Käse mit geringer Proteolyse.

Die Blauschimmelgruppe, die größte Gruppe, zeigt eine große Inhomogenität, da einige Proben eine starke Proteolyse aufweisen und andere eine geringe vergleichbar mit der von Camembert. Auch bei dieser Käsesorte ist die Proteolyse abhängig vom Salzgehalt und auch von der Aktivität von *Plasmin* und *Chymosin*. Die Caseine werden an mehreren Seiten und zu einer höheren Rate hydrolysiert [Fox et al., 2004]. Bei den PAGES wird dieser Zustand deutlich, da es sowohl Proben mit stärkeren Banden gibt aber auch Proben mit schwachen Banden. Das Gleiche gilt für die WSN/TN-Verhältnisse und für die Peptidmaps, die sehr unterschiedlich sind.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es die Proteolyse unterschiedlicher Schimmelkäse anhand von verschiedenen Methoden (UPLC-Peptidmap, Urea- und SDS-PAGE sowie Stickstoffbestimmung) zu ermitteln. Als Probenmaterial dienten 29 handelsübliche Schimmelkäseproben (6 Camemberts, 4 Mischkäse, 4 Gorgonzola, 2 Roqueforts, 8 Blauschimmelkäse, 1 Weißschimmelkäse und 1 Grünschimmelkäseprobe).

Die untersuchten Gorgonzolaproben weisen eine hohe Proteolyse auf, da es sich um einen Grünschimmelkäse handelt. Bestätigt durch das Peptidmapping, welches ein intensives Peptidprofil durch viele und hohe Peptide zeigt, aber auch durch das hohe WSN/TN-Verhältnis. Die zugehörige elektrophoretische Untersuchung (SDS-, Urea-PAGE) zeigt hingegen schwache Banden, was auf eine starke Proteolyse hinweist.

Mischkäse sind durch eine geringe Proteolyse gekennzeichnet. Dies bestätigen geringe WSN/TN-Verhältnisse und wenig intensive Peptidmaps. Bei der SDS- und Urea-PAGE sind hingegen starke Banden zu sehen.

Die einzig untersuchte Weißschimmelkäseprobe zeigt die geringste Proteolyse und folglich das geringste WSN/TN-Verhältnis. Im Fingerprint sind kaum Peptide zu sehen. Die Urea- und SDS-PAGE zeigen hingegen sehr intensive Caseinbanden.

Die einzige Grünschimmelkäseprobe ist durch eine starke Proteolyse gekennzeichnet, was durch die vier durchgeführten Methoden bestätigt wird.

Für Roquefort deuten alle vier Methoden auf eine starke Proteolyse hin, da bei SDS- und Urea-PAGE kaum Banden vorhanden sind, und die Peptidmaps viele hohe Peptide zeigen.

Bei Camembert zeigen die beiden PAGES mit den schwachen Banden jedoch kontroverse Ergebnisse für einen Käse mit schwacher Proteolyse. Dennoch passen aber die Peptidmaps und das WSN/TN-Verhältnis gut zu einem Käse mit geringer Proteolyse.

Die heterogene Gruppe der Blauschimmelkäse zeigt einige Proben mit einer starken Proteolyse und andere mit einer schwächern. Durch die SDS- und Urea-PAGE wird dieser Zustand durch die unterschiedliche Bandenintensität deutlich. Das WSN/TN-Verhältnis und die Peptidmaps sind dementsprechend auch verschieden. Zusammenfassend kann angemerkt werden, dass nur eine Methode alleine nicht ausreichen wird, um eine fundierte Aussage betreffend Proteolyse bzw. Reifungsgrad von Schimmelkäse machen zu können.

7. Abstract

The objective of this thesis was to characterize the degree of proteolysis intrinsic to various mould-ripened cheeses based on different analytical approaches such as the determination of both total (TN), and water-soluble (WSN) nitrogen, electrophoretic analyses (Urea- and SDS-PAGE), and peptide fingerprints (UPLC peptide mapping) typical for WSN fraction.

The analyzed sample set comprised 29 commercially retailed mould-ripened cheeses divided in: 6 Camembert, 4 mixed-mould ripened (blue and white), 4 Gorgonzola, 2 Roquefort, 8 blue-veined, 1 white-mould ripened and 1 green-mould ripened cheese.

As belonging to group of blue-veined cheeses, the analyzed Gorgonzola samples indicated a high degree of proteolysis. This extensive proteolysis was confirmed by intensively developed peptide profiles as well as high relative WSN ratio. The electrophoretic analyses by SDS- and Urea-PAGE indicated weak casein bands which also verified the advanced degree of proteolysis.

The mixed-mould ripened cheeses were characterized by a lower degree of proteolysis which was highlighted by both a low WSN/TN ratio and a less intense peptide fingerprint. Additionally, the corresponding electrophoretic analyses implied intensive casein bands. Moreover, also the analyzed white-mould ripened cheese exhibited a weak proteolysis, mainly highlighted by the low WSN/TN ratio and the less developed peptide fingerprint. However, for this cheese both PAGEs showed casein bands of low intensity.

The analyzed green-mould ripened cheese was characterized by strong proteolysis which was confirmed by all four methods. Additionally, also the two Roquefort cheeses implied a very high degree of proteolysis which was consistent throughout all performed analyses.

For the Camembert cheeses, electrophoretic analyses presented casein bands of low intensity, which is in some way controversial because this type of cheese ripening is normally associated with a weak proteolysis. Yet, the peptide fingerprints and the WSN/TN ratios fitted the pattern for cheeses with a lower degree of proteolysis.

The largest and the most heterogeneous group of all analyzed samples were represented by the blue-veined cheeses. Within this group, some cheeses exhibited an extensive while others deduced a weak degree of proteolysis. All this was highlighted by different intensities for the casein bands shown by SDS- and Urea-PAGE, various WSN/TN ratios as well as diverse peptide fingerprints.

In conclusion, it can be said that assessing the proteolytic processes in cheeses based on one method only, would most certainly not be sufficient to adequately characterize the degree of proteolysis of any kind of mould-ripened cheese.

8. Literaturverzeichnis

ARDÖ Y. Blue cheese. In: McSweeney (ed.) Cheese problems solved. 1. Edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, North America, 2007; 284-285.

ARDÖ Y., MEISEL H. Methods for direct measurement of peptide bond cleavage in cheese. In: International dairy federation (IDF): Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bulletin of the IDF 261, 1991; 29-34.

BALTES W. Lebensmittelchemie. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2000; 328-331.

BELITZ H.-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2001; 490-535.

BELITZ H.-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008; 517-529.

BELITZ H.-D., GROSCH W. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1992.

Bundesministerium für Gesundheit. Österreichisches Lebensmittelbuch, Codexkapitel/B32/Milch und Milchprodukte Abschnitt A, 4. Auflage, 2010; 12-37.

CANTOR M.D., VON DEN TEMPEL T., HANSEN T.K., ARDÖ Y. Blue cheese. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 2: Major Cheese Groups. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 175-198.

CHRISTENSEN T., BECH A., WERNER H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. International Dairy Federation (IDF): Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bulletin of the IDF 261, 1991; 4-9.

CHRISTENSEN T. et al. Udvikling af analyseprogram til karakterisering af proteolyse som udtryk for modning I ost. (Development of an analytic program for characterization of proteolysis as an index for cheese ripening.), Report of EEC-project No.1150/86-19.3 part B, 1989b; 5-48.

DUMAS-RIBADEAU B., GRAPPIN R. Milk protein analysis. Lait 69, 1989; 357-416.

EBERHARD P., BÜTIKOFER U., SIEBER R. Vitamine in gelagerter hochehitzter Milch. FAM-Eidg Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Bern, 2003, 3-5.

EIGEL W.N., BUTLER J.E., ERNSTROM C.A., FARRELL H.M. Jr., HARWALKAR V.R., JENNESS R., WHITNEY R. McL. Nomenclature of proteins of cow's milk. Journal of Dairy Science 67, 1984; 1599-1631.

ELMADFA I., LEITZMANN C. Ernährung des Menschen. 4. Auflage, Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 2004; 226-234.

FOISSY H. Spezielle Milchhygiene und -technologie. Skriptum, IBM-Verlag, Universität für Bodenkultur Wien, 2004 / 05; 1-32.

FOISSY H. Technologie der Milch. Skriptum, IBM-Verlag, Universität für Bodenkultur Wien, 2005; 1-3; 19-21, 91-93.

FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H. Cheese: An Overview. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1: General Aspects. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 1-18.

FOX P.F. Preface to the Second Edition. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1: General Aspects. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004.

FOX P.F. The milk protein system. Development in dairy chemistry-4, Elsevier, London, 1989; 1-54.

FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H. Rennets: Their role in milk coagulation and cheese ripening. In: Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, 1997.

FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H., COGAN T.M., GUINEE T.P. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1. General Aspects. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam 2004; 124, 394, 415, 419.

FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H., COGAN T.M., GUINEE T. P. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 2. Major Cheese Groups. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 157-198.

FRISTER H. Zusammensetzung der Milch. In: Volker Krömker Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 2007; 91.

FRISTER H. Qualitätssichernde instrumentell-analytische Erfassung der proteolytischen Käsereifung. Deutsche Milchwirtschaft 4, 1996; 169-173.

HAASNOOT W., STOUTEN P., VENEMA D.P. High-Performance Liquid Chromatography determination the extent of proteolysis in Gouda cheese. Journal of Chromatography 483, 1989; 319-329.

HANREICH L., ZELTNER E., MOHL R. Käsen leicht gemacht-120 Rezepte für die Milchverarbeitung. Leopold Stocker Verlag, Graz, 1995; 138-143.

HANSER S. Grundlagen zur chemisch-physikalischen und hygienischen Beschaffenheit von österreichischer Stutenmilch sowie deren Vermarktung. Diplomarbeit, Institut für Milchforschung und Bakteriologie, Universität für Bodenkultur, Wien, 1992.

HARPER W.J., LEE C.R. Residual coagulants in whey. Journal of Food Science 40(2), 1975; 282-284.

HEISS R. Lebensmitteltechnologie. 6.Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004; 24-27.

IWASAWA H., HIRATA A., KIMURA T., YAMAUCHI K. Proteolysis in camembert cheese during ripening. *Journal of Japanese Food Science and Technology* 43(6), 1996; 703-711.

JAKOB E. Genetischer Polymorphismus der Milchproteine. Die genetischen Varianten. *Schweizer Milchwirtschaftlich Forschung* 23, 1994; 3-11.

JARRET W.D., ASTON J.W., DULLY J.R. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 37, 1982; 55-58.

KÖLLER A. Vergleichende Untersuchung chemisch-physikalischer Parameter von Milch verschiedener Spezies. Diplomarbeit, Institut für Milchforschung und Bakteriologie, Universität für Bodenkultur Wien, 1992.

KUCHROO C.N., FOX P.F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37, 1982; 331-335.

LARSEN M.D., KRISTIANSEN K.R., HANSEN T.K. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for the production of blue veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 43, 1998; 215-221.

LAW B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: Fox P.F. (ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1: General Aspects. 1. Edition, Elsevier, New York, 1987; 365-392.

LOEFFLER K. Anatomie und Physiologie der Haustiere. 6. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1983.

MATTISEK R., STEINER G. Lebensmittelanalytik. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006; 87-92.

MEISEL H. Chemische Analyse des Reifungsverlaufes in Käse (Teil 1). Deutsche Milchwirtschaft 22, 1991; 690-692.

O'KEEFE A.M., FOX P.F., DAILY C. Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. Journal of Dairy Research 45, 1978; 97-107.

PARENTE E., COGAN T.M. Starter Cultures: General Aspects. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1: General Aspects. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 142

RIMACH G., MÖHRING J., ERBERSDOBLER H. F. Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010; 23-45.

ROHM H., JAROS D., ROCKENBAUER C., RIEDLER-HELLRIEGL M. Comparison of ethanol and trichloroacetic acid fractionation for measurement of proteolysis in Swiss-type cheese. International Dairy Journal 6, 1996; 106-107.

SCHLIMME E., BUCHHEIM W. Milch und ihre Inhaltstoffe-Chemische und physikalische Eigenschaften. 2. Auflage, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 1998; 68-76.

SPINNLER H.-E., GRIPON J.-C. Surface Mould-ripened cheese. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 2: Major Cheese Groups. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 157-174.

SPINNLER H.-E., LECLERCQ-PERLAT M.-N. White-mould cheese. In: McSweeney (ed.) Cheese problems solved. 1. Edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, North America, 2007; 268-269.

SPREER E. Technologie der Milchverarbeitung. 8. Auflage, Behr's Verlag-GmbH & Co. KG, Hamburg, 2005; 28-56; 427, 437.

MAYER H.K. Quality control of grated Parmesan products using an electrophoretic ripening index. Milchwissenschaft 52(8); 1997; 443-448.

MCSWEENEY P.L.H. How are cheese varieties classified. In: McSweeney (ed.) Cheese problems solved. 1. Edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, North America, 2007; 181.

MCSWEENEY P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology 57, 2004; 127-143.

MCSWEENEY P.L.H. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. Lait 77, 1997; 41-76.

MEHRENS H.A., REIMERDES E.H. Milchproteine, Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 1991.

ROHM H., JAROS D., MAYER H.K., FOISSY H., GINZINGER W., TSCHAGER E., ELISKASES-LECHNER F., OLS F. Rohmilchflora und Hartkäsequalität. Endbericht. Institut für Milchforschung und Bakteriologie, Universität für Bodenkultur Wien, Bundesanstalt für Alpenländische Milchwirtschaft Rotholz, 1997.

ROLLEMA H.S. Casein association and micelle formation. In: Fox P.F. Advanced Dairy Chemistry I: Proteins, Elsevier, Amsterdam, 1992; 111-140.

SOUSA M.J., ARDÖ Y., MCSWEENEY P.L.H. Advances in study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal 11, 2001; 327-345.

STRYER L. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, 1991.

SWAISGOOD H. Chemistry of the Caseins. In: Fox P.F. Advanced Dairy Chemistry I: Proteins, Elsevier, London, 1992; 63-110.

THOMPSON A., BOLAND M., SINGH H. Milk Proteins from Expression to food, 1. Edition, Academic Press, Amsterdam, 2008; 27-31.

UPADHYAY V.K., MCSWEENEY P.L.H., MAGBOUL A.A.A., FOX P.F. Proteolysis in cheese during Ripening. In: Fox (ed.) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1: General Aspects. 3. Edition, Elsevier, Amsterdam, 2004; 391-434.

VISSER S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. *Journal of Dairy Science* 76(1), 1993; 329-350.

WESTERMEIER R. *Elektrophoresis in practise*. 2. Edition, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997.

YVON M., CHABANET C., PELISSIER J.-P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solution. *International Journal of Peptide and Protein Research* 29, 1989; 166-176.

ZARMPOUTIS L.V., MCSWEENEY P.L.H., FOX P.F. Proteolysis in blue-veined cheese: An intervarietal study. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 36, 1997; 219-229.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Eva Baumann
Petri-Au 12
0650/ 86 35 605, evab6@gmx.at
17.09.1986
Graz, Österreich
ledig, kinderlos

Schulausbildung

Kindergarten Plüddemangasse von 1990-1993
VS Nibelungen von 1993/94-1996/97
AHS BG/BRG Lichtenfels von 1997/98-2004/05

Berufsausbildung, erworbener Abschluss

- höchster Abschluss: Matura
- Studentin der Ernährungswissenschaften

Berufskennntisse

- Ferialpraktikantin bei der GGW 2005, 2006, 2007, 2009
- Promotionarbeit beim Art & Fashion Team in Graz sowie in Wien
- Laborarbeit bei der Firma HYGIENICUM, Graz- Andritz 2007
- Laborarbeit bei der Firma HYGIENICUM, Graz- Andritz 2008
- Probenmanagement bei der AGES Graz 2009

Besondere Kenntnisse

- seit der ersten Klasse Gymnasium Englisch
- seit der dritten Klasse Gymnasium Französisch
- seit der fünften Klasse Gymnasium Latein
- seit der fünften Klasse Gymnasium Informatik
- seit WS 2008 Italienisch

weiterer Bildungsweg:

seit Oktober 2005 Studentin der Ernährungswissenschaften in Wien

Wien, im März 2010

