

Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und -hydrolysaten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
M. Sc. Dorotea Anna Barbara Ströbel
aus Osnabrück

Kiel, 2007

Dekan: Prof. Dr. Joachim Krieter
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Peter-Christian Lorenzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Schwarz
Tag der mündl. Prüfung: 19.07.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Problemstellung	1
2.	Theoretischer Teil	3
2.1.	Milch	3
2.1.1.	Milchproteine	4
2.1.1.1.	Zusammensetzung und Eigenschaften der Caseinfraktion	4
2.1.1.2.	Zusammensetzung und Eigenschaften der Molkenproteinfraktion	8
2.2.	Schäume im Lebensmittelbereich und Milchsäume	11
2.3.	Fraktionierungsverfahren für Milchproteine	17
2.3.1.	Fraktionierung von Caseinen	18
2.3.2.	Fraktionierung von Molkenproteinen	19
2.4.	Hydrolyse von Milchproteinen und Schaumbildung hydrolysierter Milchproteine	21
2.4.1.	Spaltstellen der Enzyme	26
2.4.1.1.	Trypsin (EC 3.4.21.4)	27
2.4.1.2.	Pepsin (EC 3.4.23.1)	32
2.4.1.3.	Alcalase	34
3.	Material und Methoden	36
3.1.	Proteinfraktionierung im Technikummaßstab	37
3.1.1.	Fraktionierung von Caseinen und Molkenproteinen aus Milch und Süßmolke mittels Membrantrennverfahren	37
3.1.2.	Fraktionierung von Caseinen aus Labcasein	37
3.1.3.	Fraktionierung von β -Casein aus Natriumcaseinat durch Mikrofiltration	38
3.1.4.	Fraktionierung von Molkenproteinen aus Molkenproteinisolat	38
3.1.5.	Fraktionierung von NPN-Substanzen aus Magermilch mittels Ultrafiltration	38
3.2.	Gewinnung von Proteasepräparationen aus <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	39
3.2.1.	Gewinnung von Milchsäureproduzierenden Organismen	40
3.3.	Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinfraktionen	40
3.3.1.	Enzymatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin im Technikummaßstab	40
3.3.2.	Enzymatische Hydrolyse von β -Lactoglobulin und β -Casein mit Trypsin, Alcalase und Pepsin im Labormaßstab	41
3.3.3.	Enzymatische Hydrolyse von Magermilch mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	41

3.3.4.	Hydrolysat-angereicherte Handelsproben	42
3.4.	Quervernetzung von Milchproteinen mit Transglutaminase	42
3.5.	Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate	43
3.5.1.	Aufschäumenanlage	43
3.5.2.	Drainage	45
3.5.3.	Schaumdichte	46
3.5.4.	Overrun	46
3.5.5.	Digitale Bildanalyse	46
3.5.6.	Oberflächenspannung	47
3.5.7.	Charakterisierung der Proteolysate mittels FPLC	48
3.5.8.	Charakterisierung der Proteolysate mittels HPLC	51
3.5.9.	Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate mittels SDS-PAGE	51
3.5.10.	Bestimmung von Trockenmasse, Lactose-, Eiweiß- und Aschegehalt	52
3.5.11.	Sensorische Untersuchungen	52
3.5.12.	Aminosäurenanalyse	53
4.	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1.	Proteinfractionierung	54
4.1.1.	Fraktionierung von Magermilchproteinen in Casein und Molkenproteine mittels Membrantrennverfahren	54
4.1.2.	Fraktionierung von Labcasein in β -Casein und α_S -/p- κ -Casein	55
4.1.3.	Verfahren zur partiellen Fraktionierung von Labcasein im Technikummaßstab	61
4.1.4.	Partielle Fraktionierung von Natriumcaseinat in β -Casein und α_S -/ κ -Casein mit Membranfiltration	65
4.1.5.	Fraktionierung von Molkenproteinisolat in β -Lactoglobulin einerseits und α -Lactalbumin, BSA und Immunglobuline andererseits	65
4.1.6.	Verfahren zur partiellen Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Technikummaßstab	72
4.1.7.	Anreicherung von NPN-Substanzen aus Magermilch mittels Ultrafiltration und partieller Lactosekristallisation	76
4.2.	Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinen	81
4.2.1.	Enzymatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat	81
4.2.2.	Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinfraktionen	90
4.2.3.	Bewertung der sensorischen Eigenschaften der Milchproteinfraktionen und Molkenproteinhydrolysate	104
4.3.	Schaumbildungseigenschaften	110
4.3.1.	Rekonstituierte Magermilch und Vollmilch	110
4.3.2.	Caseine und Caseinfraktionen	117
4.3.3.	Molkenproteine und Molkenproteinfraktionen	130
4.3.4.	NPN-Substanzen	135
4.3.5.	Einfluss einer Transglutaminasebehandlung auf die Schaumbildungseigenschaften verschiedener Milchproteinpulver	142
4.3.6.	Hydrolysate aus Molkenproteinisolat	146

4.3.7.	Hydrolysate aus β -Casein	160
4.3.8.	Hydrolysate aus β -Lactoglobulin	164
4.3.9.	Schaumbildungseigenschaften kommerzieller Hydrolysat-angereicherter Proben	172
4.3.10.	Hydrolysat von Magermilch mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	177
5.	Abschließende Bewertung	181
6.	Zusammenfassung	188
7.	Summary	191
8.	Literaturverzeichnis	199

Anhang

Gesamtübersicht der Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und -hydrolysaten, Ergebnisübersicht **A**

Abbildungswerzeichnis **E**

Tabellenverzeichnis **J**

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

Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
α -LA	α -Lactalbumin
β -LG	β -Lactoglobulin
β -LGF	β -Lactoglobulin-Fraktion
β -CF	β -Caseinfraktion
AFP	Acid fungal protease
Alc	Alcalase
Am	Amano N
AS	Aminosäure
BFEL-Kiel	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Kiel
Brm	Promod 184
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Chymotrypsin
CI1	Corolase L10
CMP	Caseinomakropeptid
CN	Casein-Stickstoff
Cpp	Corolase PP
DH	Hydrolysegrad (degree of hydrolysis)
E	Europe P2
E/S	Enzym-Substratverhältnis
Flz	Flavourzyme
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IG	Immunglobuline
MF	Mikrofiltration
MO	Milchsäureproduzierender Organismus
MPI	Molkenproteinisolat
Neut	Neutrase
n.m.	Nicht messbar, da Schaum zerfallen
NMWCO	Mittlere Trenngrenze (nominal molecular weight cut-off)
Nwf	Newlase F
P	Pepsin
P58	Promod 258
Pem	Pem
Per	Permeat
PI	Plasmin
Proteinkonz.	Proteinkonzentration
Px6	Protex 6L
Rek. MM	Rekonstituierte Magermilch
RET	Retentat
S. aur.	Staphylococcus aureus
SDS-Page	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SSA	Sulphur-Salicylsäure
Stab	Stabilität
SUP	Überstand (supernatant)
T	Temperatur
T	Zeit
Tr	Trypsin
UF	Ultrafiltration
UHT	Ultrahoherhitzt (Ultra high temperatured)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vfp	Validase FP

1. Problemstellung

Im Zuge der Internationalisierung der Lebensmittelmärkte ist es in den vergangenen Jahren zu einem erhöhten Angebot an Kaffeegetränken gekommen, die sich von dem herkömmlichen Kännchen Kaffee mit Milch und Zucker unterscheiden. Zu vielen dieser Getränke gehört als Markenzeichen der Milchschaum, der dem Kaffee- oder auch einem Teegetränk eine leichte, lockere und cremige Note verleiht. Zu den Getränken, die erst durch Milchschaum ihren Charakter erhalten, gehören Cappuccino, Latte Macchiato und Chai Latte. Sowohl für die Herstellung in der Gastronomie als auch für die Milchschaumproduktion zuhause sind Schaumstabilisatoren und Aufschlagmittel von Vorteil, um die Schaumbildung, die Haltbarkeit des Schaums über die Zeit des Genusses des Getränks und das Aussehen der Schäume zu verbessern.

Schäume sind Dispersionen aus einer kontinuierlichen (Flüssigkeit) und einer dispersen (Gas) Phase. Die Schaumbildungseigenschaften von Milch werden durch die enthaltenen Proteine und ihre Diffusionsgeschwindigkeit, ihrer Adsorption an der Grenzfläche, der Entfaltung ihrer Tertiärstrukturen an Grenzflächen und ihrer Vernetzung an der Grenzfläche bestimmt. Die Fähigkeit zur Schaumbildung gehört zu den technofunktionellen Eigenschaften, die Lebensmittel im Rahmen der Produktion, Lagerung und des Verzehrs beeinflussen. Die technofunktionellen Eigenschaften eines Proteins sind abhängig von Faktoren wie Molmasse, Aminosäurezusammensetzung und –sequenz, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, Oberflächenladung und effektive Hydrophobizität, sowie von produktionstechnischen Faktoren wie Rohstoffauswahl, Vorbehandlung, Herstellungsverfahren und milieubezogenen Faktoren wie beispielsweise Ionenart und –konzentration, Denaturierungsgrad und pH-Wert (Lorenzen, 2000b).

Milchprotein besteht zu 80% aus Casein und zu 20 % aus Molkenprotein. Die Proteine unterscheiden sich in Molmasse, Primär- und Sekundärstruktur und in ihren technofunktionellen Eigenschaften. Es wird diskutiert, ob die technofunktionellen Eigenschaften von Milchproteinfraktionen denen des Gesamt-Milchprotein- bzw. Casein- oder Molkenprotein-Komplexes überlegen sind (Rantamäki et al., 2000; Lorenzen, 2003). NPN-Substanzen, die in der Milch enthalten sind, könnten aufgrund der enthaltenen kurzkettigen Peptide und Aminosäuren die Schaumbildungseigenschaften beeinflussen (Nielsen, 1997).

Während in der Vergangenheit viele Untersuchungen an reinen Proteinen (Zhu und Damodaran, 1994; Dickinson, 1999; Damodaran, 2005) und ihren Hydrolysaten und in jüngster Zeit auch an Milch (Borcherding, 2004) durchgeführt worden sind, ist die Gewinnung und Verschäumung von Milchproteinen und Proteinfraktionen, die in Lebensmittelqualität im Technikummaßstab hergestellt worden sind, bisher kaum untersucht worden. Die Übertragung eines Verfahrens aus dem Labor- in den Technikummaßstab bis zur Produktion in großen Mengen führt oft zu veränderten Parametern im Prozessablauf mit entsprechenden Auswirkungen auf die technofunktionellen Eigenschaften der Produkte, die dem Umfang der Produktion angepasst werden müssen.

Die enzymatische Hydrolyse von Proteinen und die Schaumbildungseigenschaften von Proteinen werden in der Literatur positiv korreliert (Caessens, 1999; Tuergeon et al., 1991). Durch Fraktionierung von Hydrolysaten kann eine Zuordnung der Veränderung von Eigenschaften auf Peptide bestimmter Molmassenbereiche versucht werden. Der Einsatz von Hydrolysaten in Milch erscheint sinnvoll für die Lebensmittelindustrie zur Verbesserung von technofunktionellen Eigenschaften.

Aus diesem Zusammenhang heraus sollen in der vorliegenden Arbeit folgende aufeinander aufbauende thematische Bereiche untersucht werden:

1. Gewinnung von angereicherten Proteinfraktionen mit Lebensmittelqualität im Technikummaßstab
2. Enzymatische Modifizierung von Proteinen durch Hydrolyse und Quervernetzung
3. Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate sowie Prüfung der resultierenden Schaumbildungseigenschaften.

2. Theoretischer Teil

2.1. Milch

Milch ist das Drüsensekret der weiblichen Säugetiere. Es dient der Sicherung der Versorgung der Neugeborenen mit Nährstoffen (Lipide, Kohlenhydrate, Proteine, Wasser, Mineralstoffe) und Schutzstoffen (Immunglobuline, Lactoferrin, vitaminbindende Proteine) (Töpel, 2004).

Die Zusammensetzung von Milch ist abhängig von der Rasse, genetischen Variante, Lactationsstadium und Gesundheitszustand. Die Zusammensetzung der Milch schwankt auch durch äußere Einflüsse, beispielsweise durch Fütterungs- und Haltungsbedingungen oder die jahreszeitlich bedingten Schwankungen im Frischfutteranteil in den Sommer- und Wintermonaten (Schlimme und Buchheim, 1999; Töpel, 2004).

Milch ist nach Definition des Gesetzgebers das Gemelk einer oder mehrerer Kühe, somit wird der Begriff „Milch“ ohne weitere Herkunftsbestimmung im Sprachgebrauch und rechtlich der Kuhmilch gleichgesetzt (Schlimme und Buchheim, 1999). In Tab. 1 ist die durchschnittliche Zusammensetzung von Kuhmilch in unseren Breitengraden aufgeführt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird, wenn nicht anders gekennzeichnet, von Kuhmilch ausgegangen.

Tab. 1: Zusammensetzung von Kuhmilch, Mittelwerte in % (Schlimme und Buchheim, 1999)

	Durchschnittlicher Gehalt [%]	Schwankungsbreite der Zusammensetzung [%]
Wasser	87,0	87,0-89,0
Protein	3,3	2,5-6,0
Fett	4,2	2,0-7,0
Lactose	4,7	3,5-5,5
Asche	0,7	0,5-0,8

Hauptbestandteil der Milch ist Wasser, es dient als Lösungs- und Dispersionsmittel für die Inhaltsstoffe der Milch. Die Hauptkomponenten der Milch sind Milchproteine (Caseine und Molkenproteine), MilCHFett (Milchfettkügelchen bestehend aus Neutralfetten, Phospholipiden, Fettkügelchenhüllenprotein und fettlöslichen Vitaminen), Milchzucker (Lactose) und Milchsalze (Töpel, 2004).

2.1.1. Milchproteine

Die Proteine in Kuhmilch bestehen aus den beiden Hauptfraktionen der Caseine und der Molkenproteine. Definiert werden diese wie folgt (Töpel, 2004).

- *Caseine sind der bei pH 4,6 und 20°C unlösliche Milchproteinanteil.*
- *Molkenproteine sind die bei pH 4,6 und 20°C „löslichen“ Milchproteine.*

Die Bestandteile der Caseinfraktion sind in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, die Eigenschaften von Molkenproteinen werden in Kapitel 2.1.1.2 kurz erläutert.

2.1.1.1. Zusammensetzung und Eigenschaften der Caseinfraktion

Die Caseinfraktion der Milch setzt sich aus α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ -, und γ -Casein zusammen. Die einzelnen Gruppen können in verschiedene genetische Variationen unterschieden werden. Die Anteile der einzelnen Caseine an der gesamten Fraktion sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Proteine in der Kuhmilch (Walstra et al., 2006)

Fraktion	Milch [g/kg]	Protein [%]	Molmasse [g/mol]
Caseinfraktion	26	78,5	
α_{S1} -Casein	10,0	31	~23.600
α_{S2} -Casein	2,6	8	~25.200
β -Casein	9,3	28	23.983
κ -Casein	3,3	10	~19.550
γ -Casein	0,8	2,4	~20.500
Molkenproteine	6,3	19	
β -Lactoglobulin	3,2	9,8	18.283
α -Lactalbumin	1,2	3,7	14.176
Serumalbumin	0,4	1,2	66.267
Proteose-Pepton	0,8	2,4	4.000-40.000
Immunglobuline	0,8	2,4	150.000-900.000
Sonstige	0,8	2,5	
Lactoferrin	0,1		86.000
Transferrin	0,1		76.000
Membranproteine	0,6	2	~
Enzyme			~

α_{S1} -Casein besteht aus 199 Aminosäuren. Die Primärstruktur zeigt einen extrem polaren, sauren Abschnitt an den Aminosäureresten 45-89, der durch das Vorkommen mehrerer Phosphoserinreste zustande kommt und drei ausgeprägt apolare, hydrophobe Abschnitte an den Positionen 1-44, 90-113 und 132-199 (Wong et al., 1996). In Gegenwart von Ca^{2+} bildet

α_{S1} -Casein ein unlösliches Calciumsalz (Belitz et al., 2001; Töpel, 2004). Die Molmasse der genetischen B-Variante beträgt 23.614 g/mol. Die Primärstruktur der genetischen Variante A unterscheidet sich von der B-Variante dadurch, dass die Aminosäuren 14-26 im ersten hydrophoben Abschnitt fehlen. Die Varianten C und D unterscheiden sich von Variante A durch veränderte Aminosäuren an Position 192 und 53 der Primärstruktur (Variante C: Pos. 192 Gly, Pos. 53 Thr; Variante D: Pos. 192 Gly, Pos. 53 Ala). α_{S1} -Casein enthält 8,5% Prolinreste, eine Sekundärstruktur ist nicht zu erkennen (Wong et al., 1996).

α_{S2} -Casein besteht aus 207 Aminosäuren. Im Bereich des N-Terminus besteht eine Konzentration anionischer Gruppen, im Bereich des C-Terminus besitzt das Molekül viele kationische Gruppen. Wie α_{S1} -Casein ist es mit Ca^{2+} leicht fällbar, die Konzentration von Ca^{2+} in der Milch reicht dazu bereits aus (Belitz et al., 2001; Töpel, 2004). Vier genetische Varianten des α_{S2} -Caseins werden heute unterschieden, bei einigen früher festgestellten Varianten hat sich herausgestellt, dass diese aus Dimeren von genetischen Varianten bestanden (Wong et al., 1996).

β -Casein A1 besteht aus 209 Aminosäuren, man unterscheidet 7 genetische Varianten (A1, A2, A3, B, C, D, und E.). An Position 1-43 des Moleküls befindet sich ein stark negativ geladener, hydrophiler Teil mit fünf Phosphoserinresten, der übrige Teil des Moleküls (Position 44-209) ist hydrophob und reich an Prolin (geringe Sekundärstruktur, offenkettig). Von allen Caseinen ist es am besten in Wasser löslich (Belitz et al., 2001; Töpel, 2004). β -Casein ist ebenfalls sensitiv gegenüber Calcium-Ionen und mit diesen fällbar, bei niedrigen Temperaturen ($\leq 1^\circ C$) ist es jedoch als Calciumsalz in Wasser löslich (Belitz et al., 2001). Aufgrund des Vorkommens eines hydrophilen und eines hydrophoben Teils wird β -Casein als oberflächenaktiver angesehen als andere Caseine (Wong et al., 1996).

κ -Casein besteht aus 169 Aminosäuren. Es enthält im Gegensatz zu allen anderen Caseinen die Aminosäure Cystein und einen Kohlenhydratanteil, der aus drei bis sechs Molekülen der Verbindungen Galactose, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure besteht. Die Kohlenhydrate sind O-glykosidisch über Threonin in den Positionen 131, 133, 135 und 142 an das κ -Casein gebunden. Im Gegensatz zu den anderen Caseinen ist κ -Casein unempfindlich gegenüber Calcium und in der Lage, das zehnfache seiner eigenen Masse an anderen Caseinen gegenüber Calciumfällung zu schützen (Belitz et al., 2001). Die beiden genetischen Varianten A und B unterscheiden sich durch Austausch von Aminosäuren (Variante A: Pos. 136 Thr und Pos. 148 Asp; Variante B: Pos. 136 Ile und Pos. 148 Ala) (Wong et al., 1996).

Durch Hydrolyse mit Chymosin wird der mit Kohlenhydraten verbundene, hydrophile Teil abgespalten (Aminosäuren 106-169, Caseinomakropeptid oder Glykomakropeptid), und es entsteht ein hydrophober Teil (Aminosäuren 1-105, para- κ -Casein) (Wong et al., 1996). Caseinomakropeptid besitzt vielfältige physiologische Funktionen, z.B. die Eigenschaft, Cholera- und *Escherichia coli*-Enterotoxine zu binden und das Wachstum von Bifidus-Bakterien zu fördern (Brody, 2000).

Durch die Spaltung von β -Casein mit dem milcheigenen Enzym Plasmin (EC 3.4.21.7) entstehen Peptide, die in der Vergangenheit als γ -Caseine oder Proteose-Peptide bezeichnet

wurden. Nach neuerer Vereinbarung werden sie nach den Fragmenten bezeichnet (z.B. Alte Bezeichnung: γ_1 -Casein, neue Bezeichnung: β -Casein B-1P (f29-209)) (Töpel, 2004).

Der pH-Wert der Milch beträgt ca. 6,5-6,7 (Schlimme und Buchheim, 1999). Bei diesem pH-Wert liegen die Milchproteine negativ geladen vor. Der isoelektrische Punkt ist definiert als der pH-Wert, an dem Aminosäuren als dipolare Ionen vorliegen. Die Angaben in der Literatur über die isoelektrischen Punkte, d.h. die Punkte, an denen die Caseinfraktionen präzipitieren, sind heterogen (vgl. Tab. 3). Der isoelektrische Punkt von α_{S1} -Casein liegt nach der Literatur unter dem der anderen Fraktionen, die Angaben für κ -Casein sind heterogen (pH 4,1 bis 6,07). Für α_{S2} -Casein können nur zwei Autoren Werte angeben (vgl. Tab. 3), für β -Casein liegen die angegebenen Werte zwischen pH 5,00 und 5,85. Die isoelektrischen Punkte der Caseine spielen eine große Rolle bei der Fraktionierung, da durch Ausfällung am isoelektrischen Punkt verschiedene Proteine voneinander getrennt werden können.

Tab. 3: Isoelektrische Punkte der Caseinfraktionen

Literatur	α_{S1} -Casein	α_{S2} -Casein	β -Casein	κ -Casein
Walstra et al. (2006)	4,5	5,0	4,8	5,6
Töpel (2004)	4,9-5,0	5,2-5,4	5,1-5,5	5,4-5,6
Fox und McSweeney (2003)	4,88-4,97	5,23-5,45	5,07-5,46	5,61-5,9
Belitz et al. (2001)	4,92-5,35	-	5,20-5,85	5,77-6,07
Wong et al. (1996)	5,1	-	5,3	4,1

Die Caseine der Kuhmilch liegen weitgehend in micellarer Form vor. Die Caseinmicellen haben Durchmesser von 30-400 nm (durchschnittlich 120 nm, 10^8 g/mol (Kinsella, 1984)) und enthalten durchschnittlich 10^4 Caseinmoleküle sowie anorganische Bestandteile (hauptsächlich Calciumphosphat) und geringe Mengen anderer Proteine wie Proteose-Peptide und Enzyme (Walstra et al., 2006). Micellen enthalten viel Wasser (3,7g H_2O /1g Protein (Belitz et al., 2001)). Die einzelnen Moleküle werden von hydrophoben Bindungen (Calciumphosphatbindungen) und Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten (Belitz et al., 2001). Die Oberfläche der Micellen besitzt eine nicht glatte, leicht „haarige“ Struktur. Dies ist bedingt durch die κ -Casein-Moleküle, die sich eher im Randbereich der Micelle befinden und mit dem C-terminalen, hydrophilen Ende aus der Micelle herausragen, während das N-terminale Ende in der Micelle liegt und über Calcium- und Calciumphosphatbindungen den Zusammenhalt der Micelle garantiert (DeKruif und Holt, 2003).

Der Aufbau der Micellen und deren Struktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Der derzeitige Wissensstand weist auf einen Aufbau aus Submicellen, die über Calciumphosphatbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind, hin. Dieses Modell wurde von verschiedenen Autoren forciert (Walstra et al., 2006) und kritisiert (DeKruif und Holt, 2003).

Gestützt wird die Theorie der Submicellen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und dem Nachweis des Zerfalls der Micellen nach Entfernen des Calciums durch Bindung mit EDTA (Töpel, 2004).

Holt (1992) vertritt die Ansicht, dass die Micelle nur durch Interaktionen zwischen den Caseinmolekülen und Calciumphosphat zusammengehalten wird. Das „Holt-Modell“ (vgl. Abb. 1) geht davon aus, dass Calciumphosphat in Form von Nano-Clustern vorliegt und die Phosphorylreste die Interaktionspunkte der calcium-sensitiven Caseinmoleküle sind. Da α_{S1} - und α_{S2} -Caseinmoleküle mehr als zwei Bindungsstellen haben, können dreidimensionale Netzwerke zwischen den Clustern entstehen. Dieses Modell wurde von DeKruif und Holt (2003) verfeinert, sie gehen von einer mehr oder weniger homogenen Proteinmasse aus, die Calciumphosphat-Nanocluster enthält. Peptide dienen in diesem Modell als Verbindung zwischen den Calciumphosphat-Strukturen und verbinden so die Micelle.

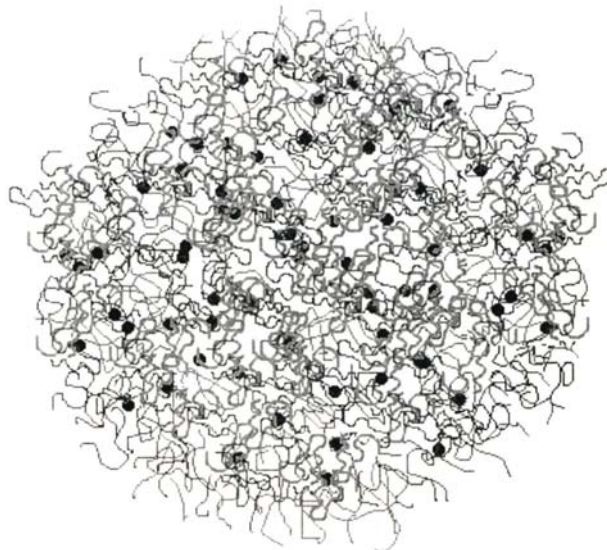


Abb. 1: Micellen-Modell nach Holt. Nanocluster-Partikel (•) und Polypeptidketten bilden eine Micelle (DeKruif und Holt, 2003)

Walstra (2006) vertritt die Ansicht, dass Caseinmicellen keine starren Strukturen besitzen, sondern auf Veränderung von Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke mit Veränderungen der Partikelverteilung und Proportion reagieren. Diese Änderungen sind nach Ansicht des Autors am leichtesten mit der Existenz von Submicellen zu erklären, auch das vollkommene Verschwinden der Micellarstruktur etwa eine Stunde nach dem Laben unterstützt diese Theorie.

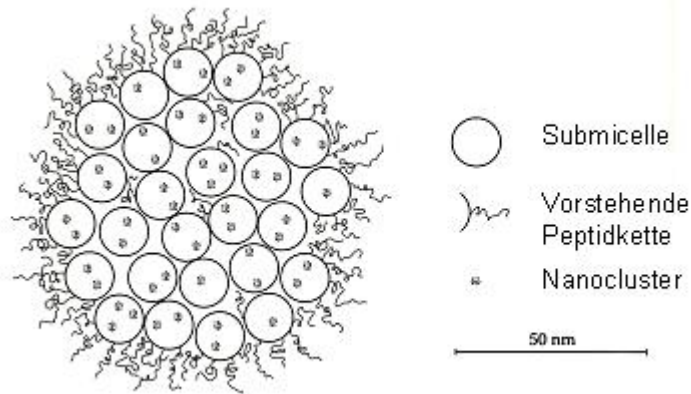


Abb. 2: Micellen-Modell nach Walstra (2006)

Beide Modelle werden von Horne (2006) als verworren und unrealistisch bezeichnet, da sie beide nachgewiesene Eigenschaften der Caseine (z.B. hydrophobe Interaktion zwischen Caseinen) vernachlässigten. Ein endgültiger Beweis für die Struktur der Caseinmicellen steht noch aus.

2.1.1.2. Zusammensetzung und Eigenschaften der Molkenproteinfraktion

Per Definition sind Molkenproteine die Proteine, die bei pH 4,6 und 20°C nicht ausfallen (Schlimme und Buchheim, 1999). Der Anteil an Molkenproteinen in Milch beträgt etwa 0,6 % (vgl. Tab. 2). Die Molkenproteinfraktion setzt sich aus α -Lactalbumin (α -LA), β -Lactoglobulin (β -LG), Blutserumalbumin (BSA), Immunoglobulinen und den Proteose-Peptonen zusammen (vgl. Tab. 2). Im Gegensatz zu den Caseinen, die in Frischmilch in micellarer Form vorliegen, haben Molkenproteine, mit Ausnahme der Proteose-Peptide, eine globuläre Form. Molkenproteine sind hitzeempfindlich und denaturieren bereits bei Temperaturen ab 70°C (Walstra et al., 2006), wobei die Tertiärstrukturen der globulären Molkenproteine entfaltet werden. Diese Reaktion kann nicht rückgängig gemacht werden, da die nun exponierten funktionellen Gruppen (-S-S-Gruppen und Thiolgruppen) inter- und intramolekular reagieren und die Wiederherstellung der originären Tertiärstruktur verhindern. Die Hitzedenaturierung ist erforscht: Die freie Thiolgruppe reagiert mit einer Disulphid-Gruppe, oft auch mit der eines anderen Moleküls und es bilden sich Aggregate (Walstra et al., 2006).

β -Lactoglobulin macht mengenmäßig den größten Teil der Molkenproteine aus (vgl. Tab. 2). Es besteht aus 162 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 18.277 g/mol (genetische Variante B). Es sind 5 genetische Varianten bekannt, die sich durch Abweichung einzelner Aminosäurereste in der Primärstruktur unterscheiden (Alexander et al., 1989; Wong et al., 1996). Die Sekundärstruktur von β -LG besteht zu 15 % aus α -Helix, 50 % β -Faltblattstruktur und 15-20 % β -turns (Haarnadelschleifen) (Wong et al., 1996). Aus der hohen Anzahl von β -turns ist eine globuläre Tertiärstruktur des Moleküls abzuleiten (Crawford et al., 1973). β -LG ist in Humanmilch nicht vorhanden (Schlimme und Buchheim, 1999).

Die Säurestabilität von β -LG ist hoch, erst bei pH-Werten unter 2 denaturiert das Protein. Es besitzt eine ellipsoide Form und existiert abhängig vom pH-Wert als Monomer, Dimer oder Octamer (vgl. Abb. 3) (Wong et al., 1996).

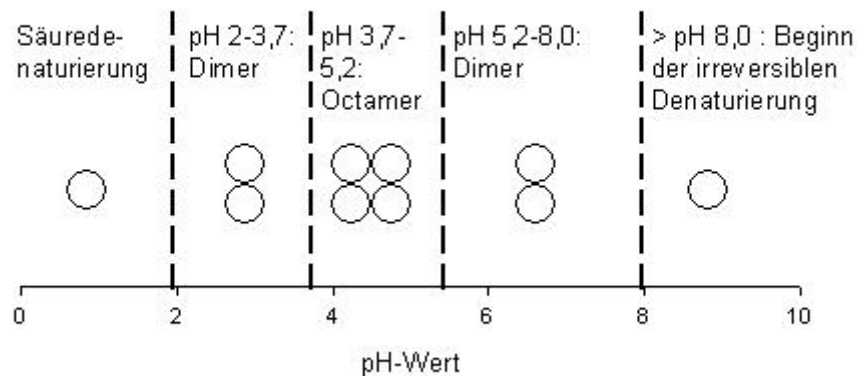


Abb. 3: Schematische Darstellung der Strukturänderungen von β -Lactoglobulin in Abhängigkeit vom pH-Wert (Wong et al., 1996; Gottschalk 2003)

α -Lactalbumin besteht aus 123 Aminosäuren mit einer Molmasse von 14.175 g/mol (genetische Variante B). Bis heute sind drei genetische Varianten bekannt. Rinder- α -LA kann auch in glykosylierter Form vorkommen (Schlimme und Buchheim, 1999). Das α -LA-Molekül hat eine ellipsoide Form und ist am isoelektrischen Punkt (pH-Wert 4-5) unlöslich. α -LA bindet Calcium, hat jedoch auch eine hohe Affinität zu anderen Metallionen (Zink, Mangan, Cadmium, Kupfer, Aluminium) (Wong et al., 1996).

Rinderserumalbumin kommt in der Milch nur in geringen Mengen vor (vgl. Tab. 2). Es tritt wahrscheinlich durch ungewollte Öffnungen aus dem Blut in die Milch über. Es ist ein großes Molekül im Vergleich mit den Caseinen und Molkenproteinen (Molmasse 66.267 g/mol) und besitzt viele funktionelle Gruppen (eine SH- und 17 Disulfidbindungen) (Walstra et al., 2006).

Immunglobuline sind Antikörper, die im Blut als Abwehrstoffe auf Antigene hergestellt werden. Sie sind große Glykoprotein-Moleküle heterogener Komposition. In Milch kommen vor allem die Immunglobuline A (IgA), G (IgG) und M (IgM) zur Immunisierung des Neugeborenen über die Ernährung vor. Die Immunglobuline G haben eine Molmasse von 150.000 g/mol, sie bestehen aus 4 Molekülketten, die über Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Anziehungskräfte zusammengehalten werden. IgM sind größere Moleküle (Molmasse 900.000 g/mol), die aus fünf IgG-ähnlichen Einheiten bestehen. Sie können gegen Polysaccharide durch Ausflockung angehen, z.B. gegen Bakterien oder Viren (Agglutination). Diese Reaktionen haben bei einem pH-Wert von 5,5 bis 7,0 ihr

Optimum. Bei niedrigeren Temperaturen als der Körpertemperatur (<37°C) präzipitieren einige Immunglobuline und sind nicht mehr funktionsfähig (Walstra et al. 2006).

Rinderlactoferrin erfüllt in der Milch die Funktion eines Eisenspeichers und Bakterieninhibitors (*Bacillus stearomophilus*, *Bacillus subtilis* u.a.). Durch die Entfernung eines Fe³⁺-Ions aus dem Bakterium wird es am Wachstum gehindert und die Wirksamkeit inhibiert. Das dem Bakterium entzogene Eisen kann gespeichert werden (Walstra et al., 2006; Wong et al., 1996). Lactoferrin ist gegen Proteolyse weitgehend unempfindlich. Mit Trypsin und Chymotrypsin können nur einige große Bruchstücke hergestellt werden, besonders in eisenbeladener Form ist Lactoferrin nur geringfügig hydrolisierbar. Es kann so den Magen und Dünndarm des Säugers unbeschädigt passieren und mögliche Aufgaben im Gastrointestinaltrakt wahrnehmen. In vivo-Beweise für die biologische Relevanz von Lactoferrin im Körper stehen derzeit noch aus (Lønnerdal, 2003).

2.2. Schäume im Lebensmittelbereich und Milchschaume

Schäume sind im Lebensmittelbereich vielfach vorhanden, viele Lebensmittel erhalten ihre charakteristischen Merkmale durch Schaum. Luftblasen enthaltende Lebensmittel sind seit Jahrhunderten bekannt (Bier, Baiser-Gebäcke) (Campbell und Mougeot, 1999). Schäume in Lebensmitteln sind sowohl in flüssiger Form (Getränke: z.B. Bier, Sekt und Schaumwein, Getränke mit Kohlensäure; Milchprodukte: z.B. geschlagene Sahne, Eiskrem, Pudding, Milchshake) als auch in getrockneter oder gegarter Form (Baiser, Soufflé, luftige Omeletts, Biskuits) vorhanden.

Die Einbringung der Luft geschieht auf sehr unterschiedliche Weise. Während in Bier die Luftblasen durch Fermentation mit Hefen entstehen, gibt es auch die Möglichkeit aufzuschlagen oder zu schütteln (Sahne, Milchshake), Luft einzukneten (Teig), Gas einzuleiten (Kohlensäurehaltige Limonaden), etc. (Campbell und Mougeot, 1999).

Für die Produktion von Milchprodukten werden verschiedene Methoden zur Einbringung von Luft verwendet. Sahne wird aufgeschlagen, Milchshakes werden geschüttelt oder aufgeschlagen, Sprühsahne wird durch die Einleitung von Gas (Stickstoff) verschäumt, Eiskrem wird unter Druck aufgeschlagen und Milchschaum wird aufgeschlagen (z.B. „Aerolatte“) oder durch Einleitung von Dampf verschäumt (Cappuccinomaschinen mit Dampfdüse).

Schäume sind Systeme, die aus zwei Phasen bestehen, dabei ist eine Phase (Luft) in der anderen Phase (Flüssigkeit) dispergiert. Ähnlich wie bei Emulsionen wird die Dispersion der unmischbaren Phasen durch Stoffe gestärkt, die die Dispergierung dieser beiden Phasen unterstützen. Dazu müssen diese Moleküle Strukturen besitzen, die sowohl einen hydrophilen Teil, der sich zur wässrigen Phase orientiert, als auch einen hydrophoben Teil, der sich der dispergierten Phase zuwendet, besitzen. Ähnlich wie ein Emulgator verhindert die schaumfördernde Substanz, dass sich die Dispersion in ihre Phasen trennt.

Die technofunktionellen Eigenschaften eines Proteins sind abhängig von proteinogenen Faktoren wie Molmasse, Aminosäurezusammensetzung und –sequenz, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, Oberflächenladung und effektive Hydrophobizität, sowie produktionstechnischen Faktoren wie Rohstoffauswahl, Vorbehandlung, Herstellungsverfahren und milieubezogenen Faktoren wie beispielsweise Ionenart und –konzentration, Denaturierungsgrad und pH-Wert (Lorenzen, 2000b).

Es ist in Bezug auf Schaumbildungseigenschaften wichtig, zwischen der Fähigkeit, einen Schaum zu bilden und der Fähigkeit zur Stabilisierung zu unterscheiden. Die Eigenschaft als Schaumbildner ist besonders durch die Fähigkeit gekennzeichnet, die Oberflächenspannung der flüssigen Phase zu senken um zu verhindern, dass diese den energetisch günstigsten Zustand mit der geringsten Oberfläche erreicht (Darewicz et al., 2000). Ein geeignetes Substrat muss in der Lage sein, aus der flüssigen Phase an die Grenzfläche zu gehen, durch Entfaltung die hydrophilen bzw. hydrophoben Gruppen zu exponieren und so die Grenzfläche zu vergrößern (Caessens, 1999a). Während β -Casein als sehr hydrophobes Casein und damit

als zur Schaumbildung geeignet gilt, ist die Stabilität eines mit β -Casein gebildeten Schaums nicht so hoch wie beispielsweise eines Schaums mit BSA (Phillips, 1981).

Der Stabilität des Schaums wirken die Destabilisierungsmechanismen entgegen (Darewicz et al., 2000; Prins, 1986):

- Koaleszenz: Der Begriff Koaleszenz beschreibt das „Zusammenwachsen“ von Luftblasen im Schaum, das Resultat ist eine geringere Anzahl von Luftblasen und eine Zunahme der Blasengröße. Koaleszenz wird bestimmt durch die Stabilisierung der Membran durch grenzflächenaktive Substanzen. In Milchschaum hat ein geringer Anteil an freiem Fett eine destabilisierende Wirkung auf die Lamellen durch eine filmverdünnende Wirkung. Wird die Lamelle zu dünn, kollabiert sie und die Blasen wachsen zusammen.
- Disproportionierung (Ostwald ripening): Der Begriff Disproportionierung beschreibt den Gastransport von kleineren Blasen durch die Lamelle in größere Blasen aufgrund des Konzentrationsgradienten, da die kleinere Blase einen höheren Innendruck besitzt als die größere. Die kleinere Blase wird dadurch noch kleiner, die größere Blase größer. Der Druckunterschied zwischen Außenseite und Innenseite wird größer und bewirkt, dass die kleine Blase vergeht.
- Drainage: Der Begriff Drainage beschreibt im Polyederschaum die Drainage der Flüssigkeit aus der Blasenlamelle als Resultat der Balance zwischen der Erdanziehungskraft und dem Kapillardruck.
- Creaming: Der Begriff creaming beschreibt das „Aufrahmen“ von Blasen, d.h. das Aufsteigen von Blasen aufgrund von unterschiedlichen Dichten in der dispersen und der stationären Phase.

Stoffe, die die Destabilisierung des Schaums verlangsamen, werden als Schaumstabilisatoren bezeichnet. Der Einsatz von Proteinen zur Erhöhung der Aufschlagfähigkeit als auch der Stabilisierung von Schäumen wird in der Literatur beschrieben (Caessens et al., 1997; Davies und Law, 1983; Davis et al., 2005; Kilara und Panyam, 2003).

Es werden zwei Arten von Schäumen unterschieden, einerseits der sog. Kugelschaum, der seinen Namen von der Kugelform der Blasen hat und andererseits der sog. Polyederschaum (vgl. Abb. 4). Wenn nur wenig Gas in einer Flüssigkeit dispergiert ist, so können die Blasen ihre optimale Kugelform annehmen (Prins, 1991).

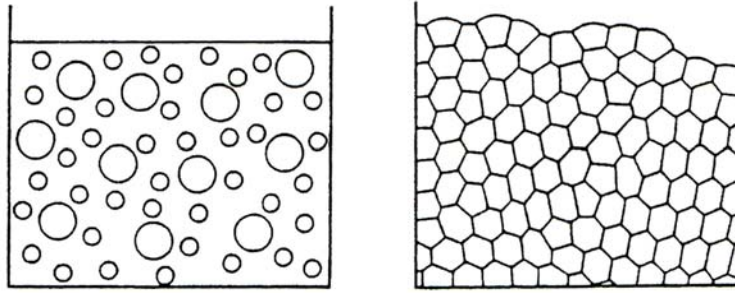


Abb. 4: Schematische Darstellung der Schaumarten Kugelschaum (links) und Polyederschaum (rechts) mit Honig-Waben-Struktur (Prins 1991)

Die energetisch optimale Form für Gasblasen ist rund, weshalb sie immer zur runden Form tendieren, wenn die Umgebung es zulässt (Campbell und Mougeot, 1999). Sobald die Blasenanzahl zunimmt und die Blasen direkt aneinander stoßen, werden sie in eine Polyederform gepresst (vgl. Abb. 5). Sie bilden eine honigwaben-artige Struktur aus. In einem idealen Polyederschaum stehen die Blasen in einem Winkel von 120° zueinander und in dem entstehenden Zwischenraum sammelt sich Flüssigkeit (Prins, 1991).

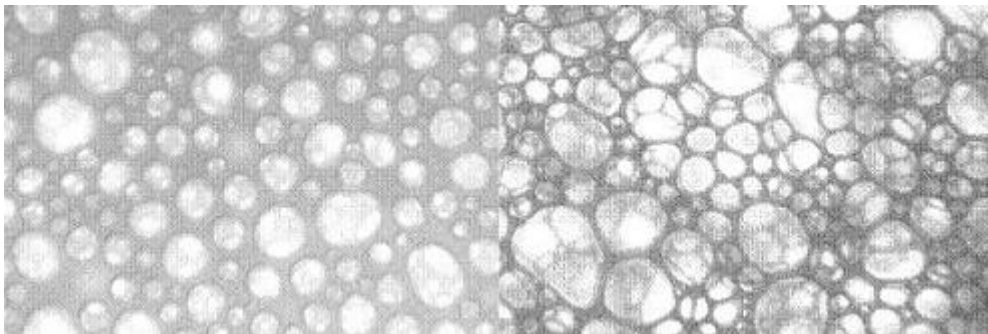


Abb. 5: Schaumarten: Kugelschaum aus Milch (links, frisch aufgeschlagen) und zum Polyederschaum tendierender Schaum (rechts, nach 20 Minuten). Eigene Aufnahmen.

Proteine als schaumfördernde und schaumstabilisierende Substanzen wurden bereits in der Mitte des letzten Jahrhunderts untersucht. Ansbacher et al. (1934) zeigten, dass in Schaum von Magermilch mehr stickstoffhaltende Bestandteile als in der Milchphase sind. Aufgrund des Gesetzes von Gibbs und Thomson, das besagt, dass sich alle Substanz, die Oberflächenspannung herabsetzt, an der Oberfläche versammelt, wurden die stickstoffhaltenden Substanzen der Milch als schaubildende Substanzen benannt (El-Rafey und Richardson, 1944).

Faktoren, die die Herabsetzung der Oberflächenspannung beeinflussen, sind Molmasse, Struktur, Ladung und die Verteilung der Ladung innerhalb des Moleküls sowie das Vorkom-

men von hydrophoben und hydrophilen Molekülteilen. Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Mediums spielen eine wichtige Rolle für die Eigenschaften des Proteins (Darewicz et al., 2000).

Das Protein richtet sich mit den eher hydrophoben Abschnitten in Richtung der Gasphase aus, die hydrophilen Teile orientieren sich zur wässrigen Phase des Schaums (Prins, 1991). Da die hydrophoben Abschnitte im globulären Milchproteinmolekül meist im Inneren des Moleküls liegen, müssen die Proteine entfaltet werden, um die Abschnitte an den Grenzflächen zu exponieren (Damodaran, 2005). Die Entfaltung des Proteins erfolgt nach der Diffusion und Adsorption an der Grenzfläche. Die Entfaltung ist abhängig von Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Proteinkonzentration. Bei hoher Proteinkonzentration kann die Grenzfläche schon vollständig von Proteinmolekülen besetzt sein, bevor es zu einer Entfaltung kommt (Walstra und de Roos, 1993). Flexible Proteine wie β -Casein adsorbieren schneller an der Oberfläche als globuläre (z.B. β -Lactoglobulin), da die Denaturierung und Auffaltung des globulären Proteins mehr Energie benötigt als die Auffaltung eines flexiblen Moleküls (Graham und Phillips, 1976). Eher lineare Moleküle wie β -Casein bilden einen Monolayer an der hydrophoben Grenzfläche aus. Globuläre Moleküle bilden ebenfalls eine monomolekulare Schicht aus, die Moleküle sind jedoch nicht vollständig entfaltet und bilden Interaktionen (elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoff- und Disulfidbrücken). Aus der Verbindung der globulären Moleküle ergibt sich eine höhere Stabilität des Schaums (Dickinson, 2003).

Dickinson (1999) beschreibt β -Casein und β -Lactoglobulin als bessere Schaumbildner als Ovalbumin oder Lysozym, gemessen am Schaumvolumen und der Feinheit der Blasen. Er begründet die höhere Schaumbildungskapazität der beiden Milchproteine mit deren Fähigkeit, die Ausdehnung der Grenzfläche zu unterstützen, indem sie sich an der neu entstandene Grenzfläche festsetzen.

Eine partielle Hitzedenaturierung kann bei Molkenproteinen die Schaumbildungsfähigkeit erhöhen, die Oberflächenhydrophobizität nahm in Untersuchungen von Zhu und Damodaran (1994) durch Hitzedenaturierung zu, wie auch der hydrophobe Charakter des Moleküls. Maximale Stabilität von Schäumen wird in der Studie durch die Erhöhung der Proteinpolymer erreicht.

Durch die Spaltung von intramolekularen Disulfidbindungen im BSA-Molekül wurde gezeigt, dass sich die Eignung als Schaumbildner deutlich verbessern kann. Ebenso ist die Ladung des Moleküls von Bedeutung: Mit der Änderung der pH-Werts kann sich die Eignung eines Proteins zur Schaumstabilisierung verändern (Damodaran, 2005).

Die Flexibilität des Moleküls spielt eine wichtige Rolle. Yu et al. (1991) und Damodaran (2005) untersuchten in einer Studie die Veränderung der Schaumbildungseigenschaften von BSA und fanden heraus, dass eine partielle Spaltung der Disulfidbindungen eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften hervorruft. Die dadurch entstandene Mischung aus Flexibilität und Steifheit scheint bei diesem Molekül gute Schaumbildungseigenschaften hervorzurufen.

Damodaran (2005) stellt einen Zusammenhang zwischen der Oberflächenhydrophobizität eines Proteins und dessen Eignung als Emulgator her, ein Zusammenhang zwischen hoher

Oberflächenhydrophobizität und der Eignung als Schaumstabilisierende Ingredienz kann jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr wird ein Zusammenhang zwischen der gesamten, d.h. der durchschnittlichen Hydrophobizität des Moleküls und dessen Eignung als Schaumstabilisator hergestellt (Townsend und Nakai, 1983).

Foegeding et al. (2006) sprechen der Oberflächenhydrophobizität eine große Rolle für die Eignung eines Proteins als Schaumbildner zu. Durch die oberflächliche Hydrophobizität würde sich das Molekül an der Grenzfläche ausrichten und durch diesen ersten Kontakt würde sich das Molekül entfalten und weitere hydrophobe Abschnitte in der Molekülstruktur freigeben (Graham und Phillips, 1979).

Die Eigenschaft vieler Proteine, die Oberflächenspannung deutlich herabzusetzen, wird von Foegeding et al. (2006) als eine der wichtigsten in der Beurteilung der Eignung von Proteinen als Schaumbildner betrachtet. Dabei ist für die Autoren nicht nur die absolute Verringerung der Oberflächenspannung von Bedeutung, auch die geringe Zeit, die Proteine benötigen, um die Gleichgewichtsoberflächenspannung herzustellen, ist von großer Bedeutung.

Das Vorhandensein von Kohlenhydraten, Fetten und sonstigen Milchinhaltstoffen in der Lösung, die zu Schaum aufgeschlagen wird, beeinflusst die Schaumstabilität. Phospholipide konkurrieren mit den Proteinen an der Grenzfläche. Aufgrund der Neutralisierung der Proteine durch Ionen ist eine Erhöhung der Ionenstärke der Schaumbildung nicht förderlich. Die Proteine bilden mit den Ionen Aggregate und die Disproportionierung wird beschleunigt. Zucker erhöhen die Stabilität von Schäumen durch eine Erhöhung der Viskosität der Lösung, die Schaumbildung wird durch das Vorhandensein von Zuckern in der Lösung nicht verbessert (Damodaran, 2005).

Zur Verschäumung der Proteine werden verschiedene Methoden verwendet. Roman und Sgarbieri (2006) verwenden einen Shaker und transferieren den Schaum nach dem Schäumen in einen Messzylinder. Drainage und Overrun werden gemessen, die Schaumstabilität wird nach Patel et al. (1988) bestimmt. Nachteile dieser Methode sind die Vernachlässigung der Tatsache, dass sich Schäume an der Glaswand des Zylinders länger halten als mittig, eine Volumenmessung erscheint dadurch ungenau und die Zeit, die bis zur ersten Messung vergeht (Transfer des Schaums), wird nicht beschrieben.

Waniska und Kinsella (1979) entwickelten einen Apparat zum Aufschäumen von Lösungen durch Einleitung von Gas (Stickstoff). Dieses Verfahren der Aerationmethode nutzen auch andere Autoren (Martin-Diana et al., 2006; Trziszka, 1986; Yankov und Panchev, 1996; Yu und Damodaran, 1991). Andere Autoren nutzen diesen Apparat mit Luft (Borcherding, 2004; Townsend und Nakai, 1983). Sie messen die zeitabhängige Entstehung und/oder den zeitabhängigen Zerfall von Schaum.

Caessens et al. (1997) erzeugten den Schaum von Hydrolysatlösungen mithilfe eines Flügelrades. Gemessen werden Overrun und Stabilität (Volumen nach 15 bzw. 60 Minuten). Da die Proteine nicht in wässriger Lösung sondern in Puffer mit Natriumchlorid angesetzt wurden, sind die Ergebnisse auch nur mit Ergebnissen von Versuchen mit ähnlichen Systemen vergleichbar.

Davis et al. (2004) nutzt zur Charakterisierung von Molkenproteinisolat-Schäumen einen Küchenmixer. Neben der Messung der Oberflächenspannung der Lösungen wurden rheologische Messungen durchgeführt, in deren Ergebnissen starke Diskrepanzen festgestellt wurden. Ähnliche Mixgeräte werden ebenfalls von Luck et al. (2001) und Pernell et al. (2002) benutzt.

Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Aufschäumverfahren sind die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse nur in der Tendenz vergleichbar, absolute Werte sind zwischen den Studien kaum vergleichbar.

Borcherding (2004) entwickelte einen Messplatz zur Charakterisierung von Milchsäumen, der sich der Aerationmethode mittels Luft zum Aufschäumen von Milch bedient. Die Methodik zum reproduzierbaren Aufschäumen von Milch zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass kaum mechanische Energie eingebracht wird. Die Adsorption der Proteine ist also prinzipiell von ihrer Grenzflächenaktivität abhängig.

2.3. Fraktionierungsverfahren für Milchproteine

Fraktionierungsverfahren dienen der Trennung von Milchproteinen in ihre Fraktionen. Das Interesse an den Milchproteinfraktionen begründet sich in den gegenüber dem Proteinkomplex variierenden Eigenschaften der Milchproteinfraktionen. Die einzelnen Milchproteine unterscheiden sich untereinander in ihren chemischen (z.B. isoelektrischer Punkt, Hydrophobizität) und technofunktionellen (z.B. Wasserlöslichkeit, Emulgierverhalten, Wasserbindung) Eigenschaften. Um diese Eigenschaften durch Einsatz in Lebensmitteln auszunutzen, sind möglichst reine Fraktionen notwendig, die in Lebensmittelqualität im Technikummaßstab hergestellt werden können.

Der allgemein andauernde Trend zu Lebensmitteln mit gesundheitsfördernder Wirkung, sog. „Functional Food“, führt zu steigender Nachfrage nach funktionellen Stoffen und effektiven und kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser Substanzen. So wirkt β -Lactoglobulin z.B. antioxidativ und Retinol-bindend, α -Lactalbumin antikanzerogen und Lactoferrin und Laktoperoxidase antimikrobiell (Roos und Schrezenmeir, 2006). Sowohl aus Caseinen als auch Molkenproteinen lassen sich Peptide herstellen, die bioaktive Funktionen im Körper haben. Sowohl schützende als auch verdauungsregulierende Wirkungen sind in Studien nachgewiesen worden (Korhonen, 2002; Silva und Malcata, 2005).

Die geschichtlich ältesten Verfahren zur Fraktionierung von Milchprotein sind die Labgerinnung und die Säuregerinnung. Sie werden seit Jahrhunderten zur Trennung der Molkenproteine von den Caseinen eingesetzt. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Gewinnung von Casein, das als Rohstoff für die Käse- und Quarkherstellung eingesetzt wurde. Das Verfahren der Labfällung wird in der Käsebruchherstellung eingesetzt, durch Labung werden Caseine von den Molkenproteinen und Caseinomakropeptid getrennt. Da die Caseine bei diesem Vorgang koagulieren und die Molkenproteine in die flüssige Phase übergehen, ist eine Trennung in Casein einerseits und Süßmolke (Molkenproteine und Caseinomakropeptid) andererseits möglich (Töpel, 2004).

Die Herstellung von Sauermilchprodukten beruht auf Milchsäurefermentation mit Milchsäurebakterien (z.B. die Gattungen *Lactobacillus* und *Lactococcus*). Die Milchsäurebakterien stellen bei der Verstoffwechslung von Lactose Milchsäure her, die sie abgeben und so den pH-Wert absenken. Bei einem pH-Wert von 4,6 koagulieren die Caseine und können von der entstehenden Sauermolke getrennt werden (Belitz et al., 2001).

In den letzten Jahrzehnten wurden Membrantrennverfahren zur Trennung von micellarem Casein und von nativem Molkenprotein entwickelt, die heutzutage eingesetzt werden. Membrantrennverfahren zeichnen sich durch die großen Mengen, die verarbeitet werden können, aus. Aufgrund der unterschiedlichen Molmasse und Tertiärstruktur können Proteine unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden (vgl. Tab. 4). Durch Mikrofiltration von Magermilch ist es möglich, „native“ Caseinkonzentrate herzustellen (Porengröße (NMWCO) 0,1 μ m) (Kersten und Henrichs, 2000; Schlimme und Buchheim, 1999).

Tab. 4: Relative Größe und Molmasse verschiedener Partikel in Milch (verändert nach (Vivekanand et al., 2004))

Protein	Größenordnung [μm]	Molmasse
Casein Micelle	0,03-0,3	400.000-2.000.000
α -Lactalbumin	0,003-0,006	14.147
β -Lactoglobulin	0,003-0,006	18.362
Rinderserumalbumin (BSA)	0,003-0,006	69.000
Immunglobuline	0,005-0,01	150.000-900.000
Lactoferrin	0,009	78.000

Bei der Mikrofiltration von Magermilch wird im Permeatstrom die so genannte „Ideale Molke“ gewonnen. Sie enthält kein Caseinomakropeptid und besitzt eine hohe Reinheit an Molkenproteinen (Bacher und Königfeldt, 2000). Aufgrund der Reinheit wird sie als ideales Ausgangsmaterial für die weitere Fraktionierung von Molkenproteinen angesehen (Maubois et al., 2001).

2.3.1. Fraktionierung von Caseinen

Caseinfraktionen können durch Membranverfahren nicht getrennt werden, weil die Unterschiede in der Molmasse zu gering sind. Die Trennung einzelner Caseinfraktionen voneinander kann durch chromatographische Methoden erfolgen. Sowohl durch Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie als auch durch Chromatographie nach Hydrophobizität kann die Trennung in die einzelnen Caseine erfolgen (Syväoja, 1992). Nachteil der chromatographischen Methoden sind die geringen Mengen, die mit hohem Kostenaufwand hergestellt werden und die Verwendung von Puffern und Laufmitteln, die für den Einsatz im Lebensmittel nicht geeignet sind. Die Entwicklung von chromatographischen Verfahren, die lebensmitteltaugliche Laufmittel verwenden, kann nicht über den geringen Umfang einer dertartigen Produktion hinweghelfen (Turhan et al., 2003).

Zur rein physikalischen Anreicherung von β -Casein einerseits und der übrigen Caseine andererseits sind in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben worden. Viele Verfahren zur Anreicherung von β -Casein beruhen auf dem Prinzip, dass β -Casein in Milch bei kalten Temperaturen (0-5°C) teilweise in nicht-micellarer Form vorliegt und aus den Micellen in Lösung gehen kann (Downey und Murphy, 1970). Pierre und Brule (1981) beschreiben, dass der Teil des β -Caseins, der in Lösung geht, nur durch hydrophobe Bindungen an die Micellen gebunden ist, im Gegensatz zu dem über Phosphoserinbrücken gebundenen β -Casein. Durch Kühlung (<5°C) werden die hydrophoben Bindungen gelöst, ein Teil des β -Caseins (etwa 7% des gesamten Caseins) geht in das Milchserum. Es entsteht ein Gleichgewicht zwischen dem gelösten und dem über Phosphoserinbrücken gebundenen Casein, das sich in Richtung des gelösten Caseins verschiebt, wenn die Proteinkonzentration abnimmt (Downey und Murphy, 1970).

Das von Ward und Bastian (1996) entwickelte Verfahren zur Gewinnung von β -Casein geht von der Ausgangssubstanz Calciumcaseinat aus, das durch Lab gefällt, gekühlt und zentrifugiert wird. Der Überstand wird auf 30°C gewärmt, um β -Casein zu präzipitieren. Die Ausbeute betrug abhängig von der Kühlzeit 55-58,5%, im Technikumversuch nahm sie stark ab (keine Zahlen vorhanden). Die Reinheit wird über Aminosäurenanalyse erfasst und nicht prozentual gekennzeichnet, jedoch als sehr rein bezeichnet.

Pouliot et al. (1994) gewinnen mit einer ähnlichen Methode 90% des enthaltenen β -Caseins (Ausbeute) in angereicherter Form, die Reinheit liegt aber nur bei 48% β -Casein.

LeMagen und Maugas (1991/1995) ließen sich eine Methode patentieren, die auf der Dissoziation von β -Casein aus der Micelle bei kühlen Temperaturen beruht. Das Verfahren geht von Labcasein aus. Nach Suspension des Labcaseins wird die Suspension gekühlt und gesäuert. β -Casein bleibt im flüssigen Anteil, während α _S-Casein und κ -Casein ausfallen. Anschließend erfolgt ein Dekantier- oder Zentrifugationsschritt, das β -Casein aus der flüssigen Phase wird durch Gefriertrocknung gewonnen. Dieses Verfahren erscheint aus lebensmitteltechnologischer Sicht am sinnvollsten, da hier mit geringem Aufwand (einzige Zutaten: Säure, Lauge und Lab) große Mengen verarbeitet werden können.

Huppertz et al. (2006) entwickelten ein Verfahren, das auf die Suspension von Labcasein durch die Zugabe von Lauge verzichtet. Die Gewinnung erfolgt durch Inkubation der Suspension bei kühlen Temperaturen und anschließender Zentrifugation. Durch anschließende Gefriertrocknung wird das β -Casein gewonnen. Die Ausbeute beträgt lediglich 20% des β -Caseins in Milch.

Ein Verfahren zur β -Casein-Gewinnung mittels Ultrafiltration wurde von Murphy und Fox (1991) veröffentlicht. Durch Ultrafiltration bei niedrigen Temperaturen wird das dissoziierte β -Casein von dem micellaren Casein getrennt. Nach anschließender pH-Wert-Einstellung und Gefriertrocknung kann das β -Casein erhalten werden. Die Ausbeute von 14% wird von den Autoren als zu niedrig eingestuft, um eine industrielle Herstellung und Verwendung attraktiv zu machen.

2.3.2. Fraktionierung von Molkenproteinen

Die im Lebensmittelbereich technologisch nutzbaren Verfahren zur Fraktionierung von Molkenproteinen basieren darauf, dass eine der Majorfraktionen (α -Lactalbumin oder β -Lactoglobulin) ausgefällt oder hydrolysiert wird, wohingegen die andere in Lösung verbleibt.

Die Peptische Hydrolyse von α -LA ist eine Verfahrensweise, die zu relativ reinem β -LG führt. Während natives β -LG gegen die Hydrolyse mit Pepsin resistent ist, wird α -LA hydrolysiert. Durch Ultrafiltration kann β -LG von den entstandenen Peptiden getrennt werden (Konrad et al., 2001; Konrad und Lieske, 1997).

Pearce (1983) entwickelte ein Verfahren zur Fällung aller Molkenproteine mit Ausnahme von β -LG. Das Verfahren beruht darauf, dass α -LA eine höhere Affinität zur Aggregatbildung mit Serumalbumin (BSA) und den Immunglobulinen (IG) aufweist als β -LG. Die Aggregation

beginnt bereits ab 55°C, obwohl die Denaturierungstemperatur des α -LA mit ungefähr 65°C angegeben wird. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass eine Säuerung auf pH 4,2 (pI α -La 4.2-4.8) und eine Erhitzung auf 55°C für maximal 30 Minuten ausreichen müssten, um eine partielle Fraktionierung in Aggregaten aus α -Lactalbumin, Blutserumalbumin und Immunglobulinen einerseits und löslichem β -Lactoglobulin andererseits zu erzielen. Das von Pearce (1983) beschriebene Verfahren wurde von Outinen et al. (1996) mit anderen Verfahren zur Molkenproteinfraktionierung verglichen. Die hohe Reinheit der β -LG-Fraktion wurde als Vorteil des Verfahrens eingeschätzt, die Gewinnung des α -LA als aufwändig eingestuft. Die Eigenschaften der Produkte α -LA und β -LG aus den verglichenen Verfahren wurden ebenfalls von finnischen Forschergruppen untersucht (Rantamäki et al., 2000; Tossavainen et al., 1998). Dabei wurde festgestellt, dass das Verfahren nach Pearce (1983) die Schaumbildungseigenschaften der Fraktionen positiv beeinflusst.

Während Pearce (1983) als Ausgangsmaterial Käsemolke benutzt, favorisieren Maubois et al. (2001) das Permeat aus der Mikrofiltration von Magermilch, das sie auch als „Ideale Molke“ bezeichnen, als Ausgangsprodukt. Aufgrund der geringen Vorbehandlung und geringen chemischen Veränderungen z.B. durch *Maillard*-Reaktion erscheint es den Autoren als das geeignetste Material zur Fraktionierung. Die Ausbeute an „Idealer Molke“ ist bei der Mikrofiltration von Magermilch geringer als die von Caseinkonzentrat. Der Aufwand der Herstellung ist hoch. Der Einsatz der „Idealen Molke“ als Ausgangsmaterial ist zukünftig nur dann sinnvoll, wenn das Caseinkonzentrat in der Käseherstellung eingesetzt werden kann. In diesem Falle wäre die Gewinnung von Fraktionen aus dem „Abfallprodukt“ der Caseingewinnung sinnvoll.

Die Verwendung von Molkenproteinkonzentrat und Molkenproteinisolat zur Fraktionierung von Molkenproteinen führt im Vergleich mit Molke zu besseren Präzipitierungsergebnissen (Lucena et al., 2007). Aufgrund der höheren Proteinkonzentration kann das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die geringe Präzipitatemenge bei Molke erschwert den Trennvorgang zwischen den Phasen und erscheint deshalb als ungeeigneteres Ausgangsmaterial.

2.4. Hydrolyse von Milchproteinen und Schaumbildung hydrolysierter Milchproteine

Enzyme sind Biokatalysatoren. Alle bisher isolierten Enzyme gehören zur Stoffklasse der Proteine. Sie bewirken eine Verminderung der Aktivierungsenergie der von ihnen katalysierten chemischen Reaktion. Sie beschleunigen die Gleichgewichtseinstellung, sind jedoch ohne Einfluss auf die Gleichgewichtslage.

Enzyme werden nach der Reaktion, die katalysiert wird, in sechs Klassen eingeteilt. Proteolytische Enzyme, also Enzyme die Peptidbindungen spalten, gehören zur Klasse der Hydrolasen. Man unterscheidet Exopeptidasen, die Proteinketten vom Ende angreifen und einzelne Aminosäuren oder Dipeptide abspalten und Endopeptidasen (Peptidasen), die Peptidbindungen angreifen, die nicht am Ende einer Peptidkette liegen (Belitz et al., 2001). Zur Gewinnung von Peptiden unterschiedlicher Kettenlänge werden Endopeptidasen verwendet.

Eine weitere Unterscheidung erfolgt über eine Unterteilung nach den Gruppen im aktiven Zentrum. Serinpeptidasen besitzen im aktiven Zentrum einen Serin- und einen Histidinrest, sie sind in einem pH-Bereich von 7-11 aktiv. Zu dieser Gruppe gehören Chymotrypsin A, B und C, α - und β -Trypsin, Plasmin und einige durch Bakterien und Pilze produzierte Enzyme (z.B. Subtilisin Carlsberg aus *B. licheniformis*). Cysteinpeptidasen besitzen im aktiven Zentrum einen Cysteinrest. Ihr Aktivitätsbereich liegt zwischen pH-Werten von 4,5 bis 10, das Optimum bei pH 6 bis 7,5. Cysteinproteinasen sind z.B. Papain und Bromelain. Asparaginproteasen besitzen Asparaginsäurereste im aktiven Zentrum. Das pH-Optimum kann im stark sauren Bereich (z.B. Pepsin, pH 2 bis 4) oder im schwach sauren bis neutralen Bereich liegen. Metallhaltige proteolytische Enzyme sind im Bereich von pH 6 bis 9 wirksam und ihre Spezifität ist gering. Die zu dieser Gruppe zählenden Enzyme (z.B. Prolidase und Prolinase) enthalten Zn^{2+} oder Mn^{2+} im aktiven Zentrum (Belitz et al., 2001).

Die Proteolyse von Milchproteinen ist für die Schaumbildung interessant, da durch die Spaltung der Peptidketten der Milchproteine mittel- und kurzkettige Peptide entstehen. Durch die Hydrolyse von Proteinen wird die Molmasse herabgesetzt. Durch die Spaltung der Proteinmoleküle wird eine Veränderung in der Tertiärstruktur herbeigeführt und es kommt zur Exposition hydrophober Gruppen globulärer Proteine. Die Löslichkeit und die Grenzflächenaktivität des Proteins werden verändert, wodurch sich ein verändertes Schaumverhalten der Peptide im Vergleich zum Ausgangsmaterial ergibt (Caessens et al., 1997). Es wird angenommen, dass Peptide ab einer bestimmten Kettenlänge (>20 AS) bessere Grenzflächeneigenschaften haben als kurzkettige Peptide (Turgeon et al., 1991; Turgeon et al., 1992). Aufgrund der Unterschiede der von den Autoren genutzten Verschäumungsmethoden, die die Hydrolyse von Milchproteinen untersuchen, ist es schwierig diese zu vergleichen. Caessens (1999a) zieht aus den bisher erfolgten Studien den Rückschluss, dass für die Schaumbildungsfähigkeiten des Hydrolysats das eingesetzte Enzym und damit die entstandenen Peptide entscheidend sind. Eine limitierte Hydrolyse ist nach Ansicht der Autorin sinnvoll, da die Peptide eine Größe von 2.000 bis 5.000 g/mol besitzen sollten. Die Hydrolyse ist bei Molkenproteinen aussichtsreicher, da die hydrophoben Gruppen globulärer Proteine mittels Hydrolyse exponiert werden (Turgeon et al., 1991; Turgeon et al., 1992).

Die Hydrolyse von Proteinen ist ein weit verbreitetes Mittel um die Schaumbildungseigenschaften zu verbessern (Davis et al., 2005; Kilara und Panyam, 2003). Daneben könnten

Peptide aus Milchproteinen gesundheitsfördernde Effekte auf den Menschen haben (Korhonen und Pihlanto, 2004). Die Forschung in diesem Bereich erhöht das Interesse an Peptiden aus Milchproteinen als technofunktionelle Ingredienzien mit Zusatznutzen für die Gesundheit.

Nachstehend werden die wesentlichen Ergebnisse unterschiedlicher in der Literatur beschriebener Studien zu den Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinhydrolysaten dargestellt (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Literaturüberblick: Proteolyse von Milchproteinen mit Versuchen zur Prüfung der Schaumbildungseigenschaften.

Referenz	Substrat	Enzym	Hydrolysebedingungen			Schaumbildung	Ergebnisse				
Slattery und Fitz-Gerald, 1998	Gesamt-casein	Bacillus protease (Komplex)	Proteinkonz.:10% T: 50°C pH 7,5 E/S: 0,04% (1:2500)			4% Protein, pH 2,0, 8,0, 10,0; 20°C, Haushaltsmixer 5 min; Schaumübertrag in Trichter mit Netz, Entfernung von großen Blasen und Glattstreichen. Wiegen nach 0 und 20 Minuten. Messung Dichte und Drainage. DH nach Adler-Nissen	DH 0,5 1 3, 9, 15	Drainage pH2 ↑ pH8 ↓ pH10↓ pH2 ↑ pH8 ↓ pH10↓ Keine Schäume	Overrun pH2 ↑ pH8 ↑ pH10↑ pH2 ↑ pH8 ↑ pH10↑ stabilen		
Althouse et al., 1995	Molkenproteinisolat	Acid fungal protease, Alcalase, Trypsin, Pepsin, Chymotrypsin	Enz Alc C Tr P AFP	T °C 30 25 25 37 30	PH 8.5 7.8 7.6 2.0 5.0	E/S 0,8 0,5 0,5 1,0 1,0	Schaumbildung: pH 7,0, 75 ml frisch produziert. Mixer zum Aufschlagen, 78 rpm. Gewicht von 100ml Schaum nach 5, 10, 15 Minuten Schlagen, Overrun Messung. Stabilität: 10 Minuten schlagen und Zeit messen, bis die Hälfte des Schaumvolumens durch ein Loch in eine Schale auf der Waage tropft. Oberflächenspannung. DH nach Adler-Nissen (1986)	Enzym Alc C Tr P AFP	Overrun ↑ ↑ ↑ ↑	Stab ↑ ↑ ↓ ↓	OS ↓ ↓ ↓ ↓ →
Lieske und Konrad, 1996	Molkenprotein-konzentrat	Papain	T : 48°C PH : 6,5 E/S : 2 :100 Proteinkonz. :2,5%			Ultrafiltration des Hydrolysats Schaumbildung: Haushaltsmixer, Raumtemperatur, 5 Minuten im graduieren Becherglas. Overrun: Ablesen des Schaumvolumens. Drainage: Drainage bei Raumtemperatur nach 5 Minuten. DH mit Carbamat-Methode	Overrun pH 2,0 3,0 4,0 5,0 6,0 7,0 8,0	Permeat ↑ → → → ↑ ↑	Reten-tat ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑ ↑		

Referenz	Substrat	Enzym	Hydrolysebedingungen				Schaumbildung	Ergebnisse			
Mutilangi et al., 1996	Wärmebehandeltes Molkenproteinisolat	Trypsin, α -Chymotrypsin, Alcalase, Neutrase	Proteinkonz.: 3%				Schaumbildung: „Column aeration apparatus“, Prot. 2,0%, pH 7,0, N ₂ mit 13,5 ml/min. Schaumkapazität: Reziproke Zeit in Minuten bis 40 ml Schaum in Messzylinder. Stabilität: Schaumhöhe in 1 Minuten-Intervallen. Ultrafiltration DH mit pH-stat Methode.	Hydrolysate schäumten nicht. Retentate der UF zeigten ebenfalls geringe Ergebnisse. Permeat schäumte. Kapazität: Kein Vergleich mit Standard aufgeführt, schlecht bewertbar. Kein Zusammenhang zwischen Oberflächenhydrophobizität und Verschäumung gefunden.			
			Enz	T [°C]	pH						
			Tr	25	7,6						
			C	25	7,8						
			Alc	50	8,5						
			Neut	50	7,5						
			Inaktivierung Enzyme:								
			Enz	T [°C]	pH	t [min]					
			T	65	10,5	20					
			C	68	4,5	21					
Alc	56	3,0	14,5								
Neut	70	3,5	21,5								
Konrad et al., 2005; Konrad und Kleinschmidt, 2005	Molkenproteinkonzentrat	Pepsin	T: 40-44°C pH 1,8-3,0 E/S 1/80-1/700 Proteinkonz. 5-15%				Haushaltsmixer. 2,5% Protein, Raumtemperatur, 5 min. Stabilitätsmessung durch Wiegen der Drainage nach 5 min.	Beste Stabilität bei DH 1,0 und 5,8 Oberflächenhydrophobizität von 23-27% am besten, dies war erreicht bei DH 0-5,8, darüber starker Anstieg.			
Davis et al., 2005	β -LG	Trypsin, Pepsin, Alcalase 2.4L	Proteinkonz. 5%				Methode: Kitchen Aid Ultra Power Mixer, Protkonz. 5%, 737 rpm (mixer), 20 min. DH mit OPA-Methode Experimente: Rheologie	Enzym	Overrun		
			E	T [°C]	E/S	pH		t	Alcalase	→	
			Tr	40	1:300	8,0		3h	Trypsin	→	
			Alc	45	1:20	8,0		3 h	Pepsin	↑	
P	40	1:15	3,0	3 h							
Giardina et al., 2004	Natriumcaseinat Molkenproteinkonzentrat Mischung CAS: WPC=4:1	Amano N, Trypsin, Europe P2	Substratkonz.: 3%; E/S:1/900; Hydrolysezeit: 90 min; T=55°C				Methode: 5 ml mit Vortex eine Minute gerührt, Gesamtvolumen (inkl. Drainage) gemessen, nach 5 min noch mal Drainage und Schaum gemessen. Berechnet: Schaumexpansion (FE), Schaumvolumenstabilität (FVS) und Schaumflüssigkeits-Stabilität (FLS)	Probe	F	FVS	FL
			Cas+Am	↓	/	/					
			Cas+Tr	↓	/	/					
			Cas+E	↓	↓	↓					
			C/W+A	↑	↓	↓					
			C/W+Tr	↑	↑	→					
			C/W+E	↑	↑	↓					

Referenz	Substrat	Enzym	Hydrolysebedingungen				Schaumbildung	Ergebnisse		
Caessens, 1999b	β-Casein β-LG	Plasmin, Trypsin, Staphylococcus aureus V8 protease	β-CN-Hydrolyse:		Protein-		Schaumbildung: 100 ml Lösung in Glaszylinder, 70 s mit 2500 rpm (Kleiner Flügel- rührer), bei pH 4 und pH 6,7. Opti- sche Beurteilung von Blasengröße und Koaleszenz, Schaumhöhen- messung in Ab- hängigkeit von Zeit	Schaum-	pH	pH 6,7
			konz. : 3%; β-LG-Hydrolyse:		Hydrolysezeit zw. 10			höhe vs. Zeit	4,0	
			1%; Hydrolysezeit zw. 10		min und 4h.			(Vergleich untereinan- der)		
			E	pH	E/S	T [°C]		β-CN	↓	↑
			PI/β-CN	6,8	1/2300	40		SUP1	→	→
			PI/β-LG	8	1/200	40		RET1	→	→
					1/100					
					1/50					
			Tr	8	1/400	40		PER1	↓↓	↓↓
			S. aur.	8	1/450	40		Für weitere Fraktionen vgl. (Caessens, 1999b)		
		1/250		β-LG						
				S.aur.	↑	↑				
				PI	↑	↑				
				Tr	↑	↑				
van der Ven et al., 2002	Natriumcaseinat, Molkenprotein- konzentrat (WPC 60)	Pepsin, Newlase F, Vali- dase FP, Promod 258, Promod 184, Flavour- zyme, Corolase L10, Protex 6L, Alca- lase, Corolase PP, Pem	E	pH	E/S	T [°C]	Genau wie Caes- sens (1997) Molkenprotein hitzevorbehandelt	Enzym	CN	WPC
				CN	[%]					
				/	CN/ W	WP				
				PC	P					
			P	3	5/5	50		P	↓↓	
			Nwf	3	1/4	50		Nwf		
			Vfp	3	5/5	50		Vfp	→	↓↓
			P58	5,5	3/3	45		P58		↓↓
				/7						
			Brm	6/7	1/3	50		Brm		
			Flz	6/7	1/5	50		Flz		
			Cl1	6,5	3/3	60		Cl1	↓	
			Px6	8	1/3	60		Px6	↓	↓↓
Alc	8	1/3	60	Alc	↓↓	↑				
Cpp	8	1/3	50	Cpp		↓				
Pem	8	1/4	45	Pem		↓				

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

2.4.1. Spaltstellen der Enzyme

Die Hydrophobizität der Peptide und Proteine wird als wichtige Determinante für die Schaumbildung angenommen (vgl. Kapitel 2.2). Zur Charakterisierung der entstehenden Peptide sind die hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren in Tabelle 6 durch Zahlen gekennzeichnet. Die Einstufung der Hydrophobizität beruht auf den Untersuchungen von Black und Mould (1991). Anhand der Berechnung der Hydrophobizität der Seitenketten der Aminosäuren wird von den Autoren eine Rangfolge der Aminosäuren, von der hydrophobsten zu der mit der geringsten Hydrophobizität, wie in Abbildung 6 dargestellt, vorgeschlagen.

Phe > Leu = Ile > Tyr ≈ Trp > Val > Met > Pro > Cys > Ala
> Gly > Thr > Ser > Lys > Gln > Asn > His > Glu > Asp > Arg

Abb. 6: Hydrophobizität der Aminosäuren nach Black und Mould (1991). Von links nach rechts mit absteigender Hydrophobizität dargestellt.

Die Autoren legen die Hydrophobizität des hydrophobsten Aminosäurerestes mit 1 und die des schwächsten Aminosäurerestes mit 0 fest und berechnen für die dazwischenliegenden Aminosäuren Werte zwischen 0 und 1 (Black und Mould, 1991). Aufgrund dieser Berechnungen kann man die Aminosäuren in fünf Hydrophobizitätsstufen einordnen (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: Einteilung der Aminosäuren in Hydrophobizitätsstufen. Eigene Tabelle nach Black und Mould (1991)

Hydrophobizitätsstufe	Berechnete Hydrophobizität der Autoren	Aminosäuren
1	0,0-0,2	Asp, Glu, His, Arg
2	0,2-0,4	Lys, , Glu, Ser
3	0,4-0,6	Gly, Thr
4	0,6-0,8	Ala, Cys, Met, Pro
5	0,8-1,0	Phe, Ile, Leu, Val, Trp, Thr

Die Hydrophobizitätsstufen sind in den Abbildungen 7 bis 9 unter der Aminosäure eingetragen. Aus der Verteilung der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren kann eine Aussage über die potentiellen Schaumeigenschaften von Peptiden gemacht werden.

2.4.1.1. Trypsin (EC 3.4.21.4)

Trypsin spaltet ausschließlich c-terminale Bindungen der Aminosäuren Lysin und Arginin (Belitz et al., 2001). Aufgrund dieser ausschließlichen Spaltstellen können die Peptide, die bei der Hydrolyse entstehen werden, gut vorhergesagt werden.

Tryptische Hydrolyse von β -Casein

Die theoretische tryptische Hydrolyse von β -Casein wurde in Abbildung 7 an der Primärstruktur von β -Casein der genetischen Variante A² durchgeführt (Schlimme und Buchheim, 1999). Die genetischen Varianten A¹, A³, B, C, D und E unterscheiden sich in bis zu drei Aminosäuren von der hier aufgeführten Primärstruktur. Die Spaltstellen von Trypsin stimmen bei allen genetischen Varianten überein, da weder Lysin noch Arginin ausgetauscht werden.

Durch die Kenntlichmachung der Hydrophobizitäten der Aminosäuren ist zu erkennen, dass β -Casein viele sehr hydrophobe Aminosäuren besitzt, ca. 32% der Aminosäuren besitzen eine Hydrophobizitätskennzahl von 5. Besonders zum C-terminalen Ende liegt eine Häufung von stark hydrophoben Aminosäuren vor.

H.Arg ¹	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Gly ¹⁰	Glu	Ile	Val	Glu	Ser _P	Leu	Ser _P	Ser _P	Ser _P	Glu ²⁰
1	1	5	1	1	5	2	5	4	3	1	5	5	1	2	5	2	2	2	1
Glu	Ser	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile ³⁰	Glu	Lys	Phe	Gln	Ser _P	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln ⁴⁰
1	2	5	3	1	5	2	2	2	5	1	2	5	2	2	1	1	2	2	2
Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile	His ⁵⁰	Pro	Phe	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr ⁶⁰
3	1	1	1	5	2	1	5	5	1	4	5	4	2	3	2	2	5	5	5
Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn	Ser	Leu ⁷⁰	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu	Thr	Gln	Thr ⁸⁰
4	5	4	3	4	5	4	2	2	5	4	2	2	5	4	4	5	3	2	3
Pro	Val	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro ⁹⁰	Glu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Lys	Val	Lys	Glu ¹⁰⁰
4	5	5	5	4	4	5	5	2	4	1	5	4	3	5	2	2	5	2	1
Ala	Met	Ala	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Pro ¹¹⁰	Phe	Pro	Lys	Tyr	Pro	Val	Glu	Pro	Phe	Thr ¹²⁰
4	4	4	4	2	1	2	1	4	4	5	4	2	5	4	5	1	4	5	3
Glu	Ser	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp	Val ¹³⁰	Glu	Asn	Leu	His	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu ¹⁴⁰
1	2	2	2	5	3	5	3	2	5	1	2	5	1	5	4	5	4	5	5
Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro ¹⁵⁰	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	Phe	Pro	Pro	Gln ¹⁶⁰
2	2	5	4	1	2	4	1	2	4	5	4	4	3	5	4	5	4	4	2
Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Lys	Val ¹⁷⁰	Leu	Pro	Val	Pro	Gln	Lys	Ala	Val	Pro	Tyr ¹⁸⁰
2	5	5	2	5	2	2	2	2	5	5	4	5	4	2	2	4	5	4	5
Pro	Gln	Arg	Asp	Met	Pro	Ile	Gln	Ala	Phe ¹⁹⁰	Leu	Leu	Tyr	Gln	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	Pro ²⁰⁰
4	2	1	1	4	4	5	2	4	5	5	5	5	2	1	4	5	5	3	4
Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val.OH											
5	1	3	4	5	4	5	5	5											

Abb. 7: Primärstruktur von Rinder – β – Casein A²-5P. Eigene Zeichnung nach Schlimme und Buchheim (1999), Spaltstellen von Trypsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.

Die theoretische tryptische Hydrolyse ergab eine mögliche Spaltstellenanzahl von 14. Neben einer einzelnen Aminosäure (Lys 29) könnten die Dipeptide Val-Lys (98-99) und His-Lys (106-107) entstehen, die aufgrund ihrer Kürze eine geringe Rolle bei der Erhöhung von Schaumbildungseigenschaften spielen (Damodaran, 2005). Auch die beiden entstehenden Tripeptide Ile-Asn-Lys (26-28) und Ile-Glu-Lys (30-32) sind in Hinblick auf ihre Oberflächeneigenschaften vernachlässigbar. Die theoretisch entstehenden Peptide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der tryptischen Hydrolyse von β -Casein (eigene Einschätzung).

Peptid (AS siehe Abb. 7)	Theoretische Molmasse [g/mol]	Mittlere rechnerische Kennzahl	Hydrophober Charakter	Potentielle Eigenschaft zur Schaumbildung
1-25	2404	2,64	Keine besonders hydrophobe Struktur vorhanden	↓
33-48	1684	2,25	Kaum hydrophobe Gruppen vorhanden	Kettenlänge zu kurz
49-97	4593	3,75	Sehr hydrophober Charakter des gesamten Peptids, kaum hydrophile Gruppen	→
100-105	573	3,16	Ein hydrophobes und ein hydrophileres Ende	Kettenlänge zu kurz
108-113	639	3,33	Hydrophobes Zentrum	Kettenlänge zu kurz
114-169	5401	3,36	Hydrophile und hydrophobe Zentren vorhanden	↑
170-176	689	3,86	hydrophob	Kettenlänge zu kurz
177-183	739	3,57	hydrophob	Kettenlänge zu kurz
184-202	1932	3,68	Stark hydrophobes Zentrum vorhanden (189-193), sonst gemischt	Kettenlänge zu kurz
203-209	651	4,43	hydrophob	Kettenlänge zu kurz

In der Praxis wird nicht in jedem Molekül an jeder theoretisch möglichen Spaltstelle immer gespalten. Chobert et al finden in der Untersuchung ihres tryptischen Hydrolysats von β - A1-Casein mittels RP-HPLC in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad unterschiedliche Mengen von Peptiden (Chobert et al., 1989). Bei einem Hydrolysegrad von 3,2 % finden sie neun der 15 potentiellen Peptide, bei einem Hydrolysegrad von 5,0 % ein weiteres. Erst bei einem Hydrolysegrad von 7,4 % werden 14 der 15 möglichen Peptide detektiert, das Dipeptid 106-107 wurde nicht identifiziert. Mittels der verwendeten SDS-Page konnten nur Peptide mit einer Molmasse ≥ 3700 g/mol nachgewiesen werden. Mittels Größenausschlusschromatographie konnten Peptide ≥ 2500 g/mol identifiziert werden, woraus die Wissenschaftler nach Untersuchung mittels RP-HPLC eine Transpeptidierung der Peptide nicht ausschlossen.

Zu den Schaumbildungseigenschaften tryptischer Hydrolysate von β -Casein finden sich keine Arbeiten in der Literatur.

Tryptische Hydrolyse von β -Lactoglobulin

Die theoretische tryptische Hydrolyse wird an der β -LG B-Form durchgeführt. Andere Varianten (A, C, D, E, F und G) enthalten einige ausgetauschte Aminosäuren an verschiedenen Stellen. Die tryptische Hydrolyse ist in keiner der Varianten von der Hydrolyse von β -Casein B verschieden, da die ausgetauschten Aminosäuren keine tryptischen Spaltstellen betreffen (Arginin und Lysin).

H.Leu ¹	Ile	Val	Thr	Gln	Thr	Met	Lys	Gly	Leu ¹⁰	Asp	Ile	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Thr	Trp	Tyr ²⁰
5	5	5	3	2	3	4	2	3	5	1	5	2	2	5	4	3	3	5	5
Ser	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser ³⁰	Leu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Arg ⁴⁰
2	5	4	4	4	4	2	1	5	2	5	5	1	4	2	2	4	5	5	1
Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro ⁵⁰	Glu	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Gln	Lys ⁶⁰
5	5	5	1	1	5	2	4	3	4	1	3	1	5	2	5	5	5	2	2
Trp	Glu	Asn	Gly	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Lys ⁷⁰	Ile	Ile	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala ⁸⁰
5	1	2	3	1	3	4	2	2	2	5	5	4	2	2	3	2	5	4	4
Val	Phe	Lys	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn ⁹⁰	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Lys ¹⁰⁰
5	5	2	5	1	4	5	2	2	2	2	5	5	5	5	1	3	1	5	2
Lys	Tyr	Leu	Leu	Phe	Cys	Met	Glu	Asn	Ser ¹¹⁰	Ala	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	Ala	Cys	Gln ¹²⁰
2	5	5	5	5	4	4	1	2	2	4	1	4	1	2	2	5	4	4	2
Cys	Leu	Val	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Asp ¹³⁰	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu ¹⁴⁰
4	5	5	1	3	4	2	5	1	1	1	4	5	1	2	5	1	2	4	5
Lys	Ala	Leu	Pro	Met	His	Ile	Arg	Leu	Ser ¹⁵⁰	Phe	Asn	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys ¹⁶⁰
2	4	5	4	4	1	5	1	5	2	5	2	4	3	1	5	1	1	2	4
His	Ile.OH																		
1	5																		

Abb. 8: Primärstruktur von β -LG B (Rind). Eigene Zeichnung nach (Schlimme und Buchheim, 1999), Spaltstellen von Trypsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.

Die Verteilung der hydrophoben Aminosäuren im β -Lactoglobulinmolekül ist unregelmäßig, es sind einige hydrophobe Kettenabschnitte am C-terminalen und im Bereich des N-terminalen Endes zu erkennen, diese sind jedoch kurz und von nicht so hydrophoben Resten unterbrochen. Die Betrachtung der Spaltstellen von Trypsin ergibt, dass durch tryptische Hydrolyse 18 verschiedene Peptide und Aminosäuren entstehen können. Dabei können die einzelne Aminosäure Lysin (70 und 101) und das Dipeptid Thr-Lys (76-77) entstehen. Durch die Spaltungsaktivität von Trypsin entstehen zwei Tripeptide (136-138 und 139-141). Die

längeren Peptide sind in Tabelle 8 mit ihrer theoretischen Molmasse und ihren potentiellen Hydrophobizitäten aufgeführt.

Tab. 8: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der tryptischen Hydrolyse von β -Lactoglobulin (Eigene Einschätzung).

Polypeptid (AS siehe Abb. XY)	Theoretische Molmasse [g/mol]	Mittlere rechnerische Kennzahl	Hydrophober Charakter	Charakter	Potentielle Eigenschaft zur Schaumbildung	Eigenschaft zur Schaumbildung
1-8	806	3,63	hydrophob		Kettenlänge zu kurz	
9-14	582	3	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
15-40	2399	3,54	Deutlich hydrophober Charakter im gesamten Peptid		↑	
41-47	788	3,43	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
48-60	1235	3,23	hydrophob		Kettenlänge zu kurz	
61-69 + 149-162	2324	2,78	Mäßig hydrophob		→	
71-75	500	3,6	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
78-83	601	4,17	Sehr hydrophob		Kettenlänge zu kurz	
84-91	789	2,88	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
92-100	938	3,56	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
102-124	2285	3,35	Hydrophobes C-terminales und N-terminales Ende, dazwischen hydrophile Gruppen		↑	
125-135	1082	3,64	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	
142-148	728	3,43	Einige hydrophobe Reste vorhanden		Kettenlänge zu kurz	

Die tryptische Hydrolyse hat eine hohe Anzahl von sehr kurzen Peptidketten zur Folge. Es entstehen nur zwei Peptide, die nach Betrachtung der Kettenlänge und Hydrophobizität schaumbildungs-fördernde Eigenschaften besitzen könnten, da sie eine Kettenlänge von über 20 Aminosäuren besitzen.

Cassens et al. untersuchten die tryptischen Hydrolysate von β -Lactoglobulin mit Hydrolysegraden von 1, 2 und 4% DH mittels RP-HPLC. Die Hydrolysate unterschieden sich anhand der Anzahl der Peptide, die identifiziert werden konnten und anhand der Menge β -LG, die noch

im Hydrolysat vorhanden war. Mit zunehmendem DH nahm die Anzahl an unterschiedlichen Peptiden zu und die Menge an ungespaltenem β -LG ab (Caessens et al., 1999).

Nicht alle der Spaltungsstellen (vgl. Abb. 8) werden immer identifiziert. Turgeon et al. (Turgeon et al., 1992) berichten, dass in ihren Versuchen die Spaltungsstelle Lys47-Pro48 nie gespalten wurde und bestätigen damit frühere Erkenntnisse von Hirs et al. (1956). Durch RP-HPLC konnten verschiedene Peptide im tryptischen Hydrolysat nicht nachgewiesen werden, die geringe Spaltung wird der kurzen Hydrolysezeit zugeschrieben. Einige Peptidbindungen werden seltener gespalten (Lys8-Gly9, Lys77-Ile78), die theoretisch resultierenden Peptide nur in geringen Mengen gefunden. Die Peptide 1-14 und 76-83 werden von den Autoren nachgewiesen (Turgeon et al., 1992).

Turgeon et al. (1992) und Dalgarrondo et al. (1990) finden Peptide, die auf zwei unspezifische Spaltstellen hinweisen. An der Peptidbindung Tyr20-Ser21 und Met24-Ala25 kommt es in den Versuchen der Autoren zu unspezifischen Spaltungen. Das Peptid 102-124 wird von beiden Autoren mittels RP-HPLC nicht gefunden. Sie schreiben die Abwesenheit dem Vorkommen einer Disulfidbrücke und der Thiolgruppe, die in diesem Peptid vorkommen und evtl. mit anderen Substraten reagieren könnten, zu. Mehrere unidentifizierbare Peaks am Ende des Chromatogramms unterstützen diese These nach Turgeon et al. (1992).

Die tryptische Hydrolyse von β -LG ergibt eine hohe Ausbeute an Molekülen von geringer Molmasse (≤ 2000 g/mol). Die von Turgeon et al. (1992) gemessenen geringen Grenzflächeneigenschaften der Hydrolysate lassen vermuten, dass auch die Schaumbildungseigenschaften dieser gering sind. Ein Nachweis erfolgt in der Studie nicht.

Davis et al. (2005) führten auch Versuche zu den Schaumbildungseigenschaften von tryptischem β -LG-Hydrolysat durch (Bedingungen vgl. Tab. 5). Der Overrun des Hydrolysats war geringfügig niedriger als der vom Ausgangssubstrat, die Oberflächenspannung wird durch das Hydrolysat jedoch deutlich herabgesetzt.

2.4.1.2. Pepsin (EC 3.4.23.1)

Pepsin ist eine Asparaginsäurepeptidase, die im Magen der Säuger Proteine spaltet und deswegen ihr Aktivitätsoptimum im sauren Milieu hat (pH 2). Die Endopeptidase spaltet vorrangig C-terminal der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Glutaminsäure.

β -Casein wird durch Pepsin hydrolysiert (Schmelzer et al., 2004), natives β -LG ist resistent gegen Hydrolyse durch Pepsin und Chymotrypsin, erst durch vorherige Temperaturbehandlung können Hydrolysegrade erzielt werden (Caessens et al., 1999; Davis et al., 2005). Aus diesem Grund werden an dieser Stelle nur die theoretischen Spaltstellen der peptischen Hydrolyse von β -Casein aufgeführt.

Peptische Hydrolyse von β -Casein

Die Hydrolyse von β -Casein mit Pepsin ergibt eine hohe Anzahl potentieller Spaltstellen, die durch den hohen Gehalt von Leucin- und Glutaminsäureresten begründet ist. Kein potentiell entstehendes Peptid hat die als positiv für die Schaumbildungseigenschaften eingeschätzte Kettenlänge von ≥ 20 Aminosäuren. Eine Steigerung der Schaumbildungseigenschaften erscheint nicht möglich.

H.Arg ¹	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Gly ¹⁰	Glu	Ile	Val	Glu	Ser _P	Leu	Ser _P	Ser _P	Ser _P	Glu ²⁰
1	1	5	1	1	5	2	5	4	3	1	5	5	1	2	5	2	2	2	1
Glu	Ser	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile ³⁰	Glu	Lys	Phe	Gln	Ser _P	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln ⁴⁰
1	2	5	3	1	5	2	2	2	5	1	2	5	2	2	1	1	2	2	2
Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile	His ⁵⁰	Pro	Phe	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr ⁶⁰
3	1	1	1	5	2	1	5	5	1	4	5	4	2	3	2	2	5	5	5
Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn	Ser	Leu ⁷⁰	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu	Thr	Gln	Thr ⁸⁰
4	5	4	3	4	5	4	2	2	5	4	2	2	5	4	4	5	3	2	3
Pro	Val	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro ⁹⁰	Glu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Lys	Val	Lys	Glu ¹⁰⁰
4	5	5	5	4	4	5	5	2	4	1	5	4	3	5	2	2	5	2	1
Ala	Met	Ala	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Pro ¹¹⁰	Phe	Pro	Lys	Tyr	Pro	Val	Glu	Pro	Phe	Thr ¹²⁰
4	4	4	4	2	1	2	1	4	4	5	4	2	5	4	5	1	4	5	3
Glu	Ser	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp	Val ¹³⁰	Glu	Asn	Leu	His	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu ¹⁴⁰
1	2	2	2	5	3	5	3	2	5	1	2	5	1	5	4	5	4	5	5
Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro ¹⁵⁰	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	Phe	Pro	Pro	Gln ¹⁶⁰
2	2	5	4	1	2	4	1	2	4	5	4	4	3	5	4	5	4	4	2
Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Lys	Val ¹⁷⁰	Leu	Pro	Val	Pro	Gln	Lys	Ala	Val	Pro	Tyr ¹⁸⁰
2	5	5	2	5	2	2	2	2	5	5	4	5	4	2	2	4	5	4	5
Pro	Gln	Arg	Asp	Met	Pro	Ile	Gln	Ala	Phe ¹⁹⁰	Leu	Leu	Tyr	Gln	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	Pro ²⁰⁰
4	2	1	1	4	4	5	2	4	5	5	5	5	2	1	4	5	5	3	4
Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val.OH											
5	1	3	4	5	4	5	5	5											

Abb. 9: Primärstruktur von Rinder – β – Casein A²-5P. Eigene Zeichnung nach (Schlimme und Buchheim, 1999), Spaltstellen von Pepsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.

Die tatsächlich bei einer peptischen Hydrolyse entstandenen Peptide wurden von Schmelzer et al. (2004) mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Hydrolyse wurde durchgeführt bei 37°C, pH 2 und einer Proteinkonzentration von 25mg/ml über eine Dauer von drei Stunden. Die Analyse der Sequenzen ergab 41 Peptide, die Molmassen von 220 bis 4000 g/mol besaßen. Zehn der gefundenen Peptide besaßen Kettenlängen von ≥ 20 Aminosäuren. Einige der Peptide waren unerwartet, d.h. die Kette war an Aminosäuren gespalten, die der Sequenzspezifität von Pepsin nicht entsprechen. Die entstandenen Peptide sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der peptischen Hydrolyse von β -Casein nach Schmelzer et al (Schmelzer et al., 2004). Eigene Einschätzung der Eigenschaften.

Polypeptid (AS siehe Abb. XY)	Molmasse [g/mol]	Hydrophober Charakter (Eigene Einschätzung)	Potentielle Eigenschaft zur Schaumbildung
74-95	2390	Hydrophober Charakter	→
74-95	2430	Hydrophober Charakter	→
158-178	2467	Hydrophober Charakter	→
156-178	2682	Hydrophober Charakter	→
179-203	2806	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑
179-204	2878	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑
179-205	3025	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑
109-142	3831	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑
74-108	3863	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑
73-108	3976	Hydrophobe Anteile und hydrophile Anteile	↑

Die Einschätzung der Hydrophobizität der Peptide und der daraus gefolgerten Schaumbildungseigenschaften lässt die Vermutung zu, dass eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften von β -Casein durch peptische Hydrolyse möglich sein könnte.

Zu den Schaumbildungseigenschaften von peptischem Hydrolysat aus β -Casein ist keine Literatur vorhanden. Althouse et al. (1995) haben die Schaumbildung von mit Pepsin behandelten Molkenproteinisolat untersucht, Konrad et al. (2005; Konrad und Kleinschmidt 2005) die Schaumbildungseigenschaften von Molkenproteinkonzentrat (vgl. Tab. 5). Davis et al. (2005) untersuchen die Schaumbildungseigenschaften von peptischen Hydrolysaten von β -Lactoglobulin, der Hydrolyse geht allerdings ein Erhitzungsschritt zur Denaturierung voraus (vgl. Tab. 5).

2.4.1.3. Alcalase

Alcalase ist eine Enzympräparat, das neben der Hauptaktivität Subtilisin Carlsberg (auch: subtilisin, subtilisin A, subtilopetidase A, Alcalase Novo, EC 3.4.21.62) auch Nebenaktivitäten anderer Peptidasen enthält (Hersteller: Novozymes Denmark). Hydrolysiert werden von Subtilisin insbesondere Peptidbindungen mit aromatischen Aminosäureresten, aber auch andere (Doucet et al., 2003).

Doucet et al. haben die Spezifität von Alcalase in β -Lactoglobulin untersucht und herausgefunden, dass die Spaltungsfrequenz für Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin hoch ist. Auch für Spaltungen bei Leucin und Alanin wurden hohe Frequenzen gefunden. Die Autoren führen dies auf die hohe Anzahl von Leucin- und Alaninresten zurück (22 bzw. 15 Reste).

Peptidgebundene Glutaminsäure und Methionin wurden ebenfalls mit hoher Frequenz C-terminal gespalten. Svendsen und Breddam (1992) isolierten aus der Enzymmischung Alcalase eine Endopeptidase, die bei den Peptidbindungen Glu-X und Asp-X spaltet, jedoch die Spaltung bei Glu-X bevorzugt (Svendsen und Breddam, 1992). Auf diese Endopeptidase führen auch Doucet et al. (2003) die hohe Spaltungsaktivität bei Glu-X zurück.

Aus der Heterogenität des Enzympräparates ergibt sich eine geringe Spezifität für die Spaltung von bestimmten Peptidbindungen. Eine Vorhersage der potentiell entstehenden Peptide ist schwierig (Doucet et al., 2003). Durch die Hydrolyse mit Alcalase entsteht eine große Anzahl an verschiedenen Peptiden, mehr als mit einer spezifischen Proteinase wie Pepsin oder Chymotrypsin (Sukan und Andrews, 1982).

Die Schaumbildungseigenschaften von mit Alcalase hydrolysiertem β -LG wurden von Davis et al. (2005) untersucht. Der Overrun des Hydrolysats entsprach dem von nativem β -LG, die Oberflächenspannung wurde durch die Behandlung mit Alcalase deutlich abgesenkt.

Die Eigenschaft zur Bildung von Schaum wird von van der Ven et al. (2002) für verschiedene Substrate und Hydrolysegrade untersucht. Während Molkenproteinkonzentrat mit einem DH von 6 gute Aufschlageigenschaften besitzt, bildet sich bei einem DH von 23 kein Schaum. Beide Schäume besitzen keine Stabilität. Schäume aus hydrolysiertem Natriumcaseinat bilden bei Hydrolysegraden von 14 und 19% ein hohes Schaumvolumen aus, die Stabilität ist jedoch gering.

Althouse et al. (1995) finden für mit Alcalase hydrolysiertem Molkenproteinkonzentrat eine Ausbildung von hohen Schaumbildungskapazitäten (Overrun) und auch hohe Stabilität. Die Oberflächenspannung wird durch das Hydrolysat herabgesetzt. Althouse et al. bestimmen für das Hydrolysat mit Alcalase aus Molkenproteinisolat bessere Schaumbildungseigenschaften als für Hühnereiweiß.

3. Material und Methoden

Zur Herstellung von Voll- und Magermilch wurden die Verfahren der Entrahmung, Pasteurisierung und z.T. Homogenisierung eingesetzt, zur Trocknung die Verfahren Sprühtrocknung und Gefriertrocknung (Lyophilisation).

Die eingesetzte Rohmilch stammte von der Versuchsstation Schaedtбек der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel.

Entrahmung

Zur Entrahmung wurde die Rohmilch auf 45°C erhitzt. Mittels einer Tellerzentrifuge (Westfalia Separator, Westfalia AG, Oelde/Westfalen) wurde der Rahm von der Magermilch getrennt. Anschließend wurden Rahm und Magermilch bis zur Verwendung im Wasserbad oder Kühlraum gekühlt (5-8°C).

Pasteurisierung

Die Kurzzeiterhitzung erfolgte über einen Plattenwärmetauscher (AB Separator Type PL-1-RB, Lund/Schweden). Die Milch wurde ca. 25 Sekunden bei einer Temperatur von 73°C kurzzeiterhitzt und anschließend im Wasserbad gekühlt.

Homogenisierung

Die Homogenisierung wurde bei 65°C und 180/50 bar durchgeführt (Laboratory Homogenizer, Model 15M, Gaulin Corporation/USA).

Lyophilisation und Sprühtrocknung

Zur Gefriertrocknung wurde das Material in Kunststoffschalen im Kühlraum (-20 °C) eingefroren wo es bis zur Trocknung verblieb. Vier Schalen wurden gleichzeitig unter Vakuum getrocknet (Leybold-Heraeus GT2).

Zur Sprühtrocknung wurde ein Sprühturm von Niro eingesetzt (Niro GmbH, Typ Minor, ca. 10 kg Wasserverdampfung/h), die Temperatur betrug 185/82°C.

3.1. Proteinfractionierung im Technikummaßstab

3.1.1. Fraktionierung von Caseinen und Molkenproteinen aus Milch und Süßmolke mittels Membrantrennverfahren

Die Anreicherung von Caseinen und Molkenproteinen erfolgte nach dem in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Kiel etablierten Verfahren der Membranfiltration von Proteinen (Hoffmann, W., Johannsen, N., und Ströbel, D., 2006, siehe Anlage). Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Fraktionen war Magermilch.

Die Mikrofiltration der Magermilch zur Fraktionierung der Milchproteine erfolgte auf einer Pilotanlage (MFS-1, Tetrapak, Reinbek) mit einer keramischen Membran (Membralox P19-40, SCT, Frankreich; ZrO₂-Keramikmodul, Austauschfläche 0,2m², mittlere Porenweite 0,1µm). Die Milch wurde bei 55°C bis zu vierfach aufkonzentriert (Permeatdurchflussrate 12,5 kg/h). Das Retentat wurde durch Diafiltration dreimal gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (Einfrieren -20°C, Trocknung: Lyovac GT2, Thyracont GmbH, Passau; 0,65 mbar, 30°C, 46h).

Die Gewinnung von nativem Molkenprotein erfolgte aus dem Permeat der Mikrofiltration von Magermilch. Durch Crossflow-Ultrafiltration (Pilotanlage UFS-1, Tetra-Pak, Reinbek) über ein Hohlfasermodule (CTG, 3" HF 25-43-PM10-PB, Koch-Glitsch GmbH, Aachen) mit einer Trenngrenze (NMWCO) von 10.000 g/mol wurden die Molkenproteine im Retentat der UF aufkonzentriert (50°C, Konzentrationsfaktor 10), anschließend diafiltriert und gefriergetrocknet.

Zur Gewinnung von Süßmolke wurde Magermilch einer Labfällung unterworfen (40°C; Chymax (reine Chymosinlösung, 0,25 ml/kg ChyMax Plus, 200 IMCU/ml, Chr. Hansen Nienburg)). Die Süßmolke wurde über ein Baumwolltuch (mittlere Maschengröße ca. 0,3 mm) abgetrennt und zweimal in der Tellerzentrifuge gereinigt. Die weitere Molkenproteingewinnung erfolgte wie oben beschrieben.

3.1.2. Fraktionierung von Caseinen aus Labcasein

Zur Caseinfractionierung wurde Labcasein aus pasteurisierter Magermilch (75°C, 28 s) hergestellt. Zur Einlabung wurde die Milch bei 37°C mit 0,1g/l CaCl₂ und 10g Chymosin (Chymax double strength, Pfizer Dairy Productions Division) versetzt. Die Zusammensetzung des Labcaseins wurde mittels der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (VDLUFA VI 30.6.4., 1996) durch Vergleich mit Standards (α_S- und β-Casein-Standards von Sigma Chemie, Deisenhofen) überprüft. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Labcasein portioniert (ca. 2,5 kg Blöcke) und eingefroren (-20°C).

Zur Fraktionierung wurde das Labcasein aufgetaut, zerkleinert (Fleischwolf) und in einem temperierbaren Gefäß mit entmineralisiertem Wasser suspendiert. Die Suspension (Konzentration: 4-8% Protein) wurde unter Rühren auf die Zieltemperatur (4-60°C) erwärmt bzw. gekühlt. Das Labcasein wurde durch Zugabe von 1mol/l NaOH (Merck, Darmstadt) bei pH 9,0 und Versuchstemperatur in Lösung gebracht. Nicht gelöstes Casein wurde abfiltriert (Kunststoffsieb, Porengröße ca. 1mm). Die Lösung wurde auf 2°C abgekühlt und bei dieser

Temperatur durch tropfenweise Zugabe der Säure (32%ige Essigsäure, 25%ige Zitronensäure, 45%ige Milchsäure, 10%ige Salzsäure (alle Merck, Darmstadt) auf einen pH-Wert von 4,6 eingestellt.

Die durch die partielle Fraktionierung entstandenen Präzipitate wurden durch ein Baumwolltuch (mittlere Maschengröße ca. 0,3 mm) filtriert. Das Präzipitat wurde dreimal mit vorgekühltem (0°C) entmineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (α_S -/ ρ - κ -Casein-Fraktion). Der Überstand wurde über die vorgekühlte (0°C) Tellerzentrifuge von Resten des Präzipitates befreit und langsam auf 40°C erwärmt. Durch die Erwärmung präzipitierte das β -Casein und wurde ebenfalls über ein Baumwolltuch (mittlere Maschengröße ca. 0,3mm) abgetrennt und gefriergetrocknet (β -Casein-Fraktion).

3.1.3. Fraktionierung von β -Casein aus Natriumcaseinat durch Mikrofiltration

Zur Anreicherung von β -Casein durch Mikrofiltration wurde Natriumcaseinat (Alanate 180, Fonterra (Europe) GmbH, Hamburg) als Ausgangsmaterial eingesetzt. 80 kg einer 2%igen Lösung wurden zur Hydratisierung der Proteine 20 Stunden bei 2°C gelagert. Vor der Mikrofiltration (Porengröße 0,1 μ m, vgl. 3.1.1) wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt (1ml/l NaOH (Merck, Darmstadt)) und die Lösung auf ca. 0,5°C gekühlt (Spiral austauscher). Um eine Temperatur von max. 3,0°C zu gewährleisten, wurde ein Kühlsystem benutzt. Der Aufbau und die technischen Daten sind Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D., 2006 im Anhang zu entnehmen. Das Permeat der Mikrofiltration wurde bei 50°C aufkonzentriert (Ultrafiltration, vgl. 3.1.1) und gefriergetrocknet.

3.1.4. Fraktionierung von Molkenproteinen aus Molkenproteinisolat

Zur Anreicherung von β -Lactoglobulin einerseits und α -Lactalbumin, BSA und Immunoglobulinen andererseits wurde als Ausgangsmaterial Molkenproteinisolat (Isolac, Milei GmbH, Stuttgart) eingesetzt. Die 20%ige Ausgangslösung wurde 16 Stunden bei 5°C unter Rühren gelagert, um eine ausreichende Hydratisierung der Proteine zu garantieren. Anschließend wurde die Temperatur auf 20°C angehoben und der pH-Wert auf 3,8 abgesenkt (10 %ige HCl (Merck, Darmstadt)). Die Lösung wurde bei 55°C für 30 Minuten im Wasserbad gerührt und anschließend sofort zentrifugiert (60 min, 5.000 x g, 25°C). Der Überstand (β -LG-Fraktion) wurde dekantiert und sprühetrocknet. Der Bodensatz (α -LA-/BSA-/IG-Fraktion) wurde gefriergetrocknet.

3.1.5. Fraktionierung von NPN-Substanzen aus Magermilch mittels Ultrafiltration

Zur Fraktionierung von NPN-Substanzen wurde Magermilch ultrafiltriert (Hohlfasermodul, Koch-Glitsch GmbH, Aachen, NMWCO: 10.000 und 5.000 g/mol). Mittels Diafiltration (gleiche Membran, 3 Waschgänge) wurde das Retentat gewaschen. Das Permeat der Ultrafiltration und das Permeat der ersten Diafiltration wurden im Eindampfer bei 40-50°C auf einen

Trockenmassegehalt von ca. 50% konzentriert und anschließend sofort auf 30°C abgekühlt. Das Konzentrat wurde mit 0,1% kristalliner Lactose (Meggler GmbH & Co. KG Wasserburg) beimpft und anschließend gekühlt (13°C). Durch Wärmeisolierung der Behälter wurde ein durchschnittlicher Temperaturabfall von 1,0°C pro Stunde erreicht. Die Temperatur betrug nach 16 Stunden 14,2°C. Durch Zentrifugation (10 min, 4.000 x g) wurde die Trennung der kristallisierten Lactose von der Mutterlauge verstärkt, der Überstand wurde dekantiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Größenausschlusschromatographie. Der Verfahrensablauf ist schematisch dargestellt (vgl. Abb. 10).

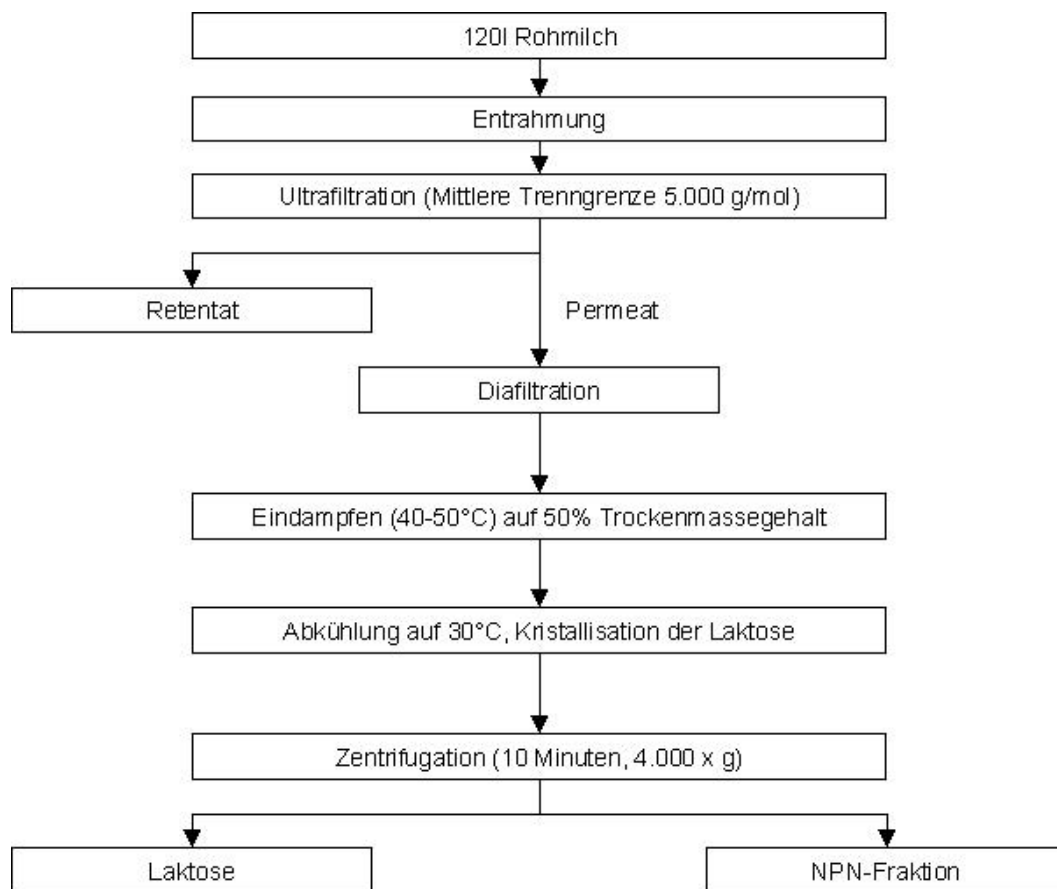


Abb. 10: Verfahrensablauf der Anreicherung von NPN-Substanzen aus Rohmilch

3.2. Gewinnung von Proteasepräparationen aus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Zur Gewinnung von Proteasen aus Milchsäureproduzierenden Bakterien (MSO) wurde ein Stamm von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aus der Stammsammlung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, isoliert aus einem griechischen Joghurt, verwendet. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Wilhelm Bockelmann im Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel durchgeführt.

3.2.1. Gewinnung von Milchsäureproduzierenden Organismen

Der Stamm wurde in Lackmusmilch (Wasser, Magermilchpulver, Lackmus) überimpft und bei 45°C (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgar.*) 24 Stunden inkubiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, anschließend wurden die Bakterien in MRS-Nährbouillon (Merck, Darmstadt) überimpft und 16-20 Stunden bei oben genannten Temperaturen inkubiert. Die bewachsene Bouillon wurde zentrifugiert (6000 Upm, 15 min, 4°C) und das Pellet eingefroren (-80°C).

3.3. Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinfraktionen

3.3.1. Enzymatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin im Technikummaßstab

Als Substrat für die enzymatische Hydrolyse wurde Molkenproteinisolat der Firma Milei GmbH Stuttgart (Isolac, Lot Nr. 5344311, Protein = 93,06% (f = 6,38), Asche = 1,95%, Trockenmasse = 97,93%) eingesetzt.

Die Hydrolyse des Molkenproteinisolats mit Chymotrypsin (Sigma, Alpha-Chymotrypsin, Typ II, C4129; 60 units/mg Protein) wurde in 10%iger Lösung (bezogen auf Protein, Gesamtpulvermenge 11,1 kg) durchgeführt. Das Enzym-Substrat-Verhältnis (E/S) betrug 1/1000 bezogen auf den Proteingehalt, die Hydrolyse wurde bei 40°C und pH-Stat-Bedingungen (pH 8) durchgeführt. Nach einer Hydrolysezeit von 10 Minuten wurde mit der Membrantrennung mittels Ultrafiltration (Hohlfasermodul Fa. Koch, NMWCO 10000 g/mol) begonnen, die Gesamthydrolysezeit betrug 2,5 Stunden. Ein Teil des Permeats wurde durch erneute Ultrafiltration weiter fraktioniert (Ultrafiltration: Hohlfasermodul Fa. Koch, NMWCO 5.000 g/mol). Das Permeat (Substanzen <10.000 g/mol) der Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol) wurde sprühgetrocknet, das Retentat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol Membran sowie Permeat und Retentat der Filtration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol wurden lyophilisiert.

Die Hydrolyse des Molkenproteinisolats mit Trypsin (Pancreatic Trypsin 6,0 S Type Saltfree von Novozymes, Denmark; Aktivität: 1250 Trypsin units (USP) /mg, Nebenaktivität: 100 Chymotrypsin units/mg) wurde ebenfalls in 10%iger Lösung (bezogen auf Protein, Gesamtpulvermenge 11,1 kg) durchgeführt. Das Enzym-Substrat-Verhältnis betrug 1/100. Vor der Hydrolyse wurde die Molkenproteinlösung kurzzeiterhitzt (73°C, 20 s). Die Hydrolyse wurde unter pH-Stat Bedingungen bei 47°C und pH 8,0 durchgeführt. Nach einer Hydrolysezeit von 5 Stunden wurde die Lösung ultrafiltriert (Hohlfasermodul Fa. Koch, NMWCO 10.000 g/mol) und das Permeat durch erneute Ultrafiltration weiter fraktioniert (Ultrafiltration: Hohlfasermodul Fa. Koch, NMWCO 5.000 g/mol). Das Permeat der Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol) wurde sowohl sprüh- als auch gefriergetrocknet, das Retentat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol Membran sowie Permeat und Retentat der Filtration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol wurden lyophilisiert.

3.3.2. Enzymatische Hydrolyse von β -Lactoglobulin und β -Casein mit Trypsin, Alcalase und Pepsin im Labormaßstab

Als Substrat für die enzymatische Hydrolyse wurden die Fraktionen β -Casein und β -Lactoglobulin aus eigener Herstellung eingesetzt (vgl. 3.1.3 und 3.1.4). Die Versuche wurden auf einer pH-Stat-Anlage (Methrom AG, Schweiz) mit einem Volumen von 500 ml durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 3,4 %.

Zur Hydrolyse wurden die Enzyme Alcalase (Alcalase® 2.4 L FG von Novozymes, Denmark; Aktivität: 2,4 AU-A/g), Trypsin (Trypsin, TPCK treated, from Bovine Pankreas von Sigma, Aktivität: < 10,000 BAEE-Units/mg Protein) und Pepsin (Pepsin crystallin von Sigma, 3,300 Units/mg Protein) eingesetzt. Die Hydrolysezeit betrug 5, 15, 30 und 60 Minuten. In Tabelle 10 ist der Versuchsplan der Versuchsreihe dargestellt. Die Hydrolyse erfolgte im pH- und Temperatur-Optimum der Enzyme (vgl. Tab. 10). Das Enzym-Substratverhältnis (E:S) betrug 1:1000 (bezogen auf den Proteingehalt).

Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurden Natronlauge bzw. bei Pepsin Salzsäure ($c = 1$ mol/l) verwendet. Die Hydrolyse der Proteine wurde durch Erhitzung der Lösung gestoppt (30 min, 75°C). Die Proben wurden noch am gleichen Tag verschäumt, für Elektrophorese und FPLC wurden Proben abgenommen und bei -20°C eingefroren.

Tab. 10: Versuchsplan der Versuchsreihe zur enzymatischen Hydrolyse von Milchproteinfraktionen

Enzym	Substrate	Hydrolysezeiten [Minuten]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Alcalase	β -Casein, β -Lactoglobulin	5, 15, 30, 60	7,5	60
Pepsin	β -Casein, β -Lactoglobulin	5, 15, 30, 60	2,0	40
Trypsin	β -Casein, β -Lactoglobulin	5, 15, 30, 60	8,0	40

3.3.3. Enzymatische Hydrolyse von Magermilch mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

500 ml pasteurisierte Magermilch wurden temperiert (40°C) und mit 15g tiefgefrorenen Zellen des Stammes *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (vgl. S. 40) zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde der pH-Wert durch die pH-Stat-Anlage konstant bei 6,8 gehalten (NaOH, 1 mol/l. (Merck, Darmstadt). Nach der Inkubationszeit wurde die Milch für 15 s auf 70°C erhitzt und anschließend bis zur Verwendung gekühlt (6°C). Die Hydrolyse durch die Milchsäureproduzierenden Bakterien wurde mittels FPLC überprüft.

3.3.4. Hydrolysat-angereicherte Handelsproben

Zur Verschäumung wurden drei Handelsproben, die zum aktuellen Zeitpunkt auf dem Markt erhältlich sind, eingesetzt (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: Zusammensetzung, Bearbeitung und Zutatenlisten der kommerziellen Produkte für Milchschaum

Produkt	Fettgehalt [%]	Protein-gehalt [%]	Koh-lenhyd-rate [%]	Erhitzung	Zutatenliste
Handelsprobe 1: Cino (Breisgau- milch)	1,5	3,9	5,3	UHT	Milch (1,5% Fett), Stabilisator E401 (hydrolysiertes Weizenprotein (enthält Gluten), Milcheiweiß- erzeugnis, Natriu- malginat), Zucker
Handelsprobe 2: Cappuccino-Milch (frischli)	2,6	3,8	5,6	UHT	Vollmilch (71 %), Magermilch (28 %), Zucker, Milch- eiweißerzeugnis, Stabilisator Nat- riumalginat, Aroma
Handelsprobe 3: Milch für feinen Milchschaum (Naarmann)	1,8	3,7	4,9	UHT	Fettarme Milch (1,8%), Milchei- weißerzeugnis, Stabilisator: Me- thylcellulose, Car- ragen

3.4. Quervernetzung von Milchproteinen mit Transglutaminase

Die Herstellungsverfahren und die technofunktionellen Eigenschaften der durch Quervernetzung von Proteinen entstandenen Proteinkomplexe sind bereits veröffentlicht worden (Lorenzen, 2007).

Zur Modifizierung von Magermilch- und Molkenproteinen mit Transglutaminase wurden Molkenproteinprodukte (Fa. Biolac, Harbansen) und low-heat-Magermilchpulver (Fa. Nordmilch, Bremen) mit einem Flügelrührer bei 20°C in entmineralisiertem Wasser gelöst (10%ige Lösung) und 4 Stunden gerührt. Anschließend wurden die Lösungen/Suspensionen im Plat-

tenwärmetauscher für 30 s auf 90°C erhitzt und anschließend auf 8°C gekühlt. Die rekonstituierten Molkenprotein- bzw. Magermilchlösungen wurden mit Activa MP (Activa MP, Firma Ajinomoto, Japan) in einem E/S=1/2000 versetzt. Anschließend wurden die Proteinlösungen für 4h bei 40°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Lösungen/Suspensionen im Plattenwärmeaustauscher erhitzt, auf 20°C gekühlt und im Sprühtrockner getrocknet.

Zur Modifizierung von Säurecasein (Firma Meggle, Wasserburg) wurde das Pulver in entmineralisiertem Wasser dispergiert, mit 1mol/l NaOH auf pH 6,7 eingestellt und 2 Stunden bei diesem pH-Wert gerührt. Anschließend wurden die Natriumcaseinatlösungen im Plattenwärmeaustauscher für 60 s auf 80°C erhitzt und auf 8°C gekühlt. Die Hälfte der Proteinlösungen wurde mit Activa MP (Activa MP, Firma Ajinomoto, Japan) in einem E/S=1/2000 versetzt. Anschließend wurden die Natriumcaseinatlösungen in der 1. Versuchsreihe 16 Stunden bei 4-6°C gelagert bzw. inkubiert. Nach der Inkubation wurde wie bei Magermilch- und Molkenproteinen verfahren.

3.5. Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate

Die Milchproteinfraktionen und Hydrolysate wurden hinsichtlich der Parameter Schaumbildungseigenschaften (Drainage, Dichte, Overrun, Blasengrößenverteilung mittels digitaler Bildanalyse), Oberflächenspannung, und Molmassenverteilung (FPLC, HPLC und Elektrophorese) charakterisiert.

Zur Verschäumung der Proteinpulver, Fraktionen und Hydrolysate wurden Lösungen mit einem Proteingehalt von 3,4% angesetzt, um dem natürlichen Proteingehalt der Milch zu entsprechen. Die Lösungen wurden 2-16h vor der Verarbeitung angesetzt, um die vollständige Hydratisierung der Proben zu gewährleisten. Lösungen mit abweichenden Proteingehalten sind gekennzeichnet.

3.5.1. Aufschümanlage

Die Anlage zum Aufschäumen proteinhaltiger Lösungen (vgl. Abb. 11) besteht aus einem doppelwandigen Glasbehälter mit einer Glasfritte (Porendurchmesser 9 bis 15 µm), in den Luft (25 l/h) eingeblasen werden kann und Probenmaterial aufgeschäumt wird. Über eine Umwälzpumpe mit Wasserbad ist der doppelwandige Glasbehälter auf die Proben temperaturerbar. In einem Messzylinder wird der produzierte Schaum aufgefangen. Bei einem Schaumvolumen von 200 cm³ wird die Luftzufuhr abgestellt, der Messzylinder mit dem enthaltenen Schaum verwogen und auf einem Stativ über einer Glasfritte (Porengröße 90 bis 150 µm) und einer elektronischen Waage angebracht. Eine Digitalkamera (Polaroid Model DMC1, Polaroid Corporation, Cambridge, USA; mit Makrozoomobjektiv EHD 10x, f=20-200 mm, F5.6, EHD Imaging GmbH, Damme) ist mit dem Objektiv auf den Messzylinder ausgerichtet. Mittels der Waage und dem angeschlossenen Computerprogramm (Kern Balance Connection) kann die aus dem Schaum tropfende Flüssigkeit (Drainageflüssigkeit) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden. Die Durchführung der Versuche erfolgt bei einer Pro-

bentemperatur von 50°C. Das Wasser in dem doppelwandigen Glasbehälter wurde ebenfalls auf 50°C erwärmt. Die Probeneinsatzmenge betrug 100 ml.

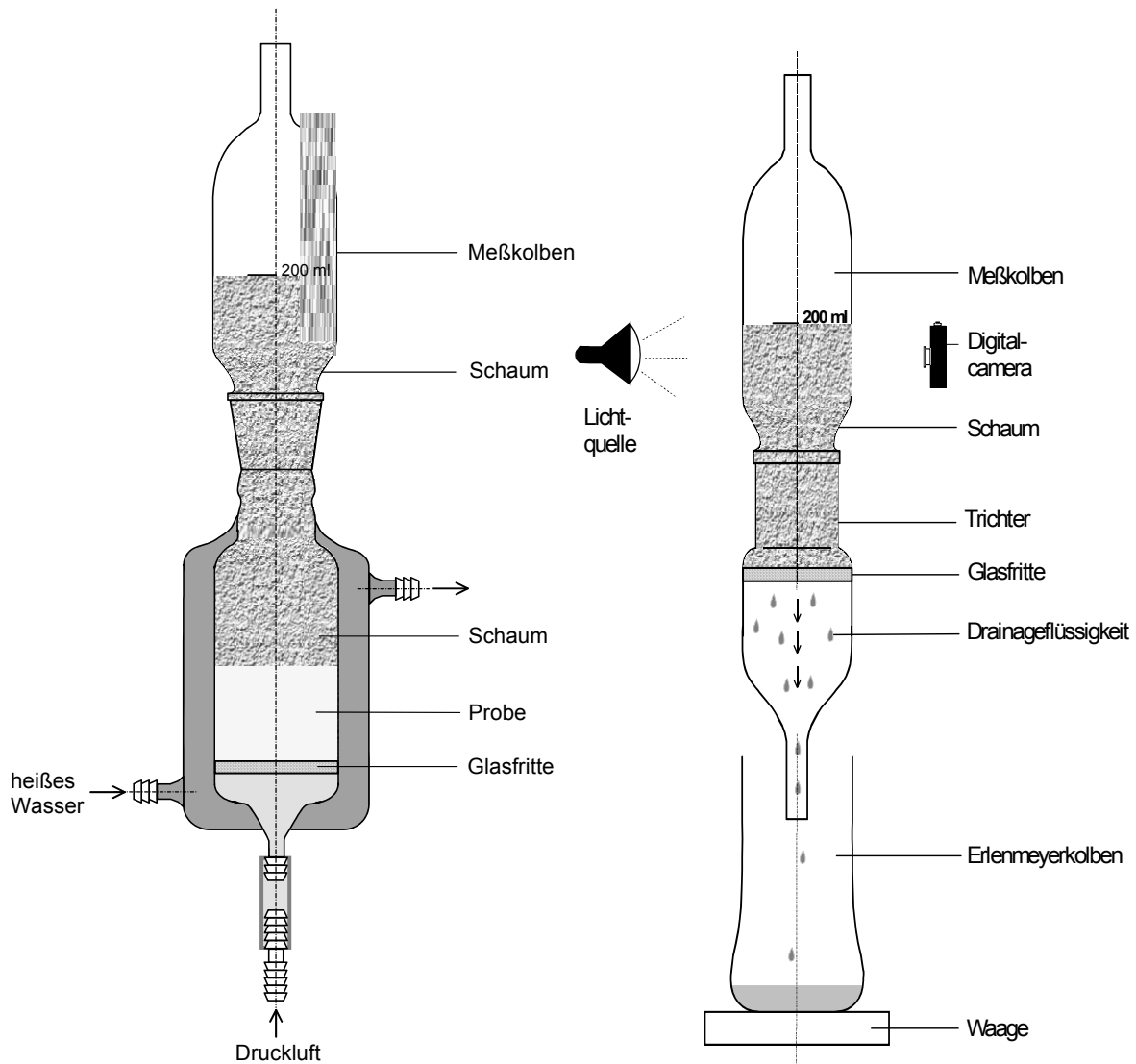


Abb. 11: Schaumbildungsanlage (links) und Messplatz (rechts) nach Borchering (2004)

Die Bestimmung der Präzision der Methode wurde von Borchering (2004) gemäß DIN ISO 5725-1 durchgeführt. Sie erfolgte anhand der Berechnung des Gesamtmittelwertes (\bar{x}), der Wiederhol-Standardabweichung (s_r), der Wiederholgrenze (r) und des Wiederholkoeffizienten ($V(x)$) innerhalb einer Versuchsreihe ($n=8-9$). Die Präzision wurde von Borchering (2004) an Milchproben mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Erhitzung bestimmt. Der Wiederhol-Variationskoeffizient ($V(x)$) der Schaumdichte liegt für alle Milchproben unter 5%, z.B. für 1,5%ige pasteurisierte Milch bei 4,64%. Der Wiederhol-Variationskoeffizient für die Drainage wird von Borchering (2004) nach 1, 10 und 20 Minuten Standzeit angegeben ($V(x)_1$ Minu-

$t_e=5,88\%$, $V(x)_{10 \text{ Minuten}}=1,54\%$, $V(x)_{20 \text{ Minuten}}=1,13\%$. Die Werte variieren aufgrund des exponentiellen Prozesses der Drainage, zu Beginn ist die Drainagezunahme pro Zeiteinheit höher, dadurch ergeben sich größere Streuungen.

Die Bestimmung der Schaumbildungseigenschaften wurde in zweifach entionisiertem Wasser durchgeführt (Ionenaustauschverfahren). Magermilch wurde durch Rekonstitution aus low-heat Magermilchpulver (Firma Nordmilch, Bremen) hergestellt, Vollmilch wurde aus Rohmilch von der Versuchsstation Schädttbeck der BFEL-Kiel hergestellt.

3.5.2. Drainage

Über einer an den Computer angeschlossenen Waage ist der Zylinder mit dem Schaum aufgestellt (vgl. Abb. 11 rechts). Aus ihm tropft das aus dem Schaum herausfließende Serum in einen Erlenmeyerkolben, dessen Gewicht bekannt ist. In Abständen von 30 Sekunden wird die Drainageflüssigkeit gewogen und die Drainage nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Drainage} \quad [\%] = \frac{\text{Masse}_{\text{Drainage}} [\text{g}]}{\text{Masse}_{\text{Schaum}} [\text{g}]} \times 100 \quad (3-1)$$

Zur Berechnung der Drainage ist die Kenntnis der Schaummasse notwendig. Diese wird durch Wiegen des gefüllten Zylinders nach dem Aufschäumen bestimmt (n=3).

Um die Stabilität der Schäume beurteilen zu können, wird bei einem Drainage-Endwert (Drainage [%] nach 20 Minuten Messdauer) von >85% davon ausgegangen, dass der Schaum nicht mehr stabil ist. Obwohl bei einigen Schäumen noch Aufnahmen von den Schäumen gemacht werden können, sind Schäume mit einer Drainage von 85% und höher sehr trocken und bestehen meist aus sehr großen Blasen mit durchscheinenden, d.h. wenig Flüssigkeit enthaltenen Lamellen. Diese Schäume werden als weitgehend instabil eingestuft.

3.5.3. Schaumdichte

Die zu prüfenden Proben setzen sich individuell aus den Teilen der Milch zusammen, deren Eigenschaften betrachtet werden sollen (n=3). Die Berechnung der Dichte [ρ] erfolgt nach Formel 3-2:

$$Dichte_{Schaum} (\rho_{Schaum}) [g / cm^3] = \frac{Masse_{Schaum} [g]}{Volumen_{Schaum} [cm^3]} \quad (3-2)$$

3.5.4. Overrun

Der Aufschlag bzw. Overrun (n=3) wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$Overrun[\%] = \frac{\rho_{Milch} - \rho_{Schaum}}{\rho_{Schaum}} \quad (3-3)$$

Bei abnehmender Schaumdichte kann ein zunehmender Overrun beobachtet werden. Der Overrun wird in dieser Arbeit als Messgröße für die Aufschlagfähigkeit des Proteins verwendet. Die Begriffe „Aufschlagfähigkeit“ und „Overrun“ werden deshalb synonym verwendet.

3.5.5. Digitale Bildanalyse

Der Schaum wird während der Bestimmung der Drainage zu zwei Zeitpunkten fotografiert. Das erste Bild entsteht nach 60 Sekunden und das zweite nach 1200 Sekunden. Die Bilder werden mit einem Bildbearbeitungsprogramm aufgearbeitet (Image-Pro Plus 4.1.0.0., Media Cybernetics USA, 1999), dabei wird mithilfe eines aufgelegten Rasters bei jeder Aufnahme ein gleich großer Bildausschnitt verwendet. Der Ausschnitt wird entzerrt, die Farben invertiert und ein Gaußfilter angewendet. Durch eine Segmentierung werden die Graustufen in Schwarz-Weiß umgewandelt und der Blasenrand nachgezeichnet, so dass die Messung des Durchmessers durchgeführt werden kann.

Der digitalen Aufarbeitung wurde im Gegensatz zu der Arbeit von Borchering (2004) ein Bearbeitungsschritt des gesamten Photos vorangetellt. Durch eine Division des Bildes durch den Hintergrund können Verzerrungen, die durch die Lichtquelle und den Rand des Leuchtstrahls verursacht werden, ausgeschaltet werden (Bilddivision: GreyTrans, Entwicklung von Prof. Dr. Ulrich Sowada, FH Kiel).

Die Größenverteilung der Blasendurchmesser wurde durch Histogrammauswertung bestimmt (SigmaPlot 9.0, Systat Software). Die Blasendurchmesser werden in Größenklassen (Klassengröße $(x) = 0,1 \text{ mm}$, $d_1 < x \leq d_2$) eingeordnet und die Anzahlverteilung berechnet ($n=3$):

$$Q_r(x_i) = \frac{\text{Menge aller Teilchen mit } x \leq x_i}{\text{Gesamtmenge aller Teilchen}} \quad (3-4)$$

3.5.6. Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung der Proteinlösung wurde mit Hilfe der Tropfenkonturanalyse (pendant-drop-method) bestimmt (Kruess Drop Shape Analysis DSA 10, Software: DSA für Windows). Ein Tropfen der Proteinlösung, deren Oberflächenspannung bestimmt werden soll, wird an einer Nadel aufgehängt und die Form des Tropfens mittels digitaler Bildanalyse gemessen. Die Methode beruht auf der Laplace-Gleichung, nach der die Druckdifferenz zwischen Innen- und Außenseite einer Grenzfläche umgekehrt proportional zu den Hauptkrümmungsradien der Grenzflächensegmente ist (Zille 2002). Mittels der Druckdifferenz und dem hydromechanischen Gleichgewicht wird die Gleichung an die Tropfenform angepasst :

$$\gamma = \Delta\rho \cdot g \cdot \frac{l}{\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right)} \quad (3-5)$$

$\Delta\rho$ = Druckdifferenz zwischen Innen- und Außenseite

r_1, r_2 = Hauptkrümmungsradien

g = Erdbeschleunigung

l = Länge des Tropfens

Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Oberflächenspannung von Wasser beträgt bei Raumtemperatur ca. 72 mN/m, die Gleichgewichtsoberflächenspannung von konzentrierten Proteinlösungen beträgt oft um 45 mN/m (Foegeding et al. 2006).

3.5.7. Charakterisierung der Proteolysate mittels FPLC

Die Charakterisierung erfolgte über fast protein liquid chromatography (FPLC, Auftrennung nach Molmasse). Für die Charakterisierung mittels FPLC wurden einprozentige Lösungen der Proteolysate über Membranfilter (Porengröße: 0,20 μm) filtriert und in die Probenschleife (25 μl) eingespritzt. Benutzt wurde ein FPLC-System (Amersham Biosciences, Freiburg) bestehend aus Chromatographie-Controller (LCC-500 plus), 2 Pumpen (P-500), UV-Monitor (UV-M), Fraktionensammler (Frac-100) und Auswerteprogramm FPLC directorTM Version 1.10.

Chromatographische Parameter: Superdex 200 HR 10/30 Säule (Ausschlußgrenze: $1,3 \times 10^6$, Amersham Biosciences, Freiburg), Puffer: 0,1 mol/l Tris; 0,15 mol/l NaCl; 8 mol/l Harnstoff; pH 8,0; Flußrate: 0,3 ml/min; Laufzeit: 100 min; $\lambda=280$ nm.

Standards: Dextranblau (2.000.000 g/mol), Thyreoglobulin (669.000 g/mol), Ferritin (450.000 g/mol), Catalase (232.000 g/mol), Aldolase (158.000 g/mol), alle von Amersham Biosciences, Freiburg; Blutserumalbumin (69.000 g/mol), Ovalbumin (43.000 g/mol), Chymotrypsinogen (25.000 g/mol), β -Lactoglobulin (18.000 g/mol), α -Lactalbumin (14.000 g/mol), Ribonuclease (13.000 g/mol), alle Sigma Chemie, Deisenhofen.

Die Chromatogramme der verwendeten Standards (vgl. Abb. 12 bis Abb. 13) wurden ausgewertet und eine Einteilung der Retentionszeit nach Molmassenbereichen vorgenommen (vgl. Tab. 12).

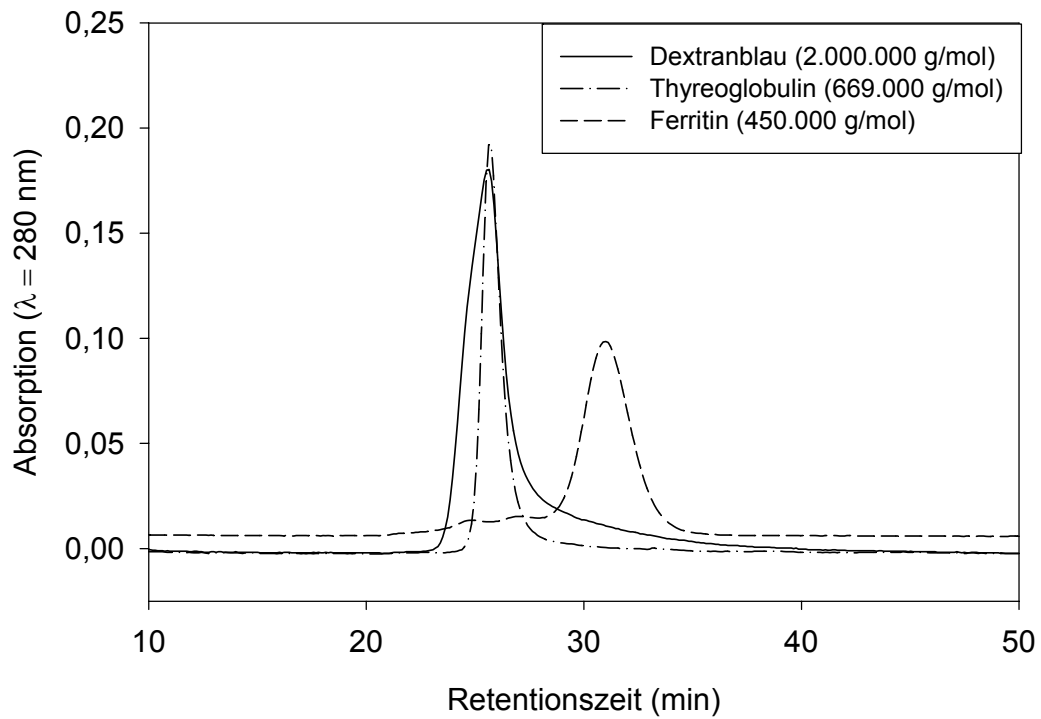


Abb. 12: Größenausschlusschromatogramme (FPLC) hochmolekularer Referenzsubstanzen

Als hochmolekulare Referenzsubstanzen wurden Dextranblau, Thyreoglobulin, Ferritin, Catalase und Aldolase eingesetzt. Die Chromatogramme der hochmolekularen Substanzen sind in Abbildung 12 abgebildet.

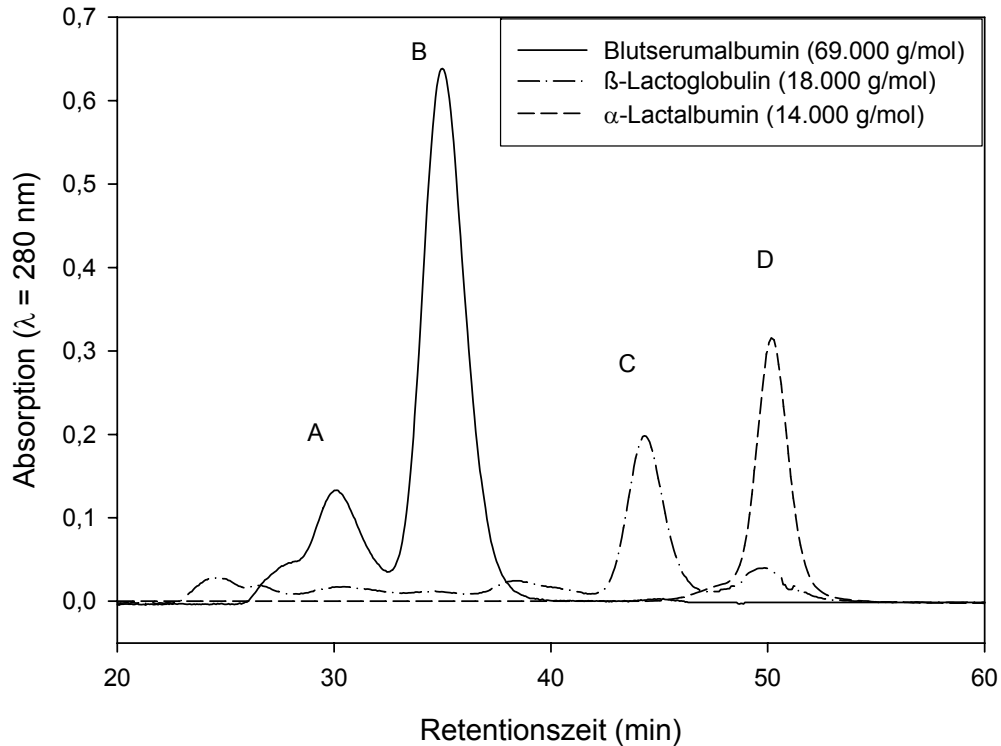


Abb. 13: Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Serumalbumin (Peak A und B), β -Lactoglobulin (Peak C) und α -Lactalbumin (Peak D)

Um den Bereich der niedermolekularen Substanzen zu charakterisieren, wurden BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen, β -LG, α -LA und Ribonuclease als Standards eingesetzt. Abbildung 13 zeigt die Chromatogramme der Milchproteine BSA, β -LG und α -LA. Aufgrund der Retentionszeit der Proteine konnte eine Einteilung der Diagramme in Molmassenbereiche vorgenommen werden (vgl. Tab. 12).

Tab. 12: Einteilung der Retentionszeiten der FPLC-Chromatogramme nach eluierenden Molmassen

Retentionszeit [min]	0-28	28-35	35-40	40-100
Molmasse	> 2.000.000 g/mol	200.000 - 2.000.000 g/mol	20.000 – 200.000 g/mol	< 20.000 g/mol

3.5.8. Charakterisierung der Proteolysate mittels RP-HPLC

Die Charakterisierung mittels RP-HPLC erfolgte über ein System bestehend aus einer HPLC-Pumpe (Merck Hitachi Pump L 7150) und einem Diodenarraydetector (Kontron Diodenarray 440). Die Auswertung erfolgte über die Chromatographie Software Geminix Version 1.91. Als Trennsäule wurde eine RP-18-Säule (LiChroCART 125-4 HPLC Cartridge Superspher 100 RP-18 endcapped) mit Vorsäule (LiChroCART 4-4 LiChrospher 100 RP-18 (5µm)) benutzt. Als Laufmittel A wurde Seralwasser mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt, Laufmittel B bestand aus Seralwasser und Acetonitril (Verhältnis 50:50 v/v) mit 0,1 % TFA (alles Merck, Darmstadt).

Trennbedingungen: Gradient 0-5 min 5 % Laufmittel B, 5-90 min Anstieg auf 90 % Laufmittel B, 100-105 min Abfall auf 5 % Laufmittel B, 105-120 Minuten 5 % Laufmittel B.

Die Detektion erfolgte bei $\lambda=215, 205$ und 280 nm, die Lauflänge betrug 120 Minuten bei 20µl Injektionsvolumen.

Zur Ausfällung der Proteine aus den Proben vor der RP-HPLC-Bestimmung wurde 12,5 mg Sulfosalicylsäure (SSA, Sigma Chemie, Deisenhofen) in Eppendorfgefäßen vorgelegt und 250 µl des Probenmaterials zugegeben. Nach einer Stunde Lagerung bei 6°C wurde die Mischung 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -24°C bis zum Auftragen auf die HPLC gelagert.

3.5.9. Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate mittels SDS-PAGE

Material: Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Natriumazid, Salzsäure (37%), Natriumdodecylsulfat (SDS), Essigsäure (100%, Eisessig), Ethanol (w=96%), Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Merck, Darmstadt); Dithiothreitol (DTT), Bromphenolblau (Serva Blue R), Kerosin, N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg); Acrylamid/Bis-Lösung (Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29/1), Glycerin (Carl Roth GmbH & Co. KG), Standards: α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, α_s -Casein, β -Casein, BSA (alle Sigma Chemie, Deisenhofen).

Methode: Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde nach den VDLUFA Durchführungsvorschriften durchgeführt (VDLUFA Bonn VI 30.6.4., 1996). Die Anlage bestand aus einer Elektrophorese-Einheit (LKB Multiphor II Electrophoresis unit) und einer Stromquelle (Pharmacia Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150) sowie einem Wasserbad zur Kühlung auf 15°C.

3.5.10. Bestimmung von Trockenmasse, Lactose-, Eiweiß- und Aschegehalt

Die Bestimmung des Trockenmassegehaltes bei 102°C und des Aschegehalts bei 550°C erfolgte nach VDLUFA (VDLUFA VI 10.2. bzw. 35.2., 2000). Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes, des Casein- und Molkenproteinstickstoffes und des NPN-Stickstoffes erfolgte nach Kjeldahl (VDLUFA VI 30.2., 30.3. und 30.4., 2000).

Die Bestimmung der Lactose erfolgte mit einem UV-Test zur Bestimmung des Gehalts an Lactose in Lebensmitteln (Lactose / D-Glucose- Test-Kit, Boehringer Mannheim / R-Biopharm). Die Bestimmung des Lactosegehalts in der Probe beruht auf der Umsetzung der Lactose mittels zweier Enzyme. Im ersten Schritt wird Lactose in Gegenwart von Wasser von β -Galactosidase in Glucose und Galactose gespalten. Im zweiten Reaktionsschritt wird Galactose von β -Galactose-Dehydrogenase zu Galacturonsäure oxidiert, wobei NAD^+ in $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidiert wird. Die gebildete NADH-Menge ist der Galactose- und somit der Lactosemenge in der Probe äquivalent. NADH kann photometrisch und die Lactose rechnerisch bestimmt werden.

3.5.11. Sensorische Untersuchungen

Die Prüfung der sensorischen Eigenschaften der Milcheiweißfraktionen und Proteolysate wurde durch die sensorische Arbeitsgruppe der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, durchgeführt (Anzahl der Prüfer: 10). Die Prüfung erfolgte nach DIN 10967-1: Sensorische Prüfverfahren – Profilprüfung – Teil 1: Konventionelles Profil.

Das Vokabular der Geruchs- und Geschmackseigenschaften wurde von der Prüfergruppe in einer Vorverkostung bestimmt, dazu wurden Prüfmuster verwendet, die alle für das Profil qualitativ wichtigen Unterschiede aufweisen. Die Merkmalseigenschaften wurden in der Gruppe diskutiert und ähnliche Begriffe zusammengefasst. Ergebnis der Erstellung der beschreibenden Begriffe waren sieben Merkmalseigenschaften zum Aussehen, acht geruchsbeschreibende und sechs geschmacksbeschreibende Merkmalseigenschaften (vgl. Tab. 13).

Tab. 13: Vokabular der Geruchs- und Geschmackseigenschaften

Aussehen	Geruch	Geschmack
Schaum auf der Oberfläche	Süßlich	Muffig/dumpf
Trübung	Molkig	Wässrig/leer
Gelblich	Stallgeruch	Bitter
Gräulich	Hefig	Hefig
Grünlich	Fruchtig	Seifig
Weißlich	Wässrig/leer	Umami
Flockig	Milchtypisch	
	Kochig	

Die Fraktionen (Casein- und Molkenproteinfraktionen) und Hydrolysate wurden als 1%ige, wässrige Lösung (w/w) angesetzt und unter Rühren 20 Stunden hydratisiert. Zwei Stunden vor der Prüfung wurden die Proben in den Verkostungsraum gestellt und konnten die Raumtemperatur annehmen (20°C).

Die Proben wurden den Prüfern im sensorischen Labor der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, in durchsichtigen Plastikbechern zur Verfügung gestellt, die Probenmenge war gleich (20 ml). Die Proben waren durch dreistellige Zahlenfolgen codiert. Zur Geschmacksneutralisierung wurde Wasser angeboten.

Das sensorische Labor besitzt zehn abgeschirmte Prüfkabinen, die mit Computerterminals versehen sind. Der Prüfer wird aufgefordert eine per Zahlencode genannte Probe zu verkosten, die Reihenfolge der Proben ist zufällig. Die detektierten Geruchs- und Geschmackseigenschaften wurden von den Prüfern auf einer stufenlosen Skala von 1 (sehr schwach erkennbar) bis 5 (sehr stark erkennbar) eingeordnet. Die Auswertung erfolgte über ein Auswertungsprogramm (FIZZ Data 2.00M, Biosystems, Couteron, Frankreich).

3.5.12. Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalyse wurde auf einem automatisch arbeitenden LKB 4151 ALPHA PLUS Aminosäurenanalysator durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Flüssigkeitschromatographieverfahren nach Spackmann et al. (1958). Die Methode wurde nach VDLUFA-Methodenbuch durchgeführt (VDLUFA III 4.11.1., 1997).

Zur Vorbereitung der Proben für die Aminosäurenanalyse wurden die Proben in Glasampullen verbracht, getrocknet und anschließend mit 1 ml 6molHCl/1% Phenol versetzt. Nach Vakuumverschließung unter Stickstoff-Atmosphäre wurden die Proben 24h bei 110°C aufgeschlossen. Das Hydrolysat wurde zweimal mit Seralwasser gewaschen und anschließend bis zu vollständiger Trockenheit getrocknet. Die aufgeschlossenen Proben wurden mit Probenverdünnungspuffer (Natriumcitratpuffer pH 2,2) aufgenommen. Aufgrund der verschiedenen Nettoladungen der Aminosäuren erfahren diese eine unterschiedlich starke Bindung an die Säulenmatrix und werden durch Puffer mit verschiedenen pH-Werten an ihrem isoelektrischen Punkt abgetrennt. Durch Mischung der Probe mit Ninhydrin-Reagens entsteht ein purpurner Farbkomplex, dessen Farbintensität der Menge an Aminosäuren proportional ist. Mittels Lichtabsorption bei Wellenlängen von 440 (Prolin) und 570 nm (alle anderen AS) kann die Intensität bestimmt werden.

Säulenmaterial: Ultrapac 8-Ionenaustauschharz (8 µm-0,5µm, 8% Quervernetzung).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Proteinfractionierung

Ziel der etablierten Verfahren zur Fraktionierung von Proteinen war es, Milchproteinfraktionen mit Lebensmittelqualität im Technikummaßstab herzustellen. Zunächst wurden Caseine und Molkenproteine durch Mikrofiltration getrennt. Zur Fraktionierung der Caseine in β -Casein einerseits und α_S - und κ -Casein andererseits im Technikummaßstab wurde ein Verfahren erarbeitet. Zur Fraktionierung der Molkenproteine in β -Lactoglobulin einerseits und α -Lactalbumin, Rinderserumalbumin und Immunglobuline andererseits wurde ebenfalls ein Verfahren im Technikummaßstab entwickelt. Zur Fraktionierung der minoren Bestandteile der Proteinfraktion (z.B. NPN-Substanzen, Caseinomakropeptid) wurden weitere Verfahren im Technikummaßstab erarbeitet.

Die Fraktionen sollten auf ihre Reinheit und auf ihre technologischen Eigenschaften hinsichtlich der Schaumbildungseigenschaften untersucht werden.

4.1.1. Fraktionierung von Magermilchproteinen in Casein und Molkenproteine mittels Membrantrennverfahren

Durch das Verfahren der Mikrofiltration konnte im nativen Caseinkonzentrat das Verhältnis von Casein zu Molkenprotein deutlich zugunsten des Casein verbessert werden. Der prozentuale Gehalt von Molkenprotein am Gesamtprotein in Rohmilch beträgt ca. 19% (Walstra et al., 2006), er konnte auf ca. ein Viertel des Ausgangsgehalts verringert werden. In Tabelle 14 sind der Gesamtproteingehalt und die Casein- und Molkenproteinanteile in den Fraktionen dargestellt.

Tab. 14: Ergebnisse der Fraktionierung von Magermilchproteinen in Casein- und Molkenprotein mittels Mikrofiltration: Proteingehalt und Verhältnis der Fraktionen Casein und Molkenprotein (Mittelwerte) (Hoffmann W., Johannsen, N., Ströbel, D., 2006, siehe Anlage)

	Gesamtpro- tein [%]	Proteinge- halt i.Tr. [%]	Casein	Molken- protein
Natives Caseinkonzentrat (n=7)	9,9	87,5	95,2	4,8
Natives Molkenproteinkonzentrat (n=4)	8,9	95,9	7,0	93,0
Süßmolkenkonzentrat (n=3)	10,6	88,0	10,7	89,3
Rohmilch (Walstra et al., 2006)	3,6		79	19

Das Verfahren der Mikrofiltration von Magermilch erbrachte auf der Permeatseite eine Molkenproteinfraktion, die nur noch geringe Mengen Casein enthält. Molkenproteine sind in dieser Fraktion stark angereichert (93%) und bilden den Hauptproteinanteil (vgl. Tab. 14).

Das Verfahren zur Süßmolkenproteinanreicherung ergab ein Verhältnis von Casein zu Molkenprotein von 11 zu 89%. Bei der Analyse von Molkenprotein- und Caseinanteil der Fraktion ist zu berücksichtigen, dass das Caseinomakropeptid ebenfalls im Süßmolkenkonzentrat enthalten, jedoch mittels der Casein- und Molkenproteinbestimmung nicht nachweisbar ist. Durch die Einbeziehung des Caseinomakropeptid würde sich der prozentuale Anteil des Caseins im Süßmolkenkonzentrat verringern.

Die Ergebnisse der Fraktionierung mittels Membrantrennverfahren sind in den Kieler Milch-wirtschaftlichen Forschungsberichten veröffentlicht worden (Hoffmann W., Johannsen, N., Ströbel, D., 2006, siehe Anlage). Die Trennergebnisse und der Gesamtproteingehalt sind in Tabelle 14 aufgeführt.

4.1.2. Fraktionierung von Labcasein in β -Casein und α_S -/ ρ - κ -Casein

Zur Gewinnung von β -Casein aus Labcasein wird ein Verfahren angewandt, das auf den Untersuchungen von Pierre und Brule (1981) beruht. Diese beschreiben, dass durch die Kühlung von Milch auf Temperaturen unter 5°C β -Casein aus den Micellen gelöst werde und ein Gleichgewicht zwischen dem micellaren und dem gelösten Casein entstehe. Colloidales Calcium gehe aus der Micelle in die wässrige Phase über und ermögliche damit die Anreicherung von β -Casein in der wässrigen Phase der Milch. Pierre und Brule (1981) beschreiben, dass β -Casein, das bei Kühlung von Milch in monomerer und aggregierter Form außerhalb der Micellen vorliegt, bei höheren Temperaturen über hydrophobe Bindungen an die Micellen gebunden sei (Pierre und Brule, 1981).

Downey und Murphy (1970) beschreiben, dass bei der Kühlung von Milch Teile aller Caseinfraktionen aus den Micellen in einen frei gelösten Zustand übergangen. Der Anteil gelöster Caseine steige durch Kühlung von 5% bei 30°C auf 15% bei 5°C. Die gelösten Caseine beständen nach ihren Untersuchungen zu 46% aus β -Casein, zu 30% aus α_S -Casein und zu 23% aus κ -Casein. Der Anteil an gelöstem β -Casein in der Milch ist nach Pierre und Brule (1981) abhängig von der Konzentration des gesamten Caseins in Milch. Bis zu einer Konzentration von 30g/kg Milch sei der Anteil an nicht-micellarem β -Casein der Menge an Gesamt-Casein proportional, bei höheren Caseinkonzentration sinke der prozentuale Anteil an gelöstem β -Casein

In der Literatur beschriebene Verfahren (siehe Kap. 2.3.1.) wurden auf die Eignung zur Umsetzung im Technikummaßstab untersucht und Versuche zur Optimierung der Parameter zur Lösung des Labcaseins, der optimalen Proteinkonzentration, der optimalen Säure zur Fällung des α_S -/ ρ - κ -Caseins und zur optimalen Gewinnung des β -Caseins vorgenommen.

Reinheit des Labcaseins

Als Ausgangsmaterial zur Fraktionierung wurde Labcasein hergestellt. Die Trennung durch die Labfällung in Molkenproteine einerseits und Caseine andererseits wurde elektrophoretisch überprüft (vgl. Abb. 14).

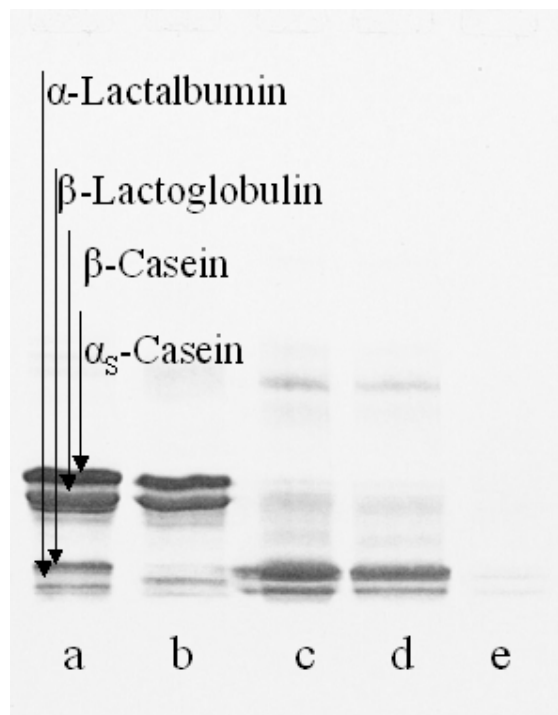


Abb. 14: Elektropherogramme der Fraktionen der Labcasein-Herstellung. a): Ausgangsmilch; b): Labcasein, aufgelöst mit NaOH; c): Labmolke; d): Retentat der Ultrafiltration der Labmolke; e): Permeat der Ultrafiltration der Molke

Die Elektropherogramme (vgl. Abb. 14) zeigen, dass die in der Ausgangsmilch enthaltenen Caseine (obere Banden) im Labcasein enthalten sind, während die Molkenproteine in die Molke übergegangen sind. Nach der Ultrafiltration sind die Molkenproteine im Retentat enthalten, während das Permeat keine Proteine enthält. Das Retentat der Ultrafiltration wurde zur Gewinnung von Molkenproteinkonzentrat mit GMP eingesetzt (vgl. 4.1.1).

Vorversuche zur Optimierung der Parameter in der partiellen Fraktionierung von Caseinen in Lebensmittelqualität

Zur partiellen Fraktionierung von Labcasein in die Fraktionen β -Casein einerseits sowie α_S -Casein und κ -Casein andererseits wurde das Verfahrensprinzip von Le Magnen und Maugas (1991) genutzt. Um Caseinfraktionen in Lebensmittelqualität im Technikummaßstab herstellen zu können, mussten Untersuchungen zur Optimierung des Verfahrens ausgeführt werden.

Die Parameter Temperatur, pH-Wert und Art der Lauge zur Herstellung von Labcaseinlösungen wurden untersucht, Proteinkonzentration und die Wirksamkeit verschiedener Säuren wurden bestimmt, um das Verfahren zu optimieren.

Auflösen von Labcasein

Labcasein wurde mit destilliertem Wasser bei basischem pH und definierter Temperatur gerührt und anschließend gesiebt. Der Anteil an ungelöstem Labcasein wurde bestimmt.

Die Proben wurden auf die Reaktionstemperaturen gebracht (4°C, 20°C, 40°C, 60°C) und anschließend mit 1 mol/l NaOH auf pH 9,0 eingestellt und mehrere Stunden gerührt. Der pH wurde ständig kontrolliert (pH-Stat-System).

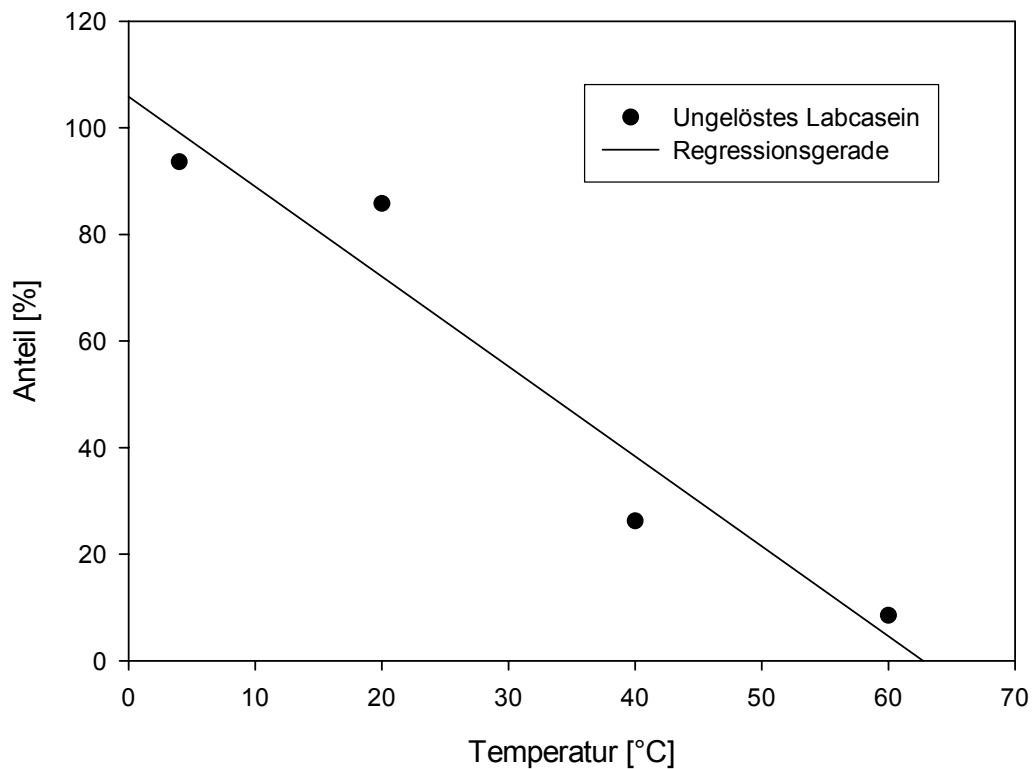


Abb. 15: Anteil an ungelöstem Labcasein in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur

Die Anteil des ungelösten Labcasein sinkt mit zunehmender Reaktionstemperatur (vgl. Abb. 15).

Proteinkonzentration und Säureauswahl

Zur Prüfung der optimalen Proteinkonzentration wurden Labcaseinlösungen mit Proteingehalten von 5 bis 8% eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass Proteinkonzentrationen ab 5% zur Bildung von Gelen führten, die durch Wasserzugabe und Erwärmung lösbar waren. Für die

folgenden Versuche wurde eine Proteinkonzentration von 4% festgesetzt, da in dieser Konzentration keine Gelbildung einsetzte.

Weiterhin wurde der Einfluss des Einsatzes unterschiedlicher Säuren (Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure und Salzsäure) zur isoelektrischen Fällung von α_S -Casein und p - κ -Casein aus Labcaseinlösungen auf die Effektivität der Fraktionierung geprüft. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Milchsäure und Salzsäure zu einer effektiveren Trennung führen als Essig- und Zitronensäure. Essigsäure hinterließ auch einen typischen Essiggeruch in den Fraktionen, wodurch der spätere Einsatz in Lebensmitteln erschwert worden wäre.

Abschließend wurden Parameter für die Übertragung des Verfahrens vom Labormaßstab in den Technikummaßstab erarbeitet. Als Säuren wurden Milch- und Salzsäure eingesetzt.

Gewinnung von Caseinfraktionen im Technikummaßstab

In Abbildung 16 sind die Elektropherogramme der Fraktionierung unter Einsatz von Milchsäure wiedergegeben. Diese machen deutlich, dass mit dem angewandten Verfahren fast reines β -Casein gewonnen werden kann. Das β -Casein präzipitiert aus dem Überstand nach Abtrennung von α_S - p - κ -Casein durch langsames Anwärmen, die Reinheit der β -Casein-Fraktion im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial Labcasein (Abb. 16, Elektropherogramm c) ist auf dem Elektropherogramm f) der Abbildung 16 zu erkennen.

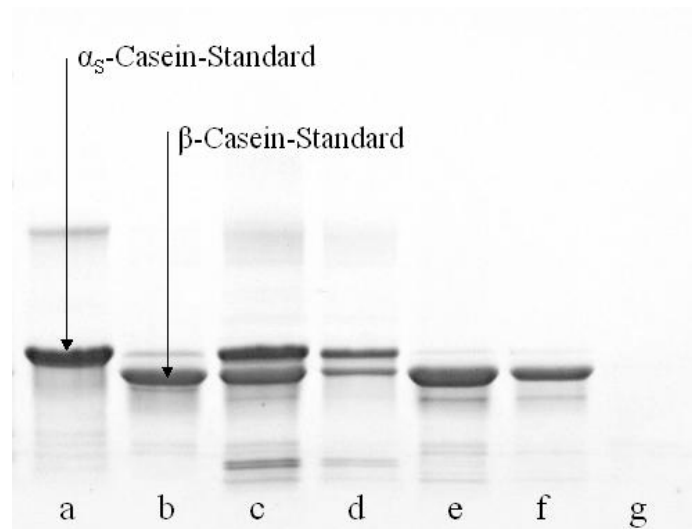


Abb. 16: Elektropherogramme der fraktionierten Caseine (Säuerung mit Milchsäure). a): α_S -Casein-Standard; b): β -Casein-Standard; c): Labcasein mit 1 mol/l NaOH aufgelöst; d): Präzipitat aus Säurefällung (α_S - p - κ -Casein-Fraktion); e): Überstand aus Säurefällung; f): Präzipitat aus der 2. Siebung (β -Casein); g): Filtrat aus der 2. Fällung.

Die prozentuale Ausbeute von β -Casein in Relation zum Gesamtcasein betrug in diesem Versuch 17%. In einem weiteren Technikumversuch mit Salzsäure sollte versucht werden eine noch effektivere Trennung von Niederschlag und Überstand zu erreichen und die Ausbeute zu erhöhen.

Abbildung 17 stellt das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der erhaltenen angereicherten Caseinfractionen dar.

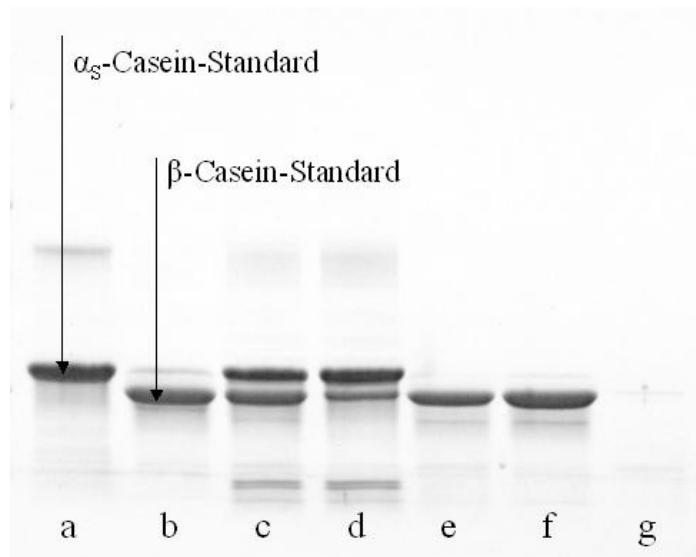


Abb. 17: Elektropherogramme der Proteine aus der Fraktionierung von Caseinen mit Salzsäure. a): α_S -Casein Standard; b): β -Casein-Standard; c): Labcasein mit 1mol/l NaOH aufgelöst; d): Präzipitat aus Fällung mit Salzsäure; e): Überstand aus Fällung mit Salzsäure; f): Präzipitat aus der 2. Siebung; g): Überstand aus der 2. Siebung.

Die Fraktionierung mit Salzsäure ergab eine β -Casein Fraktion, in der nur noch Spuren von α_S -Casein bzw. ρ - κ -Casein zu finden sind (vgl. Abb. 17, Elektropherogramm e), bzw. f)). Im Vergleich zu den mit Milchsäure ausgeführten Untersuchungen ist das gewonnene β -Casein reiner. Auch die Abreicherung von β -Casein in der α_S -/ ρ - κ -Casein-Fraktion (vgl. Abb. 17 d)) ist höher.

Der prozentuale Anteil der β -Caseinfraction am Gesamtcasein betrug in diesem Versuch 26,9% und lag damit erheblich höher als in dem Technikumversuch mit Milchsäure.

In den Tabellen 15 und 16 ist die Zusammensetzung der Hauptinhaltsstoffe der gewonnenen Caseinfractionen wiedergegeben.

Tab. 15: Zusammensetzung der im Technikummaßstab gewonnenen α _S-/p-κ-Casein- und der β-Casein-Fractionen (n=8)

Fraktion	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Gesamtprotein [%] N x 6,38			
α _S -/ p-κ CN-Fraktion	95,33	95,69	0,96
β-Casein-Fraktion	89,53	89,61	3,14
Lactose [%]			
α _S -/ p-κ CN-Fraktion	0,02	0,02	0,01
β-Casein-Fraktion	1,10	1,10	0,38
Asche [%] bei 550°C			
α _S -/ p-κ CN-Fraktion	1,19	1,26	0,24
β-Casein-Fraktion	3,46	3,49	0,44
Trockenmasse [%] bei 102°C			
α _S -/ p-κ CN-Fraktion	98,36	98,20	0,88
β-Casein-Fraktion	97,23	97,86	1,19

Der Trockenmassegehalt der α _S-/p-κ- und β-Fractionen beträgt im Mittel 98,4 bzw. 97,2 %. Die im Rahmen der Fraktionierung durch Alkalisierung (pH 9,0) bzw. Säuerung (pH 4,6) erhaltenen Salze sind zu circa $\frac{3}{4}$ in die β-Casein-Fraktion übergegangen. Die beiden Fraktionen unterscheiden sich im Lactosegehalt. Die Lactose geht bei diesem Fraktionierungsverfahren vollständig in die β-Casein-Fraktion über, der Proteingehalt ist dementsprechend in der α _S-/p-κ-Fraktion höher.

Die Anteile von α _S-/p-κ- bzw. β-Casein am Proteingehalt der Fraktionen wurden nach densitometrischer Auswertung der SDS-PAGE-Elektropherogramme berechnet, die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Anteil von α _S-/p-κ-Casein bzw. β-Casein an den Fraktionen nach densitometrischer Auswertung der Elektropherogramme aus der SDS-PAGE

	Mittelwert	Median	Standardabweichung
α _S -/p-κ-Casein-Fraktion			
α _S -/ p-κ Casein	45,16	47,01	8,96
β-Casein	33,57	34,49	3,21
β-Casein-Fraktion			
α _S -/ p-κ Casein	3,08	2,96	2,71
β-Casein	78,06	79,07	12,47

Die α _S-/p-κ-Casein-Fraktion enthält im Mittel 45,2% α _S-/p-κ-Casein und 33,6% β-Casein. Die β-Casein-Fraktion enthält β-Casein in einer Reinheit von durchschnittlich 78,1% und nur

3,1% α_S - β - κ -Casein. Die β -Casein-Fraktion enthält im kleineren Molmassenbereich (<8.000 g/mol) Peptide, die vermutlich durch Spaltung des natürlich in Milch vorkommenden Enzyms Plasmin erzeugt wurden und der Gruppe der γ -Caseine zugerechnet werden können.

Um eine höhere Reinheit der α_S - β - κ -Casein-Fractionen zu erreichen, wurden die entsprechenden Präzipitate mehrfach mit entmineralisiertem Wasser gewaschen. Die abfiltrierten Präzipitate wurden hierbei nicht nur mit kaltem Wasser gewaschen, sondern unter Rühren in kaltes Wasser gegeben und zwei Stunden gerührt. In der α_S - β - κ -Casein-Fraktion, die zusätzlichen Waschgängen unterzogen wurde, ist im Gegensatz zur Mischprobe aus den herkömmlichen Versuchen ein erhöhter α_S -Casein-Anteil (25%) mittels Densitometrie zu messen. Der Anteil β -Casein hat sich um 3% verringert. Betrachtet man nur die α_S - und β -Caseinbanden des Densitogramms unter Vernachlässigung der sonstigen Proteinbestandteile (Molkenproteine, γ -Caseine), so hat sich der Anteil von α_S -Casein in der Wasch-Fraktion um 4% im Gegensatz zur Mischfraktion erhöht (Wasch-Fraktion: 55,76%, Misch-Fraktion: 51,84% α_S -Casein). Das Waschen hat eine reinere α_S - β - κ -Casein-Fraktion ergeben, jedoch erscheint der Vorteil zu gering um den Zeitaufwand von mehreren Stunden und den Mehrenergieaufwand für die Kühlanlagen zu rechtfertigen.

4.1.3. Verfahren zur partiellen Fraktionierung von Labcasein im Technikummaßstab

Das in der vorliegenden Forschungsarbeit angewandte Verfahren basiert zwar auf der von Le Magnen und Maugas (1991) beschriebenen Methodik, aber dennoch waren erhebliche Vorarbeiten erforderlich, um die für die Gewinnung von angereicherten Caseinfraktionen im Technikummaßstab geeigneten Bedingungen herauszuarbeiten.

Als Ergebnis der umfangreichen Labor- und ausgesuchten Technikumversuche wurden die Parameter für Herstellung der angereicherten Caseinfraktionen wie folgt festgelegt (vgl. Abb. 18):

- Das Labcasein wird gemahlen und in einem temperierbaren Gefäß mit entmineralisiertem Wasser suspendiert. Die Suspension wird unter Rühren auf 60°C erwärmt.
- Das Labcasein wird durch tropfenweise Zugabe von 1 mol/l NaOH bei pH 9,0 und 60°C in Lösung gebracht. Ungelöstes Casein wird abfiltriert.
- Die Lösung wird auf 2°C abgekühlt und bei dieser Temperatur der Zugabe von 10%iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 4,6 eingestellt.
- Die durch die partielle Fraktionierung entstandenen Präzipitate werden durch ein Baumwolltuch (mittlere Maschengröße ca. 0,3mm) filtriert. Das Präzipitat wird dreimal mit vorgekühltem (0°C) entmineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet \Rightarrow (α_S - β - κ -Casein-Fraktion).
- Der Überstand wird über die vorgekühlte (0°C) Tellerzentrifuge von Resten des Präzipitates befreit und langsam auf 40°C erwärmt. Durch die Erwärmung präzipitiert das β -Casein und wird ebenfalls über ein Baumwolltuch (mittlere Maschengröße ca. 0,3mm) abgetrennt und gefriergetrocknet \Rightarrow (β -Casein-Fraktion).



Abb. 18: Verfahrensablauf zur Gewinnung von β -Casein einerseits und α_s - und p - κ -Casein andererseits im Technikummaßstab.

Mit dem in den vorliegenden Untersuchungen optimierten Verfahren kann β -Casein im Technikummaßstab in konzentrierter Form gewonnen werden. Das Ergebnis der partiellen Fraktionierung ist eine Anreicherung von β -Casein in Lebensmittelqualität auf im Mittel 78%.

Die leichte Gewinnung des β -Caseins durch Präzipitation erleichtert die Weiterverarbeitung. Die im Technikummaßstab festgestellte Eigenschaft des β -Caseins bei Temperaturen um 30°C auszuflocken verringert die Menge Material, die weiterverarbeitet, beispielsweise getrocknet werden muss. Während eine Sprüh- oder Gefriertrocknung des gesamten Überstandes, der das β -Casein enthält aufwendig ist, kann das ausgeflockte, an der Oberfläche schwimmende Casein auf einfache Art und Weise abgetrennt und gefriergetrocknet werden.

Die Reinheit des gewonnenen β -Caseins ist mit 78% bezogen auf den gesamten Protein-/Peptidgehalt als hoch einzustufen. Die Ausbeute beträgt im Mittel 41%, berechnet unter der Annahme, das 35% des Gesamtcaseins aus β -Casein besteht (Walstra et al. (2006)).

Tab. 17: Vergleich von Ausbeute und Reinheit des entwickelten Verfahrens mit Daten aus der Literatur

Verfahren	Reinheit β -Casein [%]	Ausbeute β -Casein [%]
Eigenes Verfahren	78	41
Pouliot et al. (1994)	48	?
Le Magnen und Maugas (1991)	90	?
Huppertz et al. (2006)	?	20
Ward und Bastian (1996)	?	55-58,5

Pouliot et al. (1994) erzielten eine Reinheit von 48% (vgl. Tab. 17), diese liegt damit deutlich unter der in den vorliegenden Untersuchungen erzielten Reinheit. Daten zur Ausbeute werden nicht beschrieben.

LeMagnen und Maugas (1991) gehen von einem β -Casein-Gehalt von mehr als 90% bezogen auf den Proteingehalt aus, diese Zahl konnte in eigenen Versuchen nach dem Verfahren nicht bestätigt werden. Das Verfahren von Le Magnen und Maugas wurde zur Verwendung im industriellen Maßstab entwickelt, im Technikummaßstab ist eine Reinheit von 90% mit dem Verfahren nicht erzielbar, weil es ab einer Proteinkonzentration von 5% zur Ausbildung von Caseingelen kommt. Die Autoren sprechen hier von „Suspension oder Lösung mit hohen Proteingehalten von 1-10%, vorzugsweise 4-7%“. Derart hohe Labcaseingehalte sind nicht realistisch, da sie zur Gelbildung führen. In eigenen Versuchen führten Proteingehalte von >4% bei 60°C und pH-Wert 9,0 zu Gelbildung.

Das allen Verfahren zu Grunde liegende Prinzip der β -Casein-Gewinnung beruht darauf, dass β -Casein bei pH 4,6 nicht präzipitiert sondern in Lösung bleibt. Sollten Le Magnen und Maugas (1991) von einer Suspension ausgehen, kann davon ausgegangen werden, dass nicht das gesamte β -Casein in Lösung geht, sondern größtenteils im nicht vollständig gelösten Labcasein vorliegt. In der Literatur wird beschrieben, dass β -Casein bei kalten (0-5°C) Temperaturen teilweise aus der Micelle herausgelöst wird (Downey und Murphy 1970, Pierre und Brule 1981). Je feiner die Suspension des Caseins in Wasser ist, desto größer ist die Oberfläche, an der β -Casein mit dem kalten Wasser in Berührung kommt. Wenn das Labcasein nur grob zerkleinert worden ist, kann die Menge aus dem Caseinkomplex gelösten Caseins nur geringer sein als bei einer vollständigen Lösung. Die Ausbeute wird von Le Magnen und Maugas (1991) nicht beschrieben, bei der Verwendung einer Suspension wird die Ausbeute vermutlich geringer ausfallen als im vorliegenden Verfahren.

Die von Huppertz et al. (2006) erzielte β -Casein-Ausbeute ist mit 20% sehr gering im Vergleich mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren. Ward und Bastian (1996) erzielten in ihrem Verfahren eine höhere Ausbeute als es mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren erreichbar war. Die prozentuale Angabe erfolgte jedoch nur für Versuche in sehr kleinem Maßstab, eine Abnahme im Labormaßstab wird angedeutet, Zahlen werden von den Autoren nicht angegeben. Ein Vergleich der tatsächlichen Ausbeute ist nicht möglich. Die Ausbeute wird aus der Masse der gewonnenen Fraktion berechnet. Aufgrund der Trocknungsmethode

(Desiccator) wird die Trockenheit des Materials angezweifelt und die Vernachlässigung vorhandener Salze von Huppertz et al. (2006) angemahnt.

Durch technische Prozesse und die dabei veränderten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Druck) kann Protein geschädigt werden, indem einzelne Aminosäuren Reaktionen unterliegen (Proteinvernetzung durch Dehydroalaninbildung, Lysinalaninbildung, Furosinsbildung). Die ϵ -Aminogruppe des Aminosäure Lysin ist besonders reaktionsfähig, bei alkalischen pH-Werten treten häufig Verluste im Lysingehalt auf (De Koning und van Rooijen, 1982; Moret et al., 1994; Faist et al., 2000). Der Verlust von Lysin führt zu einer Verminderung des ernährungsphysiologischen Wertigkeit des Proteins („Net protein Utilization“, Belitz et al., 2001), da Lysin nicht mehr für den Körper verfügbar ist.

Um Auswirkungen der Auflösung des Labcaseins bei erhöhten Temperaturen und alkalischen pH-Wert (60°C, pH-Wert 9,0, 120 min) bewerten zu können, wurde durch Aminosäurenanalyse die Menge Lysin und Alanin bestimmt, die in den Fraktionen enthalten sind. Als Vergleichsprobe wurde Natriumcaseinat herangezogen.

Tab. 18: Bestimmung des Gehalts an den Aminosäuren Lysin und Alanin in Natriumcaseinat und den Fraktionen der Fraktionierung aus Labcasein

Probenmaterial	Alaningehalt [%]	Abnahme an Alanin im Vergleich zu Natriumcaseinat [%]	Lysingehalt [%]	Abnahme an Lysin in Vergleich zu Natriumcaseinat [%]
Natriumcaseinat	4,01		6,84	
α_S -/p- κ -Casein-Fraktion	3,31	17,5	6,40	6,4
β -Casein-Fraktion	3,06	24,9	5,65	17,4

Der Gehalt der Aminosäuren war in beiden Proben geringer als im Natriumcaseinat. Durch die Erwärmung bei alkalischem pH-Wert ist eine Abnahme der Konzentration an Lysin und Alanin. Durch die Prozessführung der Fraktionierung von Caseinen aus Labcasein wurde Protein geschädigt.

4.1.4. Partielle Fraktionierung von Natriumcaseinat in β -Casein und α_S - κ -Casein mit Membranfiltration

Die Fraktionierung von Natriumcaseinat in β -Casein einerseits und α_S - κ -Casein andererseits wurde zur Überprüfung der Möglichkeit der Anreicherung von β -Casein mittels Mikrofiltration bei kalten Temperaturen durchgeführt. Das angewandte Verfahren von Murphy und Fox (1991) sollte auf den Einsatz im Technikummaßstab getestet werden.

Aus der partiellen Fraktionierung von Natriumcaseinat in β -Casein durch Mikrofiltration wurde nach Gefriertrocknung ein sehr leichtes, schaumartiges Gebilde gewonnen. Der β -Casein-Gehalt des Ausgangsmaterials und der Fraktionen ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tab. 19: α_S - und β -Casein-Gehalt der durch Mikrofiltration gewonnenen β -Casein-Fraktion im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial ($n=2$, SDS-PAGE)

Protein	α_S -Casein	β -Casein
Natriumcaseinat	43,3	34,3
β -Casein-Fraktion	14,3	85,7

Die mittels der Membranfraktionierung gewonnene β -Casein-Fraktion bestand im Mittel aus 85,7% β -Casein und 14,3% α_S -Casein (densitometrische Bestimmung der SDS-Elektropherogramme, vgl. Tab. 19). Es hat demnach eine deutliche Anreicherung von β -Casein im Permeat nach der Filtration stattgefunden.

Die Ausbeute an β -Casein betrug ca. 14%. Wie bereits bei Murphy und Fox (1991) beschrieben, ist dieses Verfahren damit nicht für die Produktion von größeren Mengen geeignet. Die geringe Proteinkonzentration der Ausgangslösung mit Natriumcaseinat (2%) und die aufwändige Kühlung widersprechen ebenfalls dem Einsatz des Verfahrens zur industriellen Herstellung von β -Casein.

Die Ergebnisse der Fraktionierung von β -Casein mittels Membrantrennverfahren sind in den Kieler Milchwirtschaftlichen Forschungsberichten veröffentlicht worden (Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D., 2006; siehe Anhang).

4.1.5. Fraktionierung von Molkenproteinisolat in β -Lactoglobulin einerseits und α -Lactalbumin, BSA und Immunglobuline andererseits

Ziel der partiellen Fraktionierung von Molkenproteinisolat war eine Anreicherung von α -Lactalbumin, BSA und Immunglobulinen einerseits sowie β -Lactoglobulin andererseits. Die

Produkte sollten zumindest im Technikummaßstab hergestellt werden und Lebensmittelqualität aufweisen.

Es wurden umfangreiche Vorversuche zur Optimierung der partiellen Fraktionierung von Molkenproteinen ausgeführt. So wurde der Einfluss der Substratkonzentration (Molkenproteinisolat), der Säureart (Salzsäure, Milchsäure), der Anwendung von Molkenpermeat statt entmineralisiertem Wasser als Lösemittel für Molkenproteinisolat, der Variation des pH-Wertes und variierender Bedingungen der Zentrifugalbeschleunigung geprüft.

Bestimmung des optimalen Proteingehalts

Um den Einfluss der Substratkonzentration auf die Effektivität der partiellen Fraktionierung von Molkenproteinen zu untersuchen, wurden Proteingehalte von 20-30% untersucht. Laut Pearce (1995) steigt die fällbare Menge an α -Lactalbumin mit der Zunahme des Proteingehaltes der Ausgangslösung an. Er bestimmte eine optimale Proteinkonzentration von 34,0%. Abbildung 19 stellt die Elektropherogramme der Produkte der Fraktionierung in Abhängigkeit vom Ausgangsproteingehalt dar.

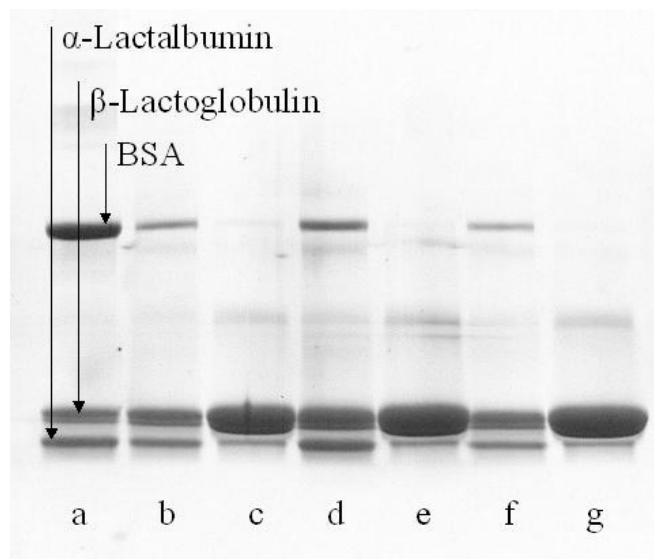


Abb. 19: Elektropherogramme der Molkenproteine aus der Molkenproteinfraktionierung mit 20, 25 und 30% Ausgangsproteingehalt. Elektropherogramm a): Molkenproteinstandard mit von unten nach oben α -LA, β -LG und BSA; b): 20% Molkenprotein (MP), Präzipitat (P); c): 20% MP, Überstand (ÜS); d): 25% MP, P; e): 25% MP, ÜS; f): 30% MP, P; g) 30% MP, ÜS.

Es zeigte sich, dass der β -LG Gehalt im Überstand bei einer Substratkonzentration von 30% höher war als bei 20% bzw. 25% (vgl. Abb. 19, Tab. 20). In der Probe mit 20% Protein in der

Ausgangslösung konnte ein höherer β -LG-Gehalt gemessen werden, als in der Probe mit 25%.

Tab. 20: Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Elektropherogramme der Versuche zur Molkenproteinfraktionierung mit 20%, 25% und 30% Ausgangsproteingehalt.

Probe	β -Lactoglobulin [%]	α -Lactalbumin [%]	BSA [%]
Ausgangsmaterial MPI	62,1	25,5	12,3
30% MPI, Überstand	60,8	17,4	n.n.
25% MPI, Überstand	50,7	17,6	n.n.
20% MPI, Überstand	53,7	18,5	3,1
30% MPI, Bodensatz	45,5	28,0	12,1
25% MPI, Bodensatz	31,9	23,1	14,2
20% MPI, Bodensatz	46,1	30,0	15,6

n.n. = nicht nachweisbar

Der α -LA-Gehalt im Bodensatz ist in der Probe mit 20% Protein im Ansatz am höchsten. Auch die Ausbeute an BSA ist in dieser Probe am höchsten. Die Probe mit 30% Protein zeigte eine starke Tendenz zur Gelbildung während der Erhitzungsphase. Um dies zu verhindern, musste sehr stark gerührt werden, damit die Probe anschließend in Zentrifugationsgefäße überführt werden konnte. Aufgrund der Ausbeute-Ergebnisse (vgl. Tab. 20) und der Tendenz zur Gelbildung bei zu hohem Proteingehalt, wurden die weiterführenden Versuche mit 20%iger Ausgangslösung durchgeführt.

Zugabe von Milchsälen (Molkenpermeat)

Die Abhängigkeit der Fraktionierung von Molkenproteinisolat durch die Zugabe von Milchsälen wurde überprüft. In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass die Ionenstärke einen Einfluss auf die Trennungseigenschaften haben könnte (Pearce, 1983; Pearce, 1995; Bramaud et al., 1997).

Milchsälen wurden in Form von Permeat aus der Ultrafiltration von Süßmolke (aus den Versuchen zur Gewinnung von Molkenprotein in nativer Form mittels Ultrafiltration) zugegeben. Das Permeat der Ultrafiltration enthält die Salze des Ausgangsproduktes Magermilch. Das Molkenproteinisolat wurde im Ultrafiltrat der Molke anstelle von entmineralisiertem Wasser aufgelöst. Die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung und die Versuchsbedingungen wurden wie im Versuch zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration gewählt.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auwertung der Elektropherogramme sind in Tabelle 21 aufgeföhrt.

Tab. 21: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Versuche zur Molkenproteinfraktionierung mit UF-Permeat von Molke. β -LG-Fraktion = Überstand, α -LA-Fraktion = Bodensatz.

Probe (HCl)	β -Lactoglobulin [%]	α -Lactalbumin [%]	BSA [%]
Ausgangsmaterial MPI	62,1	25,5	12,3
30% MPI, UF-Permeat, Überstand	53,83	26,37	10,08
25% MPI, UF-Permeat, Überstand	61,39	21,59	
20% MPI, UF-Permeat, Überstand	56,48	20,61	5,14
30% MPI, UF-Permeat, Bodensatz	58,08	30,11	11,81
25% MPI, UF-Permeat, Bodensatz	52,00	30,78	17,22
20% MPI, UF-Permeat, Bodensatz	44,71	30,45	16,11

Die Ergebnisse der densitometrischen Untersuchung zeigen, dass die β -LG-Fraktion (Überstand) durch die Zugabe von Milchsalden nicht reiner wird, sondern der BSA-Gehalt sogar in zwei Proben zugenommen hat. Der β -LG-Gehalt in der α -LA-Fraktion (Bodensatz) hat im Vergleich zu den Versuchen mit entmineralisiertem Wasser deutlich zugenommen. Ein Zusatz von Milchsalden in Form von UF-Permeat von Molke erscheint aufgrund der Ergebnisse nicht sinnvoll und wird in den folgenden Versuchen nicht weiter verfolgt.

Variation von pH-Wert und Zentrifugalbeschleunigungsbedingungen

Der ideale pH-Wert zur Präzipitierung von α -LA, BSA und IG wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Pearce (1983) beschreibt den optimalen pH-Wert zwischen 4,2 und 4,6, da hier die isoelektrischen Punkte der Molkenproteine lägen (Pearce 1987; Pearce 1995). Bramaud et al. (1997) bezeichnen einen pH-Wert um 4,0 als den pH-Wert mit maximaler Präzipitation. Leman et al. (2004) präzipitieren bei einem pH-Wert von 3,9, Maubois (2001) stellt das Ausgangsprodukt zur Fällung auf einen pH-Wert von 3,8 ein.

Keine der genannten Forschergruppen benutzt als Ausgangsmaterial Molkenproteinisolat. Um mögliche Unterschiede in den Präzipitationseigenschaften unterschiedlicher Rohstoffe (Molkenproteinisolat statt ideale Molke) auszuschließen, wurden pH-Werte von 3,8 bis 4,6 eingestellt, um das Präzipitationsverhalten der 20%igen Molkenproteinisolat-Lösung zu überprüfen.

Die genannten Forschergruppen benutzen zur Trennung von Bodensatz und Überstand Zentrifugen mit unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung. Während Maubois (2001) 60

Minuten bei 7000 x g und nach anschließender Diafiltration bei 30100 x g noch weitere 60 Minuten zentrifugiert, kommen Leman et al. (2004) und Bramaud et al. (1997) mit 30 min und 4000 x g aus, Pearce (1983) zentrifugiert 20 min bei 20000 x g.

Da die Umsetzung dieses Verfahrens im Technikummaßstab erfolgen soll, wurden die Auswirkungen einer Zentrifugalbeschleunigung von 5000 x g und 7000 x g verglichen.

Bestimmung des optimalen pH-Werts

Untersucht wurde das Trennergebnis in Bodensatz und Überstand bei pH-Werten von 3,8 bis 4,6. Mit zunehmendem pH-Wert konnte ein geringerer Anteil Niederschlag und ein höherer Anteil Überstand gemessen werden. Die höhere Zentrifugalkraft (7000 x g) presst mehr Flüssigkeit aus dem Bodensatz als die geringere (5000 x g), es kommt zu einer Abnahme des Bodensatzes und einer Zunahme des Überstandes.

Mittels der densitometrischen Untersuchung können die Anteile der Molkenproteine in Überstand und Niederschlag bestimmt werden. Die Anteile der Proteine im Überstand (β -LG-Fraktion) sind in Tabelle 22 zu sehen, die Anteile der Proteine im Bodensatz in Tabelle 23.

Tab. 22: Anteile der Molkenproteine im Überstand der Zentrifugation bei 5000 und 7000 x g mit pH-Werten von 3,8 bis 4,6.

pH-Wert	α -LA [%]	β -LG [%]	MW 40000 g/mol (vermtl. β -LG- Dimer) [%]	BSA [%]
Überstand, 5000 x g				
3,8	0	82,56	17,55	0
4,0	14,94	73,22	3,1	8,74
4,2	19,31	68,58	11,12	0
4,4	24,34	60,13	11,06	4,46
4,6	27,76	67,17	0	5,07
Überstand, 7000 x g				
3,8	11,83	76,73	11,43	0
4,0	15,74	74,84	9,42	0
4,2	17,06	75,72	7,22	0
4,4	20,24	64,83	9	5,71
4,6	22,57	63,63	6,33	7,47

Anhand der densitometrischen Auswertung der Elektropherogramme ist zu erkennen, dass die β -LG-Reinheit im Überstand (β -LG-Fraktion) mit abnehmenden pH-Wert ansteigt (vgl.

Tab. 22). Die Verunreinigung der β -Lactoglobulin-Fraktion mit α -Lactalbumin nimmt mit der Abnahme des pH-Wertes ab. Die höchste Reinheit ist bei pH 3,8 mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 5000 x g festzustellen. Eine Verbesserung der Reinheit bei der höheren Zentrifugalbeschleunigung ist nicht eindeutig festzustellen.

Tab. 23: Anteile der Molkenproteine im Bodensatz der Zentrifugation bei 5000 und 7000 x g mit pH-Werten von 3,8 bis 4,6.

pH-Wert	α -LA [%]	β -LG [%]	MW 40000 g/mol (vermtl. β -LG- Dimer) [%]	BSA [%]
Bodensatz, 5000 x g				
3,8	33,43	55,24	0	10,97
4,0	32,83	50,86	0	12,23
4,2	32,62	57,21	0	10,17
4,4	28,54	46,78	0	12,58
4,6	31,63	54,06	0	14,30
Bodensatz, 7000 x g				
3,8	35,39	52,12	0	12,49
4,0	34,94	51,59	0	13,47
4,2	33,45	53,00	0	13,55
4,4	27,00	66,57	0,76	16,67
4,6	28,42	57,11	0	14,47

Mittels der densitometrischen Auswertung der Proben des Bodensatzes kann gezeigt werden, dass der β -LG-Gehalt in den Proben mit steigendem pH-Wert tendenziell zunimmt (vgl. Tab. 23). Im α -LA-Gehalt ist eine abnehmende Tendenz zu erkennen. Der BSA-Gehalt nimmt mit abnehmendem pH-Wert ab.

Die Ergebnisse der densitometrischen Untersuchungen zeigen, dass das β -LG im Überstand bei einem pH-Wert von 3,8 oder 4,0 in reinerer Form vorliegt als bei höheren pH-Werten (pH 4,2-4,6). Der geringe Unterschied zwischen den Versuchen mit unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung weist darauf hin, dass eine hohe Beschleunigung, wie in der Literatur angewandt, nicht zwingend notwendig ist. Um diese Vermutung zu erhärten, wurden weitere Versuchsdurchgänge mit pH-Werten von 3,8 und 4,0 bei unterschiedlichen Zentrifugalbeschleunigungen durchgeführt.

Vergleich der Fraktionierungsbedingung pH-Wert 3,8 und 4,0

Nach Auswertung der Ergebnisse wurde eine Doppelbestimmung der beiden günstigsten Ergebnisse (pH 3,8 und 4,0 jeweils bei 5000 x g und 7000 x g) durchgeführt.

Die Auswertung der Anteile von Überstand und Bodensatz (ohne Abbildung) bestätigt das Ergebnis aus vorherigen Versuchen, die Bodensatzmenge nahm bei höherer Zentrifugalbeschleunigung ab. Es ist anzunehmen, dass durch die höhere Zentrifugalkraft (7000 x g) mehr Flüssigkeit aus dem Bodensatz abgepresst wurde als durch die niedrigere (5000 x g).

Tab. 24: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Proteine im Überstand bei pH 3,8 und 4,0 und bei Zentrifugalbeschleunigungen von 5000 und 7000 x g (n=2).

pH-Wert	α -LA [%]	β -LG [%]	MW 40000 g/mol (vermtl. β -LG-Dimer) [%]	BSA [%]
Überstand, 5000 x g				
3,8	6,38	93,09	0	0
4,0	15,22	82,04	2,75	0
Überstand, 7000 x g				
3,8	6,14	92,91	0	0
4,0	14,42	76,03	9,07	0

Die densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Proteine im Überstand zeigt bei einem pH-Wert von 3,8 eine höhere Reinheit des β -Lactoglobulins als bei pH 4,0 (vgl. Tab. 24). Bei den Versuchen mit einem pH-Wert von 4,0 zeigt die densitometrische Auswertung β -Lactoglobulin-Dimere mit einer Molmasse von ca. 40.000 g/mol. Bei beiden pH-Werten müsste β -LG als Octamer vorliegen (vgl. Abb. 3). Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen die Polymere von β -LG bei der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE nur bei pH 3,8 gelöst worden zu sein, bei pH 4,0 ist ein Dimer zu erkennen. BSA ist in allen Proben im Überstand nicht vorhanden sondern vollständig in den Bodensatz übergegangen, der α -Lactalbumin-Anteil ist bei dem höheren pH-Wert mehr als doppelt so hoch.

Ein Unterschied zwischen den beiden Zentrifugalbeschleunigungen ist nicht zu erkennen. In beiden Versuchen ist die β -LG-Ausbeute im Überstand etwa gleich hoch.

Tab. 25: Molkenproteinfraktionierung: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Proteine im Niederschlag bei verschiedenen pH-Werten und Zentrifugalbeschleunigungen (n=2).

pH-Wert	α -LA [%]	β -LG [%]	MW 40000 g/mol (vermtl. β -LG-Dimer) [%]	BSA [%]
Bodensatz, 5000 x g				
3,8	22,66	75,23	0	4,23
4,0	29,93	63,46	0	6,62
Bodensatz, 7000 x g				
3,8	30,11	65,67	0	4,23
4,0	29,47	57,80	0	12,43

Im Bodensatz bewirkt der höhere pH-Wert (4,0) eine Verringerung des β -LG-Gehalts. Der BSA-Gehalt verringert sich bei dem erhöhten pH-Wert (vgl. Tab. 25).

Eine eindeutige Auswirkung der höheren Zentrifugalbeschleunigung auf die Trennung ist im Bodensatz nicht eindeutig erkennbar.

Aufgrund der höheren Reinheit der β -LG-Fraktion bei einem pH-Wert von 3,8 wurden die folgenden Fraktionierungen bei diesem pH-Wert durchgeführt. Die α -LA-Fraktion (Bodensatz) enthält neben α -Lactalbumin die Proteingruppen BSA und IG, so dass eine höhere Reinheit der β -LG-Fraktion als Zielvorstellung sinnvoller erscheint, als eine möglichst große Eliminierung von β -LG aus der α -LA-Fraktion.

4.1.6. Verfahren zur partiellen Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Technikummaßstab

Als Resultat der Vorversuche wurde das Verfahren zur partiellen Fraktionierung von β -Lactoglobulin einerseits und α -Lactalbumin, BSA und IG andererseits - wie in Abbildung 20 dargestellt - festgelegt. Dabei ermöglichte der Einsatz von Molkenproteinisolat als Substrat gegenüber dem Verfahren von Maubois et al. (2001), dass nunmehr sowohl auf die Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung der Molkenproteine als auch auf die Säuerung zur Ausfällung restlicher Caseine verzichtet werden kann.

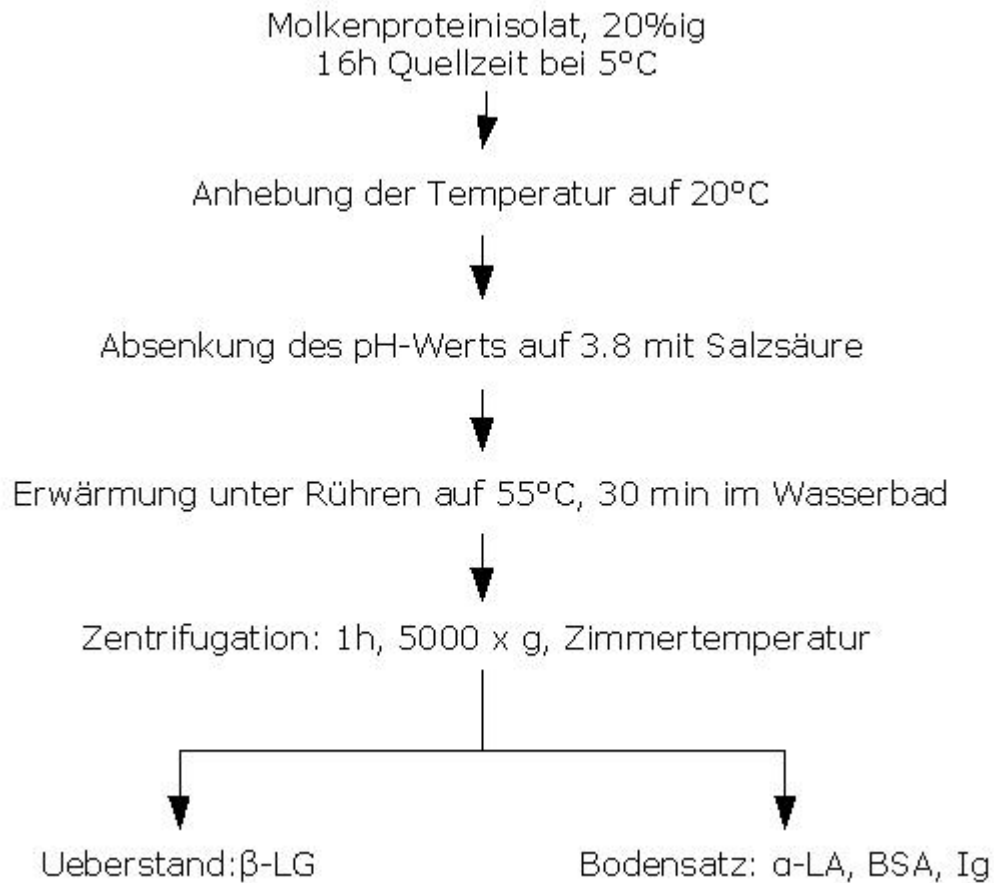


Abb. 20: Verfahrensablauf zur partiellen Fraktionierung von Molkenproteinisolat in β -LG einerseits sowie α -LA, BSA und IG andererseits

Die mit diesem Verfahrensablauf gewonnene β -Lactoglobulin-Fraktion besteht zu 98% aus β -Lactoglobulin (SDS-Page, vgl. Tab. 26) und enthält weniger als 2% α -Lactalbumin, BSA ist vollständig in die α -Lactalbumin-Fraktion übergegangen.

Tab. 26: Ergebnisse der Hauptversuche zur Molkenproteinfraktionierung (SDS-PAGE, $n=2$)

	Ausgangsmaterial Molkenproteinisolat	α -LA-Fraktion (Bodensatz)	β -LG-Fraktion (Überstand)
β -Lactoglobulin [%]	62,1	54,1	98,3
α -Lactalbumin [%]	25,5	24,1	1,6
BSA [%]	12,3	21,5	0,0
Trockenmasse [%]	97,2	97,9	94,1
Gesamteiweißgehalt	90,2	92,0	86,1
Asche	1,9	1,3	6,2
Lactose	0,01	0,1	0,1

Mit der in den vorliegenden Untersuchungen entwickelten Methode konnten 70 % des eingesetzten β -LG in der β -LG-Fraktion wiedergefunden werden (vgl. Tab. 27). In der α -LA-Fraktion betrug die Ausbeute an α -LA über 70% des im Ausgangsmaterial eingesetzten α -LA. 100% des BSA werden in der α -LA-Fraktion wiedergefunden. Der Gehalt von 54,1% β -LG in der α -LA-Fraktion zeigt, dass das Verhältnis von α -LA zu β -LG in der Fraktion zugunsten des α -LA verschoben ist. β -LG ist das Hauptmolkenprotein im Ausgangsmaterial, der Anteil ist in der α -LA-Fraktion stark verringert worden.

Tab. 27: Ausbeute (n=2) der Molkenproteinfraktionierung (Anteil der Proteine in den Fraktionen am Ausgangsmaterial; SDS-Page)

	Anteil am Gesamtmaterial [%]*	β -Lactoglobulin [%]	α -Lactalbumin [%]	BSA [%]
α -LA-Fraktion (Bodensatz)	33,6	15,6	71,3	58,8
β -LG-Fraktion (Überstand)	37,3	70,4	2,3	0,00

*Verluste zu 100% durch Sprühtrocknung, Abnahme von Probenmaterial zur Untersuchung

Der Einsatz von Molkenproteinisolat als Ausgangsmaterial zur Fraktionierung ist möglich. Da die Löslichkeit von Molkenproteinen in Wasser sehr hoch ist, können Lösungen mit hoher Proteinkonzentration eingesetzt werden und das Produktionsvolumen im Gegensatz zum Einsatz von „Idealer Molke“ (Maubois et al., 2001) oder Molkenproteinkonzentrat (Lucena et al., 2007) deutlich verringert werden.

Die Reinheit der β -LG-Fraktion, die durch das Verfahren des peptischen Abbaus von α -LA gewonnen werden kann, beträgt über 99% im Labormaßstab und ca. 95% im Technikummaßstab (Konrad und Lieske, 1997; Konrad et al., 2001). Nachteil des Verfahrens ist die Hydrolyse von α -LA.

Die Gewinnung von α -LA in möglichst reiner Form aus Molke ist von großem Interesse, da zur Produktion von Säuglingsnahrung häufig Kuhmilchprotein verwendet wird (Lindberg et al., 1998). Die Zusammensetzung von Humanmilch unterscheidet sich jedoch von Kuhmilch grundsätzlich darin, dass β -LG nicht Bestandteil von Humanmilch ist, α -LA dafür in höheren Mengen vorhanden ist (Lucena et al., 2007). In der Allergenforschung wird β -LG die höchste Allergenität aller Milchproteine zugesprochen, besonders Kinder sind häufig allergisch gegen β -LG (Lindberg et al, 1998).

Das im Bodensatz enthaltene α -Lactalbumin kann nach Bramaud et al. (1997) weiter aufgereinigt werden, um es für den Einsatz in Säuglingsnahrung usw. nutzbar zu machen. Die Autoren beschreiben, dass durch Waschungen mit NaCl-Lösungen bei niedrigem pH-Wert (pH 3,9) das enthaltene β -LG ausgewaschen werden kann. Durch die Zugabe von CaCl_2 könne das Aggregat aus α -LA, IG und BSA teilweise wieder gelöst werden, nur die Immun-

globuline könnten nicht wieder gelöst werden. Nach Zentrifugation verblieben α -LA und BSA in der Fraktion.

Pearce (1995) erreicht durch seinen Verfahrensweg, in dem er von Käseolke ausgeht, eine Anreicherung von β -Lactoglobulin auf 70%. In der Fraktion sind ca. 26% Peptide zu finden, die aus Casein bei der Labfällung entstanden sind. Durch Verwendung von Molkenproteinisolat kann die Verunreinigung durch Caseinbruchstücke ausgeschlossen werden, die Reinheit der β -LG-Fraktion ist deutlich höher.

Bramaud et al. (1997) gelingt es durch die Verwendung von Citrat (Calciumcitrat, Zitronensäure), die Komplexbildung von α -LA, BSA und IG bereits bei Temperaturen von 35°C auszuführen. Das Ausgangsmaterial Molkenproteinkonzentrat (WPC) enthält Lactose, der β -LG-enthaltende Überstand wird durch UF von der Lactose gereinigt. Die Reinheit und Ausbeute des Verfahrens werden nicht beschrieben.

Lucena et al. (2007) verfolgen den Verfahrensweg von Bramaud et al. (1997) im kleinen Maßstab (2 Liter) mit verschiedenen Citratkonzentrationen, Säuren und Ausgangsmaterialien. Als optimales Ausgangsmaterial wird Molkenproteinkonzentrat (65% Protein) bestimmt, die Temperaturen während der Aggregation sind höher als bei Bramaud et al. (1997). Als optimale Säure zur Präzipitation wird Zitronensäure in Präsenz von Ca^{2+} bestimmt. Die Reinheit und Ausbeute der gewonnenen Fraktionen wird von den Autoren nicht diskutiert, kann daher nicht mit der Reinheit und der Ausbeute in dem vorliegenden Verfahren verglichen werden.

Maubois et al. (2001) beziffern die Ausbeute an α -LA in der Bodensatz-Fraktion als <70%, die Reinheit des β -LG als >99% (RP-HPLC). Das Verfahren von Maubois et al. (2001) wurde im vorliegenden Verfahren deutlich vereinfacht (vgl. Abb. 21). Die Schritte zur Herstellung der „Idealen Molke“, Lactose-Entfernung und Restcasein-Entfernung konnten eingespart werden. Die Zentrifugation nach der Aggregation von α -LA, BSA und Immunoglobulinen erwies sich bei 5000 x g als ausreichend, um eine Fraktion mit einer Reinheit von >98% herzustellen. Eine Zentrifugation mit 30100 x g erscheint im Technikummaßstab nicht umsetzbar und der Aufwand nicht gerechtfertigt, um eine nur gering höhere Reinheit zu erzielen.

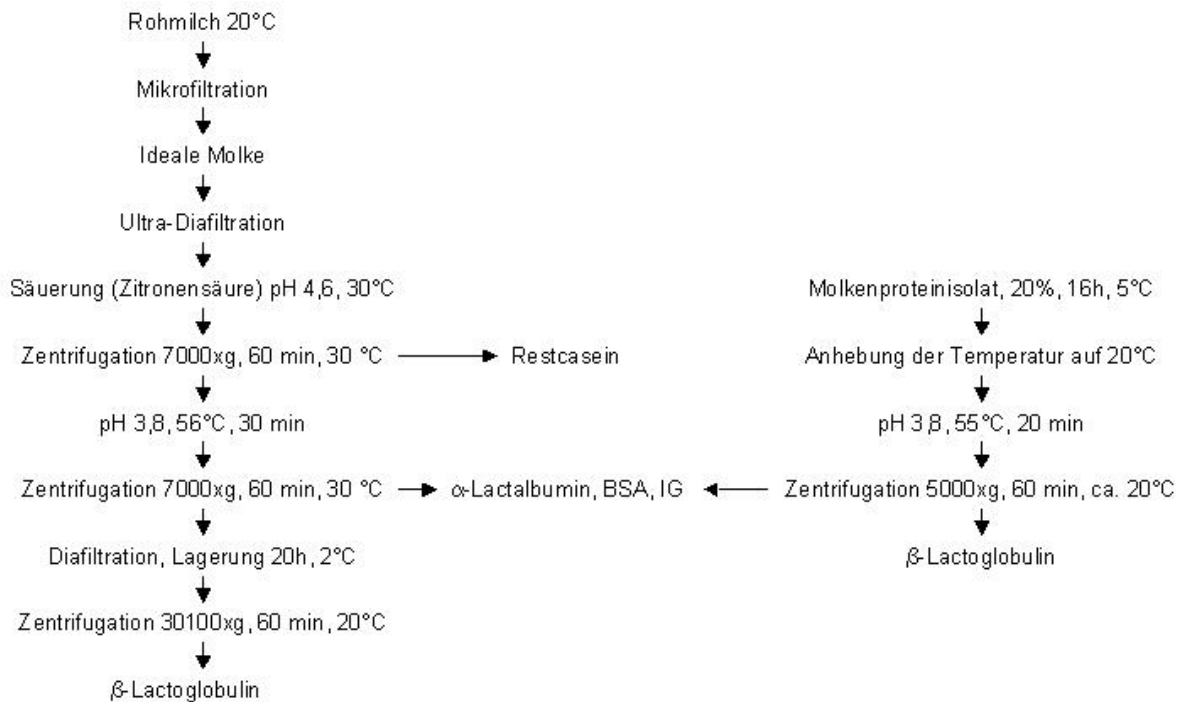


Abb. 21: Vergleich der Verfahrensschritte des Verfahrens nach Maubois et al. (2001, links) und des entwickelten Verfahrens (rechts)

Mit dem in den vorliegenden Untersuchungen optimierten Verfahren kann β -Lactoglobulin im Technikummaßstab in konzentrierter Form gewonnen werden. Das Ergebnis der partiellen Fraktionierung ist eine Anreicherung von β -Lactoglobulin in Lebensmittelqualität auf im Mittel >98% (vgl. Tab. 26).

4.1.7. Anreicherung von NPN-Substanzen aus Magermilch mittels Ultrafiltration und partieller Lactosekristallisation

Die Fraktionierung von Magermilch mit Membranfiltration der Porengröße NMWCO 10.000 g/mol und 5.000 g/mol wurde durchgeführt, um NPN-Substanzen anzureichern. Nach der Fraktionierung wurden dem Permeat durch Verdampfung Wasser entzogen und die Lactose nach Animpfung partiell auskristallisiert.

Das Ergebnis der Ultrafiltration von Magermilch mit einer Membran der Ausschlussgröße 10.000 g/mol wurde densitometrisch (SDS-PAGE) ausgewertet. Die densitometrische Auswertung der Elektropherogramme ergab, dass im Permeat noch Molkenproteine vorhanden waren (vgl. Tab. 28). Im Retentat sind die Caseine im Vergleich zur Ausgangsmilch leicht aufkonzentriert. Die α -Lactalbumin-Konzentration ist jedoch deutlich geringer als in der Ausgangsmilch.

Tab. 28: Auswertung der Densitometrie der Elektropherogramme der NPN-Fraktionierung.

Fraktion	α_S -Casein [%]	β -Casein [%]	κ -Casein [%]	α -La [%]	β -LG [%]
Ausgangsmilch	22,44	36,98	11,86	9,79	15,93
Retentat	25,04	38,24	10,79	6,53	14,12
Retentat n. DF	25,54	38,67	13,07	4,25	15,64
Permeat	n.n.	n.n.	n.n.	43,69	56,31
Permeat n. DF	n.n.	n.n.	n.n.	57,58	43,42
Permeatkonz.	n.n.	n.n.	n.n.	48,90	48,10
Permeatkonz. n. Z.	n.n.	n.n.	n.n.	52,14	47,86

Abkürzungen: n. DF: nach Diafiltration; n. Z.: nach Zentrifugation; n.n. = nicht nachweisbar

Die Größenausschlusschromatogramme (vgl. Abb. 22) machen deutlich, dass die Caseinfraktionen der Ausgangsmilch vollständig in das Retentat übergegangen sind. Auch β -Lactoglobulin (Peak C) ist zum größten Teil im Retentat wiederzufinden, α -Lactalbumin allerdings nur zu einem geringen Teil (Peak D). Das Permeat enthält neben den NPN-Substanzen noch relativ hohe Gehalte an α -Lactalbumin, das die Membran aufgrund der geringen Molmasse und der Tertiärstruktur überwinden konnte.

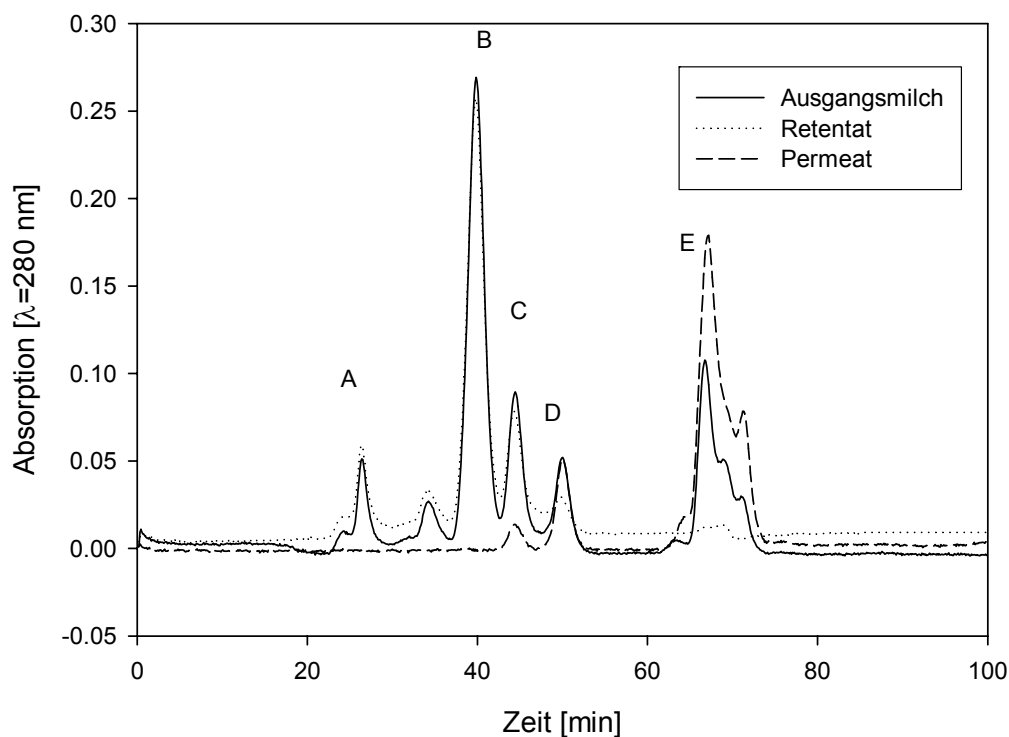


Abb. 22: Größenausschlusschromatogramme der Ausgangsmagermilch sowie des Retentats und Permeats nach Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol). A: Molmassen bis 2.000.000 g/mol, B: Caseine, C: β -Lactoglobulin, D: α -Lactalbumin, E: NPN-Substanzen.

Tabelle 29 gibt die Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und Abtrennung der kristallisierten Lactose wieder.

Tab. 29: Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und Abtrennung der kristallisierten Lactose

Parameter	Trockenmasse [%]	Asche [%]	NPN [%]	Lactose [%]
Messwert	30,5	4,93	0,26	20,95

Die Addition der Werte für Asche, NPN und Lactose ergibt einen Wert von ca. 26 %. Bei einer Trockenmasse von 31 % kann davon ausgegangen werden, dass im Permeat noch in etwa zu 4 % Molkenproteine, überwiegend α -Lactalbumin, enthalten sind. Um die Molkenpro-

teine quantitativ abzutrennen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe zur Ultrafiltration eine Membran mit einer mittleren nominalen Trenngrenze von 5.000 g/mol eingesetzt.

Die densitometrische Auswertung der SDS-PAGE (ohne Darstellung) sowie der Größenausschlusschromatogramme (vgl. Abb. 23) der Ultrafiltration von Magermilch mit einem Membranfilter der Ausschlussgröße 5.000 g/mol haben ergeben, dass ein vollständig proteinfreies Permeat gewonnen werden konnte. Der Nachweis erfolgte über die FPLC (vgl. Abb. 23). Auf dem Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass die NPN-Fraktion nur Substanzen im Größenbereich von NPN-Substanzen enthält, Proteine konnten nicht detektiert werden.

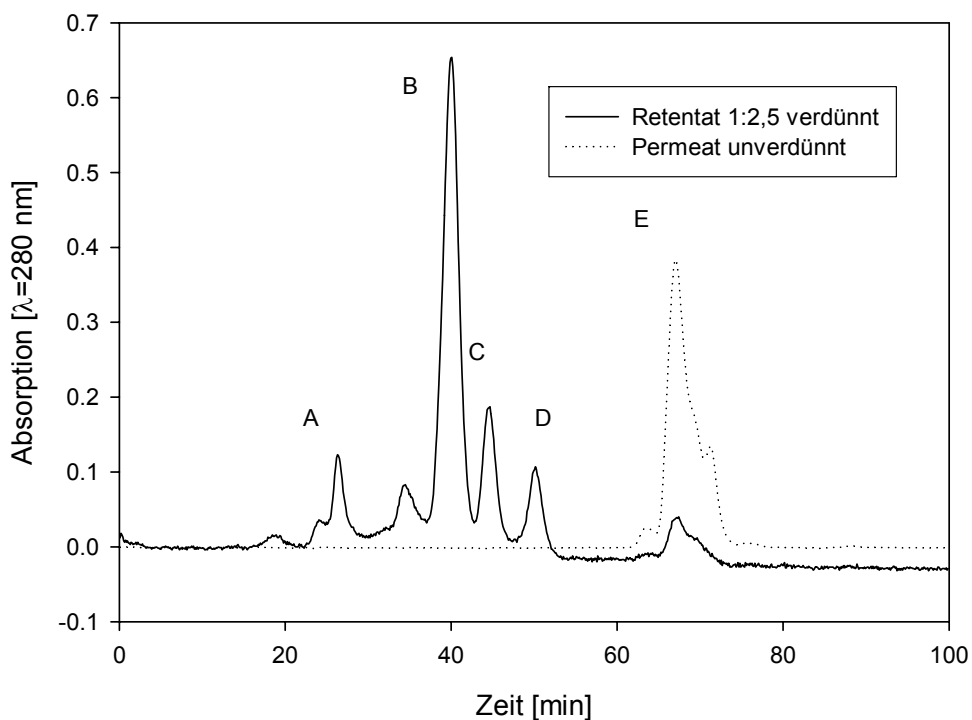


Abb. 23: Größenausschlusschromatogramme von Magermilchretentat und -permeat nach Ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol). A: Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B: Caseinmonomere (in etwa 20.000 g/mol), C: β -Lactoglobulin, D: α -Lactalbumin, E: NPN-Substanzen

Tabelle 30 gibt die Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und partieller Abtrennung der kristallisierten Lactose wieder.

Tab. 30: Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und partieller Abtrennung der kristallisierten Lactose

Parameter	Trockenmasse [%]	Asche [%]	NPN [%]	Lactose [%]
Messwert	38,76	4,89	0,26	25,79

Das Endsubstrat enthält große Mengen an Lactose (26%, vgl. Tab. 30). Ca. 50% der nach dem Eindampfen enthaltenen Lactose konnten durch langsames Auskühlen (ca. 1°C/h) entfernt werden. Weitere Auskristallisation könnte durch längere Auskühlungszeiten erreicht werden. Es ist jedoch nicht möglich, die gesamte Lactose zu entfernen.

4.2. Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinen

Die enzymatische Hydrolyse von Milchproteinen mit verschiedenen Proteasen wurde vorgenommen, um zu prüfen, ob sich die Schaumbildungseigenschaften der Milchproteine verbessern. Zur Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften wurde Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin hydrolysiert, die angereicherten Proteinfractionen β -LG und β -Casein wurden mit Trypsin, Pepsin und Alcalase hydrolysiert.

4.2.1. Enzymatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat

Die Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin und α -Chymotrypsin wurde im Technikummaßstab durchgeführt. Die Zusammensetzung der Proteolysate nach Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin und Membrantrennung ist in Tabelle 31 dargestellt.

Tab. 31: Zusammensetzung der Proteolysate nach enzymatischer Hydrolyse und Fraktionierung mit Hilfe der Ultrafiltration (NMWCO=10.000 g/mol)); Permeate nach Sprühtrocknung, Retentate nach Gefriertrocknung

Fraktion	Gesamt-Stickstoff [%]	NPN (f=3,6) [%]	Asche [%]	TM [%]
Chymotryp. Retentat Molmasse > 10.000 g/mol	14,60	1,68	2,35	99,19
Chymotryp. Permeat Molmasse < 10.000 g/mol	13,61	5,47	4,58	94,51
Tryp. Retentat Molmasse > 10.000 g/mol	13,85	4,97	3,57	98,22
Tryp. Permeat Molmasse < 10.000 g/mol	13,60	11,77	5,38	94,07

Die Analyse der Proteolysatfraktionen aus dem ersten Ultrafiltrationsschritt zeigt, dass die Fraktionen hohe Gehalte an Nicht-Protein-Stickstoff enthalten (NPN, vgl. Tab. 31). Der hohe Gehalt an Nicht-Protein-Stickstoff ist auf die enzymatische Hydrolyse zurückzuführen. Im Rahmen der Proteolyse entstehen kleine Peptide, die mit 12%iger TCA nicht fällbar sind (Renner und Ömeroglu, 1972). Durch das Verfahren der NPN-Stickstoffbestimmung nach vorheriger Ausfällung mit TCA werden die Peptide als NPN-Substanzen erkannt.

Die Molmassenverteilung der Proteolysate, die mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie charakterisiert wurde, ist in den Abbildung 24 bis Abbildung 28 dargestellt.

Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin

Abbildung 24 macht deutlich, dass β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin durch Trypsin (Abb. 24, Peak A, B und C) fast vollständig abgebaut wurden. Es sind überwiegend Produkte mit Molmassen unterhalb der Größe von α -LA entstanden (< 14.000 g/mol). Eine Inkubation von 3-5 Stunden hat zu einer vollständige Hydrolyse der Molkenproteine geführt.

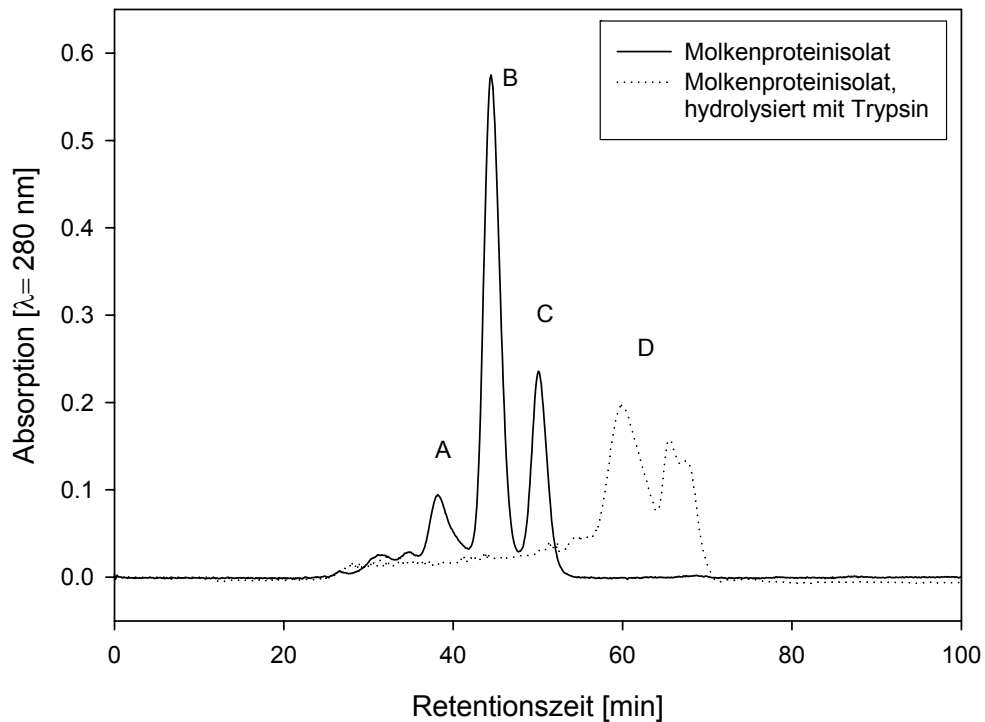


Abb. 24: Größenausschlusschromatogramme von Molkenproteinisolat vor und nach Hydrolyse mit Trypsin. A: β -Lactoglobulin-Dimer, B: β -Lactoglobulin-Monomer, C: α -Lactalbumin, D: Molmassen < 14.000 g/mol

Nach der Trennung des tryptischen Hydrolysats mit Hilfe der Ultrafiltration (NMWCO = 10.000 g/mol) enthält das Retentat Produkte mit Molmassen von 10.000 bis 2.000.000 g/mol, wohingegen im Permeat Peptide mit Molmassen unterhalb der Größe von α -Lactalbumin (14.000 g/mol), überwiegend auch deutlich kleinere Peptide enthalten sind (Abb. 25).

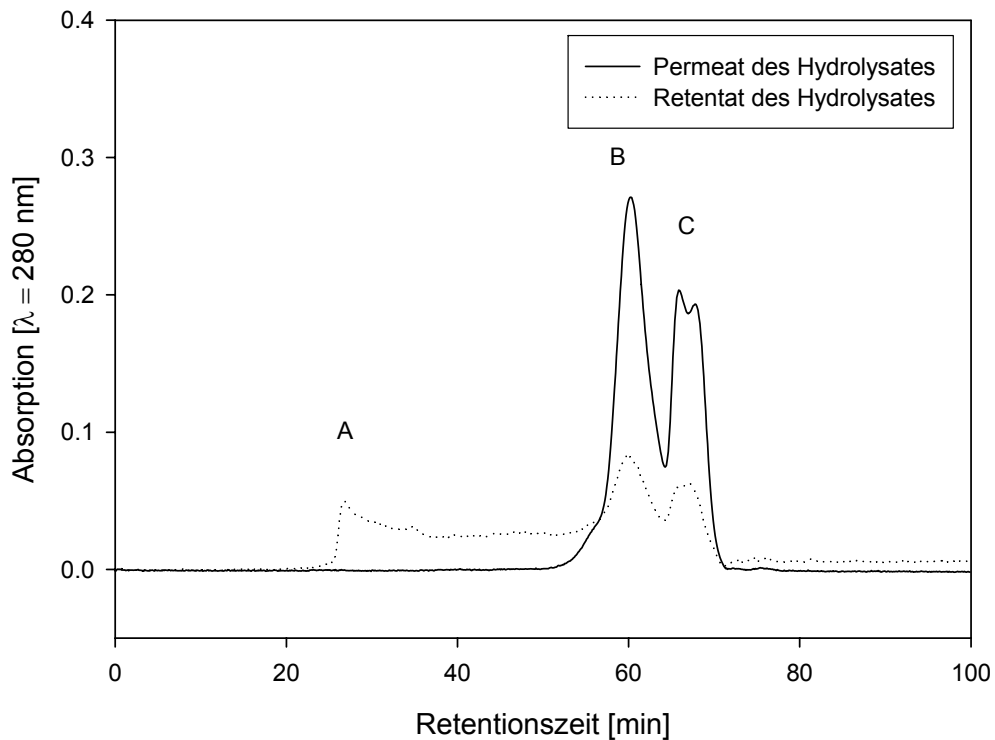


Abb. 25: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des tryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat nach Ultrafiltration (NMWCO=10.000 g/mol). A: Substanzen mit einer Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B und C: Substanzen mit Molmassen <14.000 g/mol

Die Permeat- und Retentatfraktionen des tryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat wurden weiterhin mit Hilfe der Reversed-Phase HPLC untersucht, sie unterscheiden sich in den Elutionszeiten der Peaks kaum voneinander (ohne Abbildung).

Das Ergebnis des zweiten Ultrafiltrationsschritts mit einem NMWCO von 5.000 g/mol findet sich in Abbildung 26. Das Größenausschlusschromatogramm zeigt für beide Fraktionen Peptide im gleichen Größenbereich (Peak A und B), eine Auftrennung in Fraktionen unterschiedlicher Peptidgrößen hat nicht stattgefunden. Den Abbildungen ist zu entnehmen, dass durch die Hydrolyse größtenteils Peptid-Fragmente mit Molmassen <14.000 g/mol entstanden sind (Abb. 24 und Abb. 25). Die Trenngrenze bei Membranfiltrationen wird von den Herstellern als „mittlere Trenngrenze“ angegeben. Moleküle mit Tertiärstruktur könnten aufgrund einer globulären Form trotz höherer Molmasse diese Trenngrenze passieren (vgl. Kap. 4.1.7).

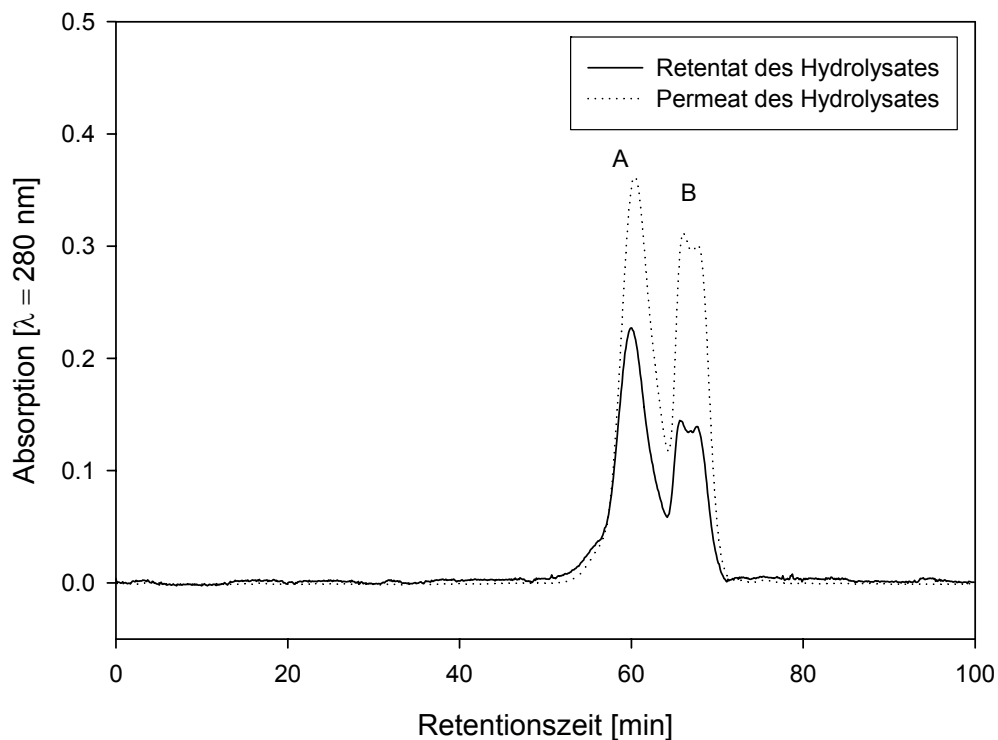


Abb. 26: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des tryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat nach Ultrafiltration (NMWCO=5.000 g/mol).

Anhand der RP-HPLC-Chromatogramme der mittels der UF-Filtration mit einer mittleren Trenngrenze von 5.000 g/mol gewonnenen Fraktionen ist keine Unterscheidung der Eigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität möglich (ohne Abbildung). Beide Fraktionen besitzen Peptide unterschiedlicher Hydrophobizität und Molmasse, die über die gesamte Messzeit eluiert werden.

Die Trocknungsart (Lyophilisation vs. Sprühtrocknung) hat keinen Einfluss auf die Anzahl und die Elutionszeit der Peptide in den Permeaten des tryptischen Hydrolysats von Molkenproteinisolat nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol (ohne Abbildung).

Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit α -Chymotrypsin

Durch die chymotryptische Hydrolyse wurde überwiegend β -Lactoglobulin hydrolysiert, wohingegen α -Lactalbumin (Peak C) nach der Hydrolyse noch in annähernd gleicher Konzentration wie im Ausgangsmaterial vorhanden war. In Peak D waren die Spaltprodukte der Proteolyse enthalten (vgl. Abb. 27).

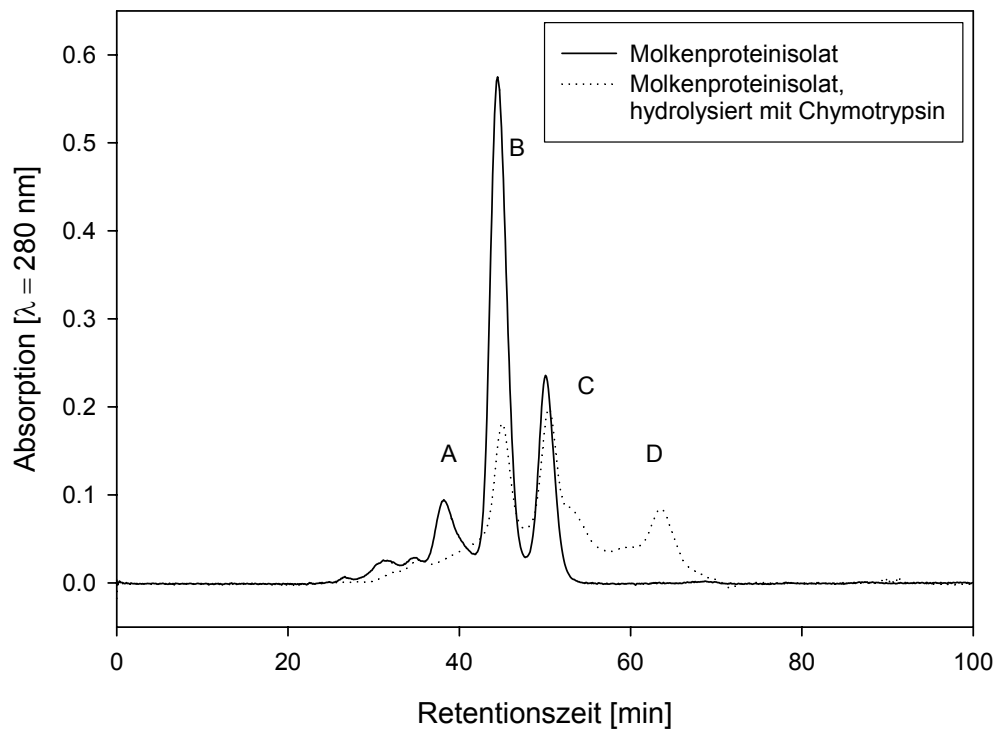


Abb. 27: Größenausschlusschromatogramme von Molkenproteinisolat vor und nach Hydrolyse mit Chymotrypsin. A: β -Lactoglobulin-Dimer, B: β -Lactoglobulin-Monomer, C: α -Lactalbumin, D: Molmassen $< 14.000 \text{ g/mol}$

Die Ultrafiltration des chymotryptischen Hydrolysats (vgl. Abb. 28) bei einer mittleren Trenngrenze von 10.000 g/mol führt im Gegensatz zur Trennung tryptischer Hydrolysate zu einer deutlich sichtbaren Auftrennung der Molmassen. Die Retentatfraktion enthält Peptide mit deutlich höheren Molmassen als die tryptische Permeatfraktion.

Das im Hydrolysat enthaltene, nicht durch die chymotryptische Hydrolyse gespaltene α -Lactalbumin ist nach der Ultrafiltration in der Permeatfraktion zu finden (vgl. Abb. 28, Peak B). Aufgrund der Tertiärstruktur ist es möglich, dass einzelne größere Moleküle die nominale Trenngrenze der Membran unterlaufen. Im Retentat sind über den gesamten Bereich Moleküle erkennbar, bis zu Molmassen von 2.000.000 g/mol.

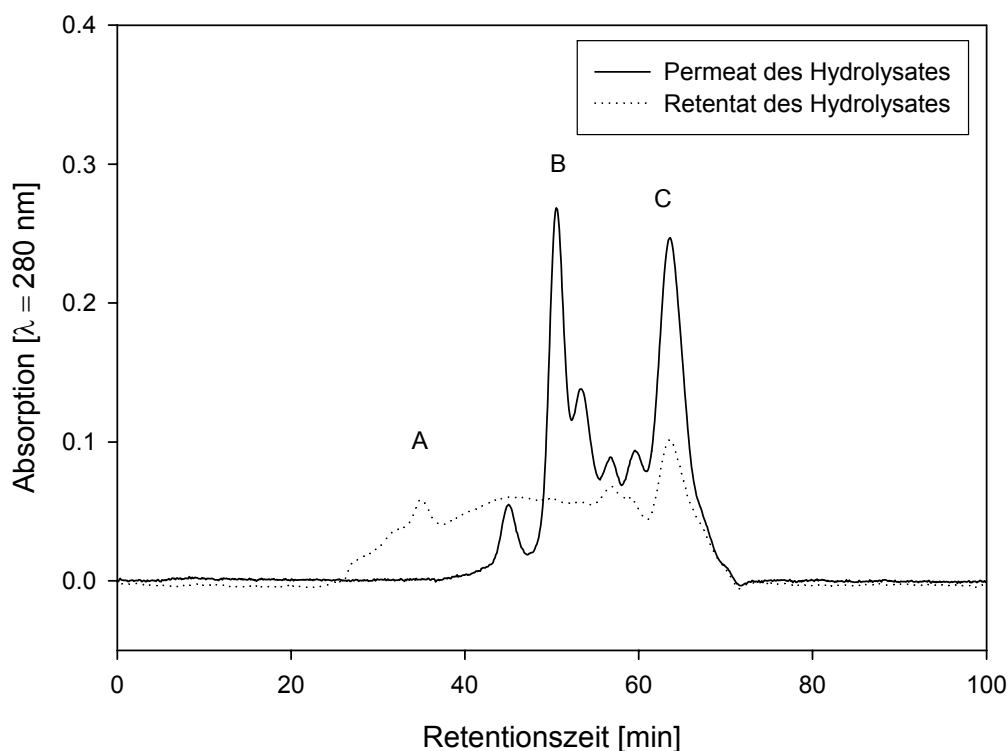


Abb. 28: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des chymotryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat (NMWCO: 10.000 g/mol). A: Substanzen mit einer Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B: α -Lactalbumin; C: Substanzen mit Molmassen <14.000 g/mol

Die Auswertung der RP-HPLC-Chromatogramme (vgl. Abb. 29) zeigt, dass im Permeat und Retentat mehr eher hydrophobe als hydrophile Peptide vorhanden sind (> 70% der Peakfläche eluieren bei Retentionszeiten von 40-80 Minuten). An einem Reversed-Phase-Kieselgel, das in den vorliegenden Versuchen zum Einsatz kam, werden Substanzen mit zunehmend hydrophobem Charakter verzögert eluiert (Jost und Boos, 1989). Beeinflusst wird die Elutionszeit zusätzlich von der Länge des Moleküls, d.h. ein langes hydrophiles Molekül eluiert ebenfalls mit einer hohen Elutionszeit, ein kurzes, hydrophobes mit einer niedrigen Elutionszeit. Ein weiterer Einflussfaktor sind funktionelle Gruppen, die ebenfalls Auswirkungen auf die Elutionszeit haben können. In der Auswertung der RP-HPLC-Diagramme wird deshalb von „eher hydrophober“ oder „eher hydrophiler“ Tendenz der Proteolysate und Fraktionen gesprochen. Mit einer Retentionszeit von 0 bis 7 Minuten erscheint auf den RP-HPLC-Diagrammen der sog. Aufgabepeak, der nicht ausgewertet wird.

Das Retentat zeigt eine geringere Konzentration der Peptide im Vergleich zum Permeat. Das noch enthaltene Protein wird durch die Probenvorbereitung mit Sulphu-Salicylsäure (SSA) ausgefällt, da eine Verunreinigung der Peptid-Säule durch Proteine verhindert werden sollte. α -Lactalbumin konnte deshalb nicht mittels RP-HPLC nachgewiesen werden.

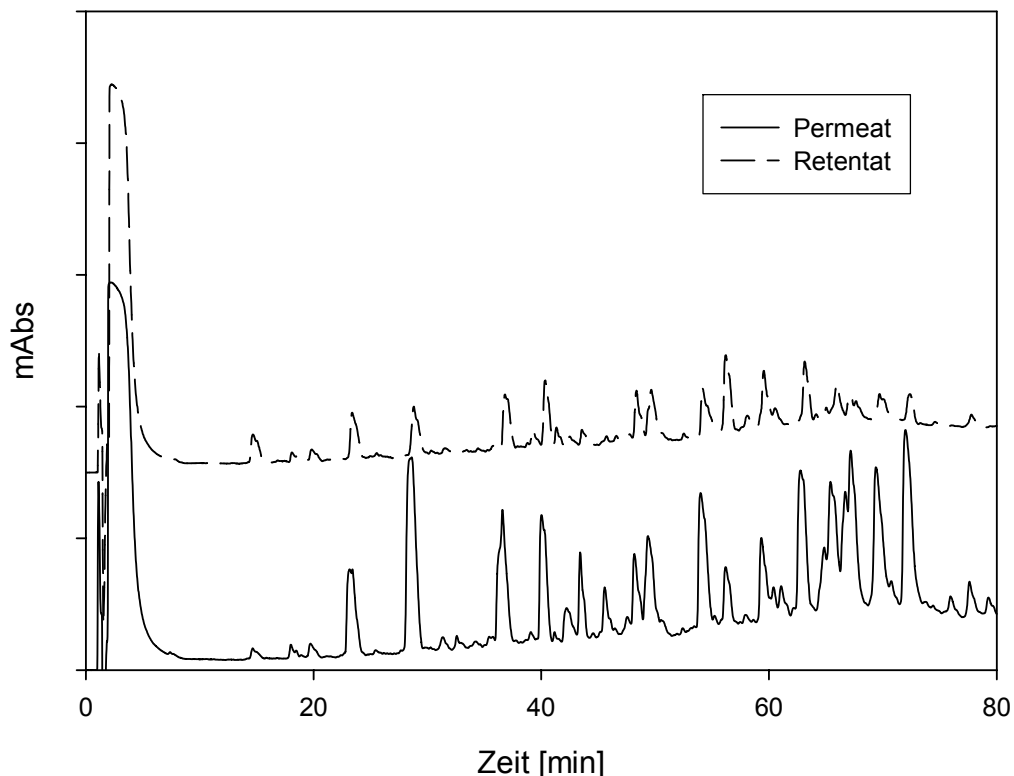


Abb. 29: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme der chymotryptischen Permeat- und Retentatfraktionen nach Ultrafiltration mit einer Trenngrenze von 10.000 g/mol (gefriergetrocknet)

Die UF-Fraktionierung des chymotryptischen Hydrolysats mit einer Trenngrenze von 5.000 g/mol hat zu deutlich unterschiedlicheren Fraktionen geführt als die entsprechende Trennung des tryptischen Hydrolysats. Die Peakflächen der Größenausschlusschromatographie überschneiden sich zwar, es ist aber zu erkennen, dass in der Permeatfraktion die kleineren Peptide angereichert worden sind, während die größeren Peptide überwiegend in die Retentatfraktion übergegangen sind (vgl. Abb. 30).

Das in der Permeatfraktion nach Ultrafiltration bei einer Ausschlussgröße von 10.000 g/mol enthaltene α -Lactalbumin wurde nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol retentatseitig angereichert (vgl. Abb. 30, Peak B).

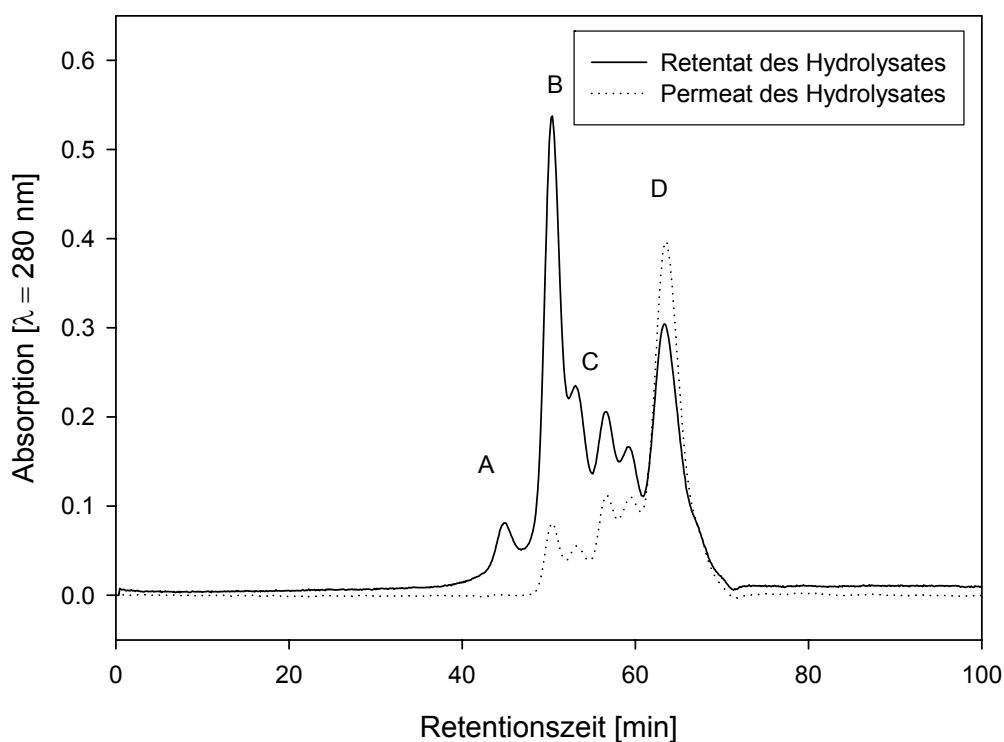


Abb. 30: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des chymotryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat (NMWCO: 5.000 g/mol).

Der Abbau von β -Lactoglobulin mit Chymotrypsin ist unter den gegebenen Bedingungen, d.h. ohne vorhergegangene Hitzebehandlung des Proteins nicht möglich. Die Resistenz von β -Lactoglobulin gegenüber der Spaltung durch Chymotrypsin ist in der Molekülstruktur begründet. Chymotrypsin spaltet an den hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Reddy et al. 1988). Bei dem globulären Molekül β -Lactoglobulin befinden sich die möglichen Angriffspunkte des Enzyms eher im Inneren des Moleküls. Die Tertiärstruktur wird durch intramolekulare S-S-Bindungen stabilisiert. Erst nach einer Zerstörung der Tertiärstruktur durch Erhitzung, Spaltung der Disulfid-Bindungen oder Säuredenaturierung erfolgt die Hydrolyse durch Chymotrypsin (Reddy et al. (1988).

Die Auswertung der UF-Fractionen der chymotryptischen Hydrolysate (mittlere Ausschlussgrenze 5.000 g/mol) mittels RP-HPLC zeigt, dass sich die Chromatogramme in der Anzahl und in den Elutionszeiten der Peaks kaum unterscheiden (vgl. Abb. 31). In der Retentatfraktion ist die Konzentration der Peptide höher, besonders in Richtung einer späteren Elutionszeit (60 bis 80 Minuten), die eher hydrophoberen Peptiden entspricht. Anhand des Chromatogramms kann diagnostiziert werden, dass sich die eher hydrophoberen Peptide in beiden Fraktionen angereichert haben, da mehr als 70 % der gesamten Peakfläche eine Elutionszeit von 40 bis 80 Minuten aufweist.

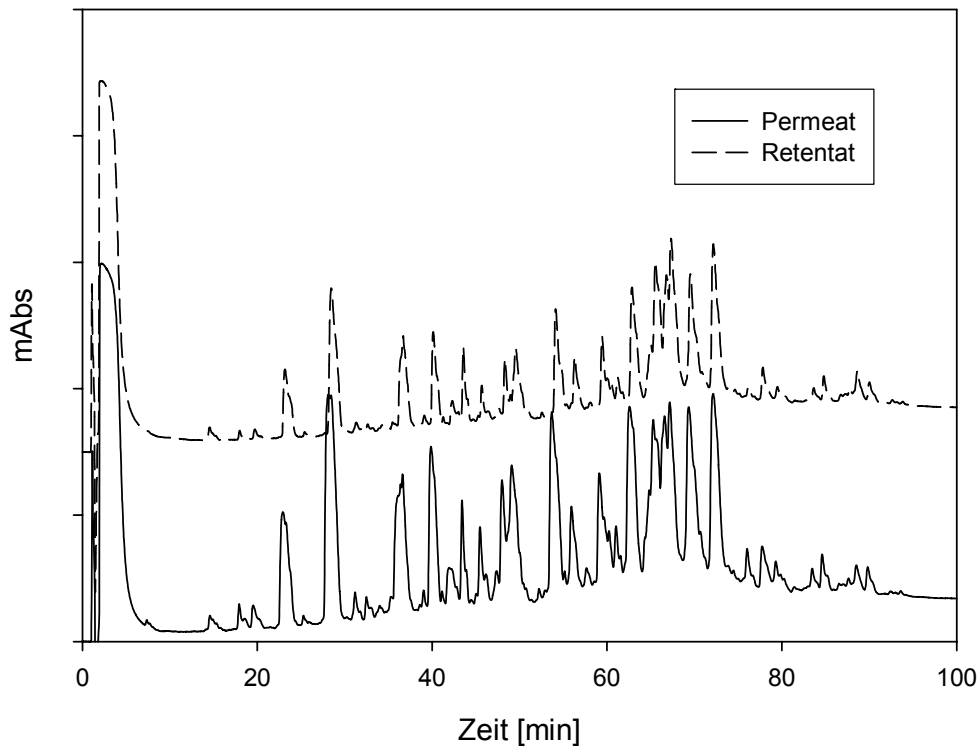


Abb. 31: Hydrolyse mit Chymotrypsin: RP-HPLC-Chromatogramme der Permeat- und Retentat-Fractionen aus der UF mit einer mittleren Trenngrenze von 5.000 g/mol

4.2.2. Enzymatische Hydrolyse von Milchproteinfraktionen

Die durch Fraktionierung im Technikummaßstab gewonnenen, angereicherten β -Casein- und β -Lactoglobulin-Fractionen wurden der Hydrolyse mit den proteolytischen Enzymen Trypsin, Pepsin und Alcalase unterzogen. Die enzymatische Hydrolyse wurde im Labormaßstab (500 ml) durchgeführt. Die Charakterisierung der Fractionen erfolgte anhand von FPLC, RP-HPLC und SDS-PAGE.

Hydrolyse von β -Casein mit Trypsin

Die Charakterisierung der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mittels Größenausschlusschromatographie ergab, dass bereits nach 5 Minuten Hydrolyse kein β -Casein (Retentionszeit: 40 Minuten, vgl. Abb. 32, Peak A) mehr in den Hydrolysaten detektierbar ist. Der größte Anteil der entstehenden Peptide besitzt eine Retentionszeit von 51 bis 56 Minuten (Peak B). Dies entspricht einer Molmasse von weniger als 14.000 g/mol. Mit zunehmender Hydrolysezeit entstehen zusätzlich kleinere Peptide, deren Menge zunimmt und die Größe abnimmt (Retentionszeiten ca. 56-68 Minuten, Peaks C und D).

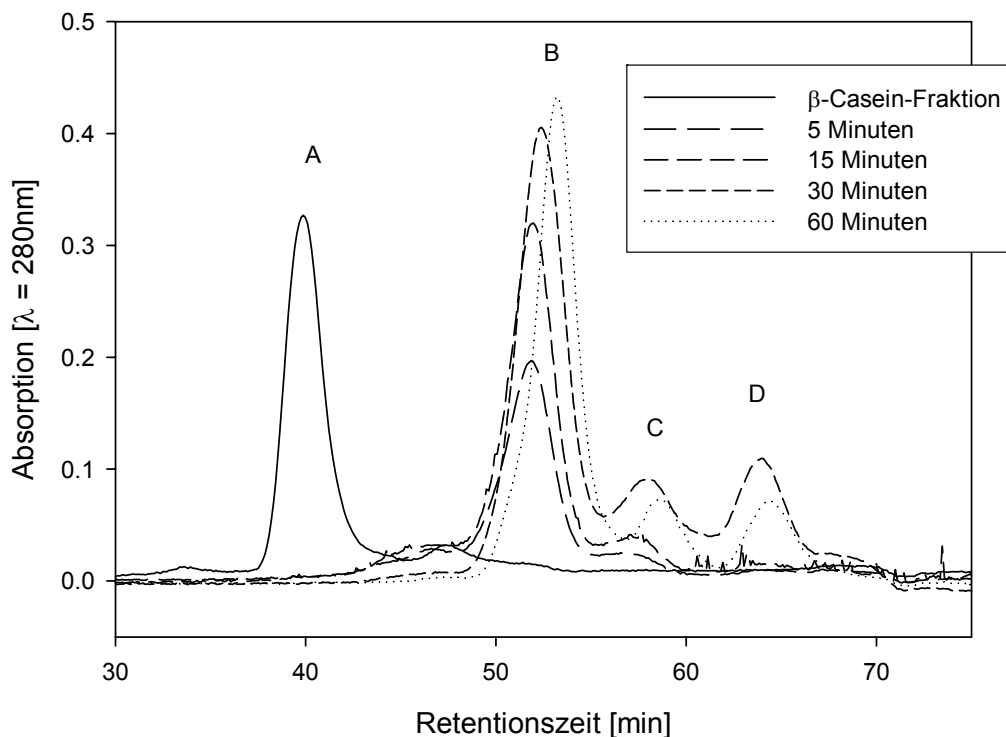


Abb. 32: Größenausschlusschromatogramme der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = β -Casein, B, C und D <14.000 g/mol)

Da die durch die Hydrolyse mit Trypsin entstandenen Peptide mit Hilfe der RP-HPLC nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt werden, kann aus Abbildung 33 entnommen werden, dass mehr Peptide mit hydrophilen als Peptide mit hydrophoben Eigenschaften entstehen. In den ersten 40 Minuten der Laufzeit werden mehr Peptide eluiert als in der weiteren Verlaufszeit (im Mittel 54% von 0-40 Minuten Elutionszeit). Da Peakhöhe und -fläche der Konzentration einer Substanz proportional sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration an hydrophilen Verbindungen höher als die von hydrophoben Verbindungen ist. Zwischen den Chromatogrammen der verschiedenen Hydrolysezeiten sind nur geringe Unterschiede zu erkennen.

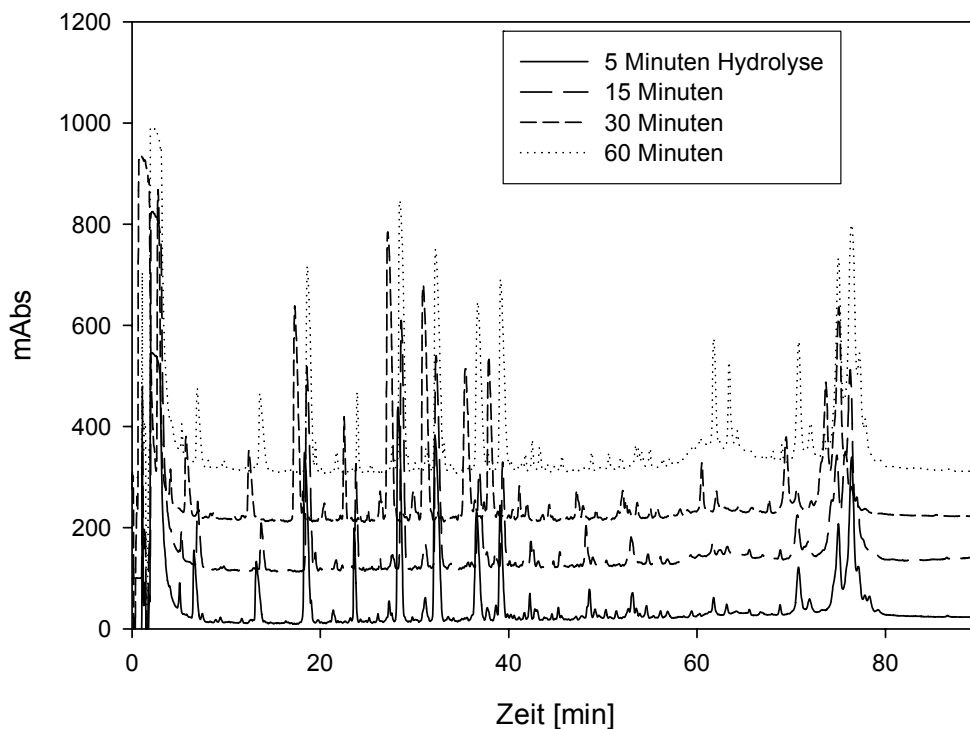


Abb. 33: RP-HPLC-Chromatogramme der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Bumberger und Belitz (1993) fanden nach zweistündiger, tryptischer Hydrolyse von β -Casein Peptide im Molmassenbereich von 500 bis 6500 g/mol, der Großteil der Peptide hatte eine Molmasse von 500 bis 2000 g/mol. Die Größenausschlusschromatogramme (vgl. Abb. 32) zeigen, dass auch in der in diesen Versuchen durchgeführten Hydrolyse der Anteil der Peptide mit geringer Molmasse und längerer Retentionszeit mit zunehmender Hydrolysedauer zunahm.

Hydrolyse von β -Casein mit Pepsin

Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der Charakterisierung der peptischen Hydrolysate von β -Casein. Es ist zu erkennen, dass bereits nach 5-minütiger Hydrolyse kein β -Casein mehr vorhanden ist (Peak A). Pepsin besitzt aufgrund des hohen Gehalts an Glutaminsäure- und Leucinresten eine hohe Anzahl an möglichen peptischen Spaltstellen im β -Casein-Molekül. Aufgrund des Vorkommens eines hohen Peaks bei einer Retentionszeit von ca. 43 Minuten (Peak B), scheint die Abspaltung von kleinen Peptiden an einem der beiden Kettenenden von β -Casein erfolgt zu sein. Bestätigt wird diese Annahme durch die Entstehung eines relativ hohen Peaks nach einer Retentionszeit von 60 Minuten (Peak D) bereits nach 5 Minuten Hydrolysezeit.

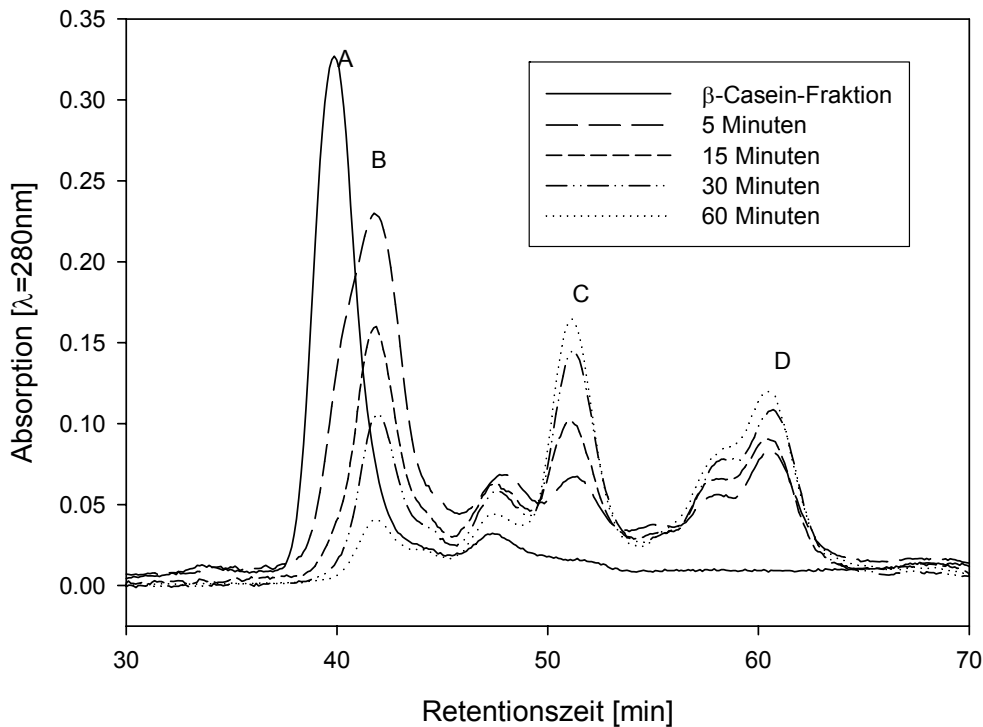


Abb. 34: Größenausschlusschromatogramme der peptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = β -Casein, B = ca. 20.000 g/mol, C und D <14.000 g/mol)

Mit zunehmender Hydrolysedauer nimmt der Anteil an kleineren Peptiden zu. Der Anteil der Peptide mit einer Retentionszeit von 43 Minuten nimmt stark ab, bis er nach 60 Minuten nur noch eine geringe Fläche hat.

Das Chromatogramm der RP-HPLC-Analyse der peptischen Hydrolysate (vgl. Abb. 35) zeigt, dass eine Elution von Peptiden erst ab einer Retentionszeit von 43 Minuten beginnt. Die Elution erfolgt nach zunehmender Hydrophobizität, die Peptide des peptischen Hydrolysats besitzen demnach eine deutlich höhere Hydrophobizität als die Peptide des tryptischen Hydrolysats.

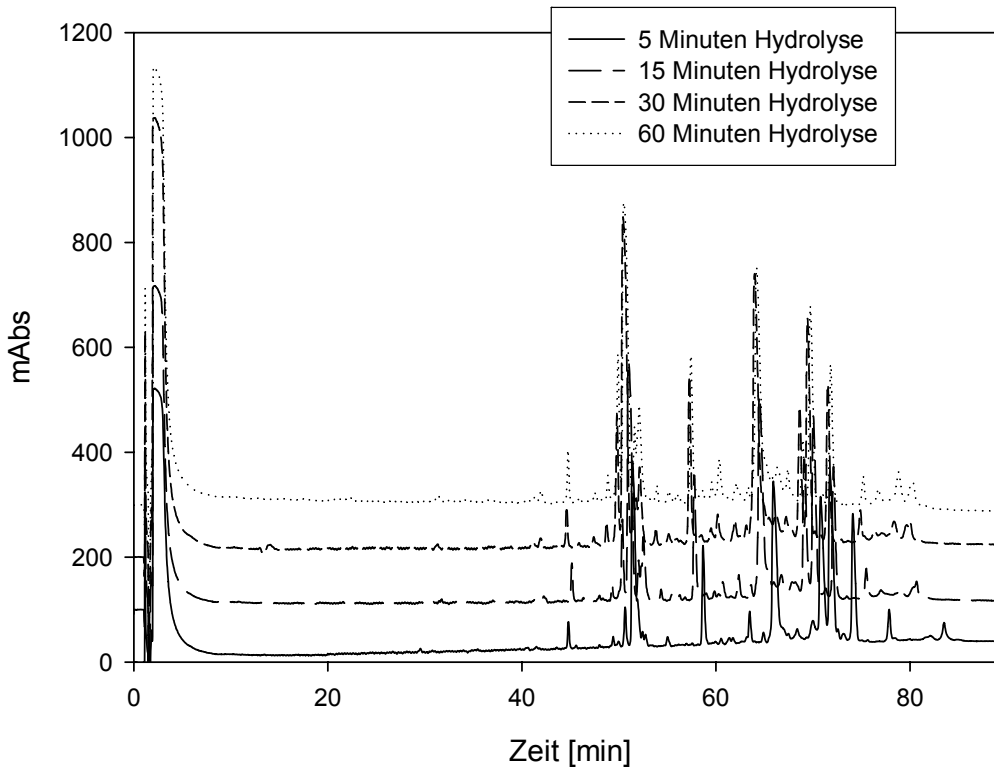


Abb. 35 RP-HPLC-Chromatogramme der peptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Das Ergebnis der RP-HPLC stimmt mit der theoretischen Einschätzung der hydrophoben Eigenschaften der Peptide überein. Aufgrund des hydrophoben Charakters von Teilen des β -Casein-Moleküls bestehen auch die Peptide aus vielen hydrophoben Aminosäuren. Peptide mit sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Regionen können das Schaumbildungsverhalten positiv beeinflussen (Phillips, 1981).

Dalgarrondo et al. (1995) stellten bei der peptischen Hydrolyse von β -Casein fest, dass in den ersten 30 Minuten der Hydrolyse lange, hydrophobe Peptide entstehen, die mit zunehmender Hydrolysezeit in kürzere, eher hydrophile Peptide gespalten werden. Die Beobachtung, dass in den ersten Minuten der Hydrolyse (bis 30 Minuten) ein hoher Anteil von Peptiden mit hoher Molmasse entsteht, kann bestätigt werden. Die RP-HPLC-Diagramme bestätigen die hohe Hydrophobizität der Peptide.

Vergleicht man die RP-HPLC-Chromatogramme der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mit denen der peptischen β -Casein-Hydrolysate, so fällt auf, dass die Elutionszeiten der Peptide deutlich von einander abweichen. Die durch tryptische Hydrolyse entstandenen Peptide eluieren zum größten Teil (54%) in den ersten 40 Minuten der Messzeit und sind deshalb als eher hydrophil einzuschätzen, die durch peptische Hydrolyse entstandenen Peptide eluieren zu > 90% nach Retentionszeiten von 40 bis 80 Minuten, sind demnach bei gleicher Ausgangshydrophobizität als eher hydrophob einzuschätzen.

Hydrolyse von β -Casein mit Alcalase

Die Chromatogramme der Hydrolyse von β -Casein mit Alcalase zeigen, dass das Ausgangsmaterial β -Casein bereits nach einer Hydrolysedauer von 5 Minuten vollständig gespalten wurde (vgl. Abb. 36, Peak A). Es ist nicht mehr nachweisbar und scheint vollständig in Peptide gespalten zu sein, die nach einer Retentionszeit von >55 Minuten absorbieren (Peak B). Mit zunehmender Hydrolysedauer wird die Fläche dieses Peaks größer.

Die Gesamtflächen der Peaks der Chromatogramme der Hydrolysate mit geringeren Hydrolysezeiten (5 bis 15 Minuten) ist gegenüber der Fläche der Peaks des Ausgangsmaterials gering. Zu Beginn der Hydrolyse könnten Aggregate mit hohen Molmassen entstanden sein, die mit dem Membranfilter, mit dem die Lösungen vor jedem FPLC-Lauf filtriert werden, abfiltriert worden sind.

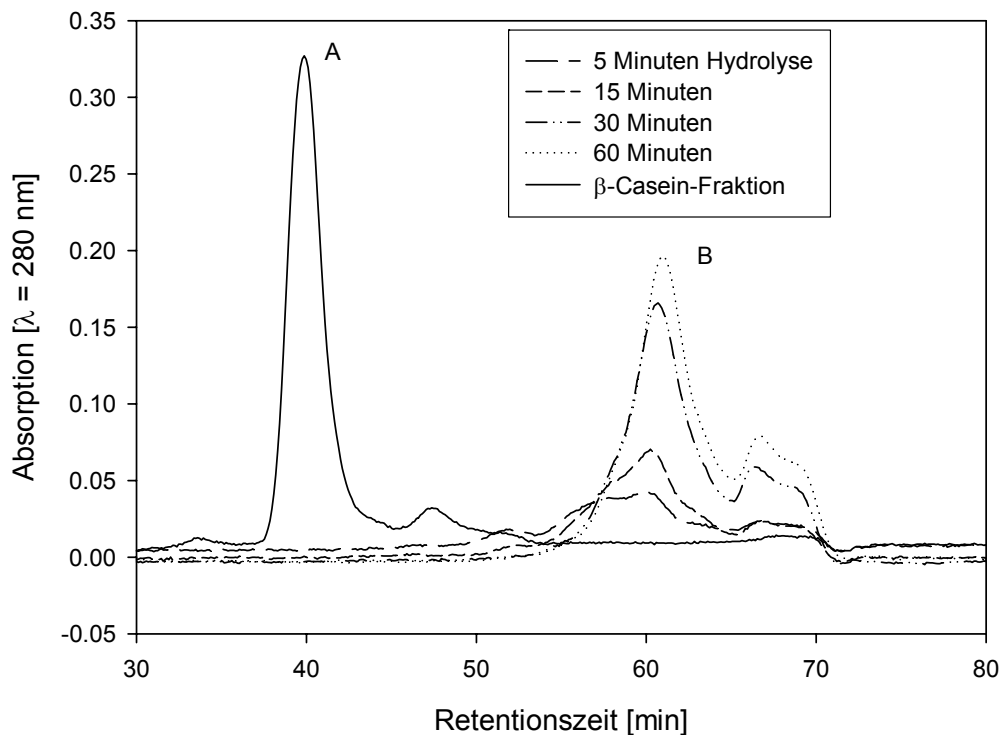


Abb. 36: Grössenausschlusschromatogramme der β -Casein-Hydrolysate durch Alcalase mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial

Die RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysate von β -Casein mit Alcalase zeigen eine Verteilung von Peaks über die gesamte Retentionszeit (vgl. Abb. 37). Dabei sind die Höhe und die Fläche der Peaks in der zweiten Hälfte der dargestellten Zeit (40-80 Minuten) größer (im Mittel >80 %) als in der ersten Hälfte (0-40 Minuten, im Mittel <20%). Diese Verteilung der Peaks deutet auf das Vorkommen von stärker hydrophoben als hydrophilen Verbindungen hin.

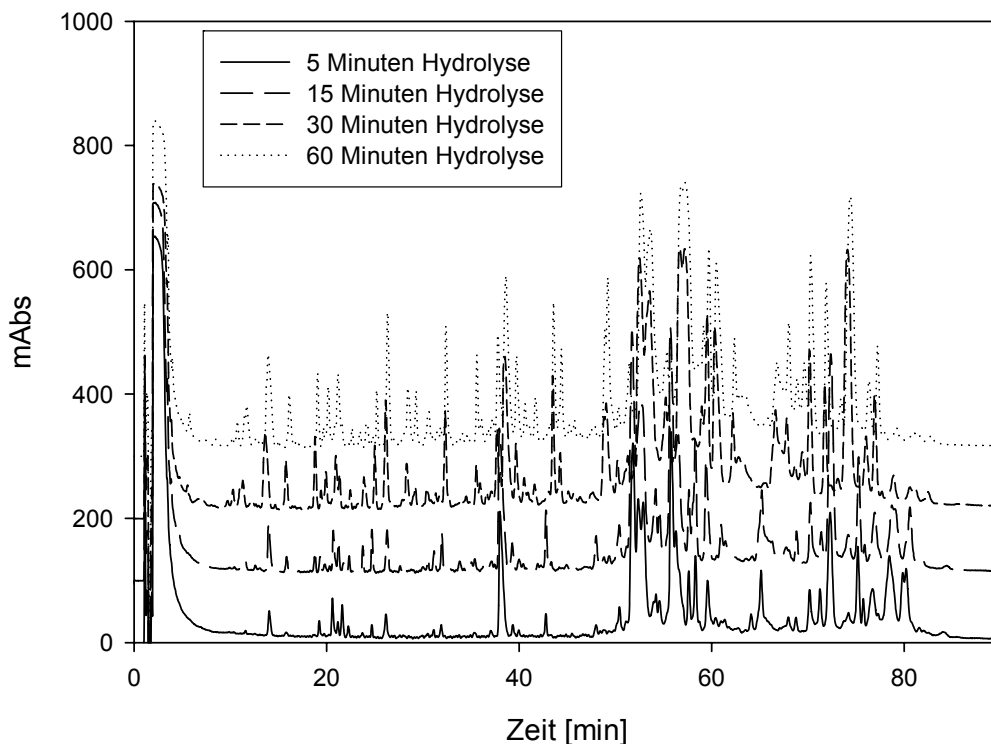


Abb. 37: RP-HPLC-Chromatogramme der β -Casein-Hydrolysate nach Hydrolyse mit Alcalase und Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Die Hydrolyse von β -Casein mit Alcalase und die resultierenden Peptide wurden in der bekannten Literatur bisher nicht diskutiert, Hydrolysen mit Alcalase wurden bisher nur an Molkenprotein- oder Caseinmischungen durchgeführt (Adamson und Reynolds, 1996; Morato et al., 2000; Severin und Wenshui, 2006; Cheison et al., 2007). Die Zielsetzungen dieser Studien waren auf einzelne Aspekte (beispielsweise Emulgierereigenschaften) ausgerichtet, ein Screening der Peptide wurde von keiner Autorengruppe vorgenommen.

Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Trypsin

Aus den FPLC-Chromatogrammen der tryptischen Hydrolysate von β -Lactoglobulin ist ersichtlich, dass die Höhe der β -Lactoglobulin-Peaks bereits nach einer Hydrolysezeit von 5 Minuten deutlich abgenommen hat (vgl. Abb. 38, Peak A und B). In den Hydrolysaten mit Hydrolysezeiten von 5, 15 und 30 Minuten wurde ein Peak nach einer Retentionszeit von 27 Minuten gemessen (Peak A), der mit zunehmender Hydrolysezeit abnimmt. Verbindungen, die nach einer Retentionszeit von <28 Minuten erscheinen, haben eine ungefähre Molmasse von $>2 \cdot 10^6$ g/mol.

Die Entstehung von Peptiden (Retentionszeiten >50 Minuten) nimmt mit zunehmender Hydrolysedauer zu. Bei der längsten Hydrolysezeit werden die hochmolekularen Substanzen (Peak A) nicht mehr erkannt, es werden hauptsächlich Peptide mit Retentionszeiten von >50 Minuten detektiert (Peak D).

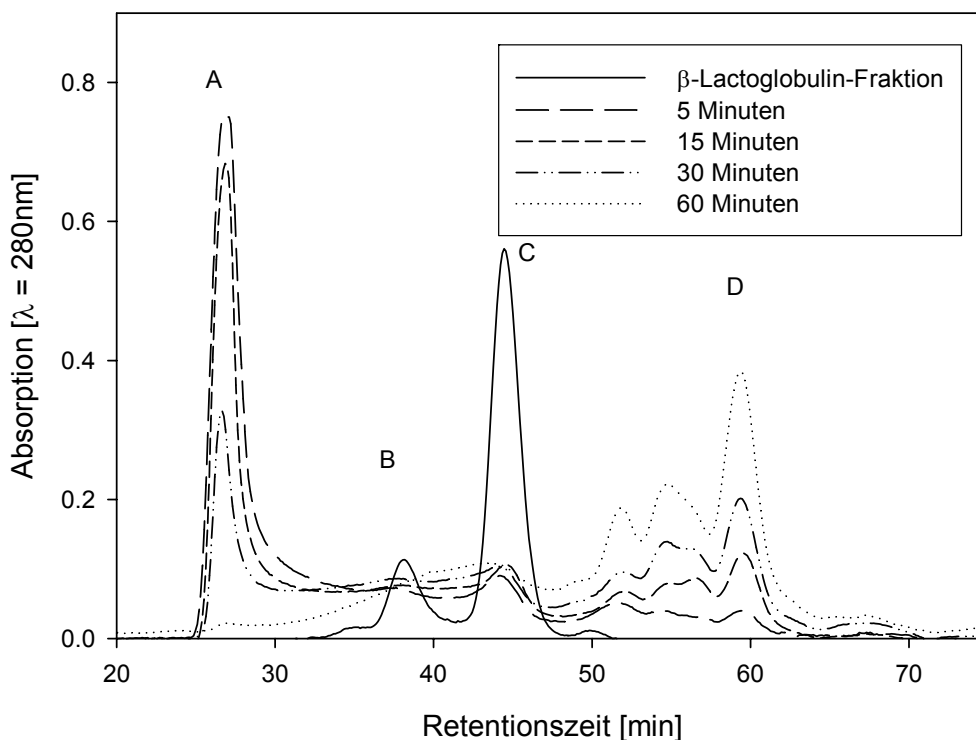


Abb. 38: Größenausschlusschromatogramme der tryptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = >200.000 g/mol, B = β -Lactoglobulin-Dimer, C = β -Lactoglobulin, D = Peptide <14.000 g/mol)

Das Entstehen von Aggregaten bei der Hydrolyse von β -Lactoglobulin wird auch von anderen Autoren beschrieben. Doucet et al. (2003) untersuchen Enzym-induzierte Gelbildung bei stark hydrolysierten Molkenproteinen durch Alcalase, sie finden jedoch keine derart großen

Aggregate wie in den vorliegenden Versuchen detektiert. Sciancalepore und Longone (1988) untersuchen die Plastein-Synthese im peptischen Hydrolysat von Molkenproteinen, die Molmasse befindet sich hier jedoch im Bereich 451-1450 g/mol. Die Autoren gehen davon aus, dass es eines zweiten Hydrolyseschrittes bedarf, um Plasteine herzustellen. Untersuchungen von Lorenzen und Schlimme (1992b) an Natrium-Caseinat haben jedoch ergeben, dass schon nach einem Hydrolyseschritt mit Trypsin Enzym-induzierte Protein-Aggregate (EIPA) von der Größe von Caseinmicellen sichtbar sind. Die Aggregation wird auf hydrophobe Wechselwirkungen der Peptide zurückgeführt. Die Eigenschaften der Aggregate stimmen mit denen von Plasteinen weitgehend überein. Diese Aggregate wurden auch in UF-Magermilchkonzentrat nach Hydrolyse mit Trypsin gefunden (Lorenzen und Schlimme, 1992a; 1991).

Groleau et al. fanden ebenfalls Aggregate in tryptischen Hydrolysaten von β -Lactoglobulin (Groleau et al., 2003). Bei einem pH-Wert von 8,0 stellten sie eine Trübung des Hydrolysats fest, aufgrund derer die Autoren sowohl das Vorkommen neuer Disulfidbindungen (optimaler pK_a der SH-Gruppe (Turgeon et al., 1992)) als auch von kovalenten Bindungen nicht ausschließen. Das Vorkommen des β -Lactoglobulin-Fragments β -LG 102-124, das in vorangegangenen Studien der Autoren für die Aggregation von Peptiden im Hydrolysat verantwortlich gemacht wurde, wurde von den Autoren im Aggregat nicht gefunden, sie schließen eine Beteiligung des Peptids, das eine intramolekulare Disulfidbindung als auch eine freie Thiolgruppe enthält, aber dennoch nicht aus. Bei einem pH-Wert von 4 ist auch α -Lactalbumin an der Aggregat-Bildung beteiligt (Turgeon et al., 1992). Dieses liegt auch im vorliegenden Ausgangsmaterial noch in geringen Mengen vor.

Da die Moleküle mit Molmassen $>2.000.000$ g/mol nur mittels FPLC aber nicht über die SDS-PAGE (ohne Abbildung) nachgewiesen werden können, kann davon ausgegangen werden, dass die Aggregate, die bei der Hydrolyse entstehen, durch SDS und die Probenaufbereitung zerstört wurden. Das Entstehen von kovalenten Bindungen ist daher auszuschließen, da diese mittels SDS nicht gelöst werden. Creusot et al. (2006) fanden nach der Hydrolyse von Molkenprotein mit *Bacillus licheniformis* Protease (BLP) ebenfalls Aggregate, die aus Peptiden und intakten Proteinen bestanden. Aufgrund von Ergebnissen unter nicht-reduzierenden Bedingungen kommt die Forschergruppe zu dem Ergebnis, dass es sich um nicht-kovalente, hydrophobe Wechselwirkungen und reduzierte elektrostatische Abstoßung verursachte Bindungen handele.

Die Chromatogramme zur Charakterisierung der tryptischen Hydrolysate des β -Lactoglobulins mittels RP-HPLC (vgl. Abb. 39) zeigen ein sehr heterogenes Bild. Über die gesamte Länge der Messzeit werden mit großen Zeitabständen Substanzen eluiert, es ist davon auszugehen, dass sowohl hydrophile, nach kurzer Elutionszeit detektierbare, als auch hydrophobe, nach langer Elutionszeit detektierbare Peptide bei der Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Trypsin entstanden sind.

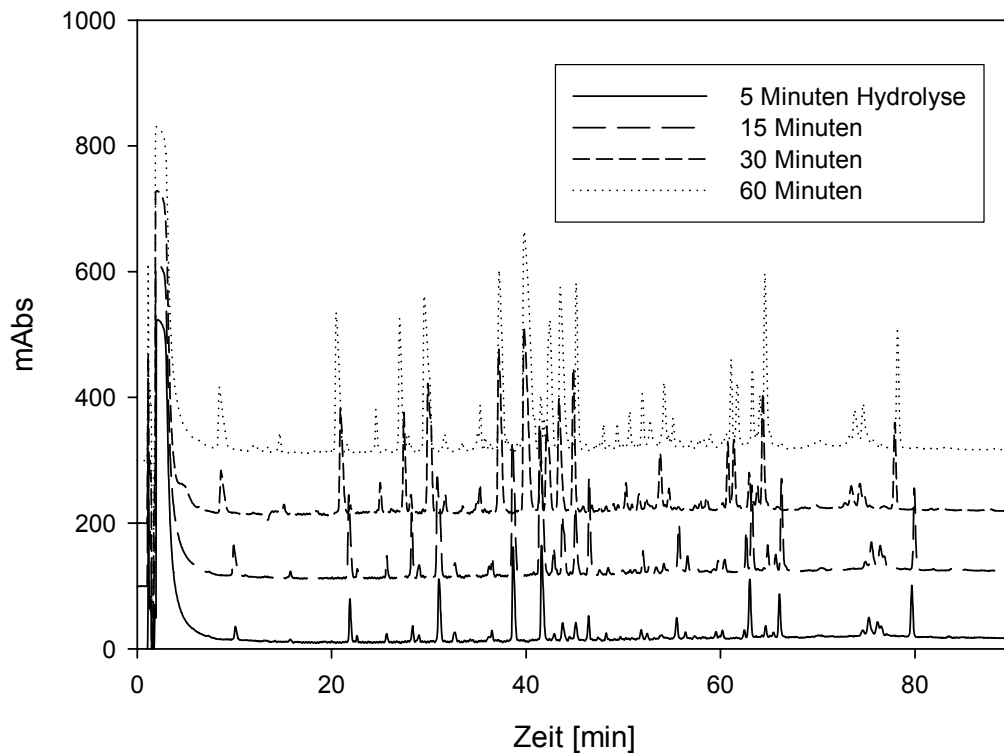


Abb. 39: RP-HPLC-Chromatogramme der tryptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Pepsin

Aus den FPLC-Chromatogrammen der Hydrolyse von β -Lactoglobulin ist ersichtlich, dass β -Lactoglobulin nicht der peptischen Hydrolyse unterliegt, in den Chromatogrammen der verschiedenen Hydrolysezeiten hat sich die Fläche des Peaks kaum verändert (vgl. Abb. 40, Peak B). Lactoglobulin-Dimere sind in den Hydrolysaten in geringerer Menge als im Ausgangsmaterial zu finden (Peak A).

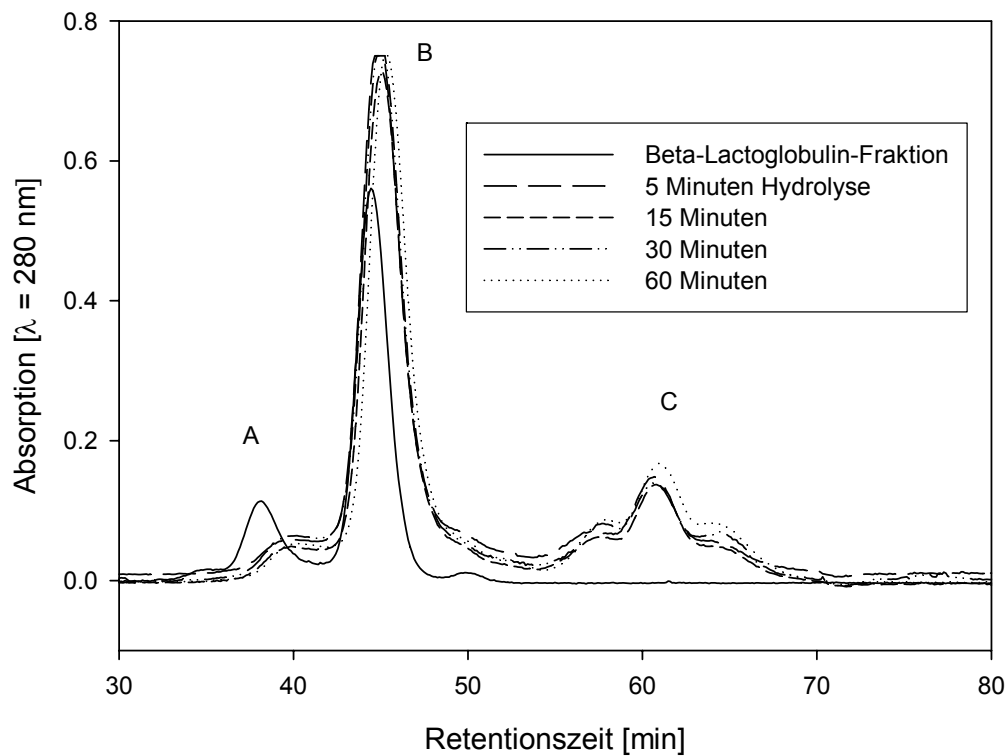


Abb. 40: Ergebnisse der Charakterisierung des peptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysats mittels FPLC (Peak A = β -Lactoglobulin-Dimer, B = β -Lactoglobulin, C = Peptide)

Das Ergebnis der Charakterisierung mittels RP-HPLC zeigt, dass die Peptide eher hydrophoben Charakter haben. Im Mittel 83% der Peptide werden nach Elutionszeiten zwischen 40 und 80 Minuten detektiert (vgl. Abb. 41). Zwischen den verschiedenen Hydrolysezeiten sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

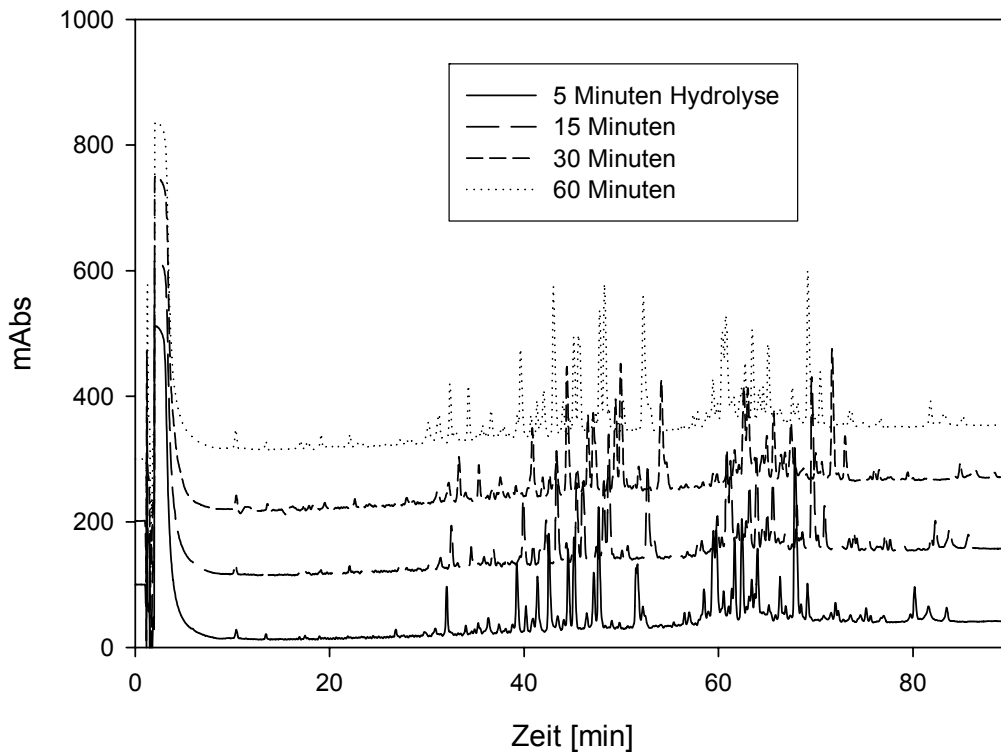


Abb. 41: RP-HPLC-Chromatogramme der peptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Der Abbau von β -Lactoglobulin mit Pepsin und Chymotrypsin ist unter den gegebenen Bedingungen, d.h. ohne vorhergegangene Hitzebehandlung des Proteins nicht möglich. Dieses Ergebnis bestätigt Ergebnisse von anderen Forschergruppen (Caessens et al., 1999; Davies and Law, 1983). Die Resistenz von β -Lactoglobulin gegenüber der Spaltung durch Chymotrypsin und Pepsin ist in der Molekülstruktur begründet. Die Hydrolyse durch Pepsin kann ebenfalls durch Erhitzung oder durch Spaltung der Disulfidbindung möglich gemacht werden, wobei die Spaltung der Disulfidbindung und damit die Auflösung der natürlichen Tertiärstruktur des Moleküls signifikant wirksamer ist als die Hitzedenaturierung (Reddy et al., 1988). Die entstandenen Peptide (vgl. Abb. 40, Peak C) müssen aus im Laufe der Fraktionierung beschädigtem β -Lactoglobulin entstanden sein, das durch Pepsin hydrolysiert werden konnte.

Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Alcalase

Die Chromatogramme der Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Alcalase zeigen, dass β -Lactoglobulin bereits nach einer Hydrolysezeit von 5 Minuten kaum noch detektierbar war (vgl. Abb. 42, Peak B). Nach vorangegangener Hydrolyse sind Peaks bei ca. 27 Minuten (Molmasse ca. 200.000 g/mol, Peak A), und bei >55 Minuten (Molmasse <14000 g/mol, Peaks C und D) auf den Chromatogrammen zu erkennen. Die Fläche des Peaks der hochmolekularen Substanzen (Peak A) nimmt mit zunehmender Hydrolysezeit ab, die Höhe der Peptid-Peaks (Peaks C und D) nimmt mit zunehmender Hydrolysedauer zu.

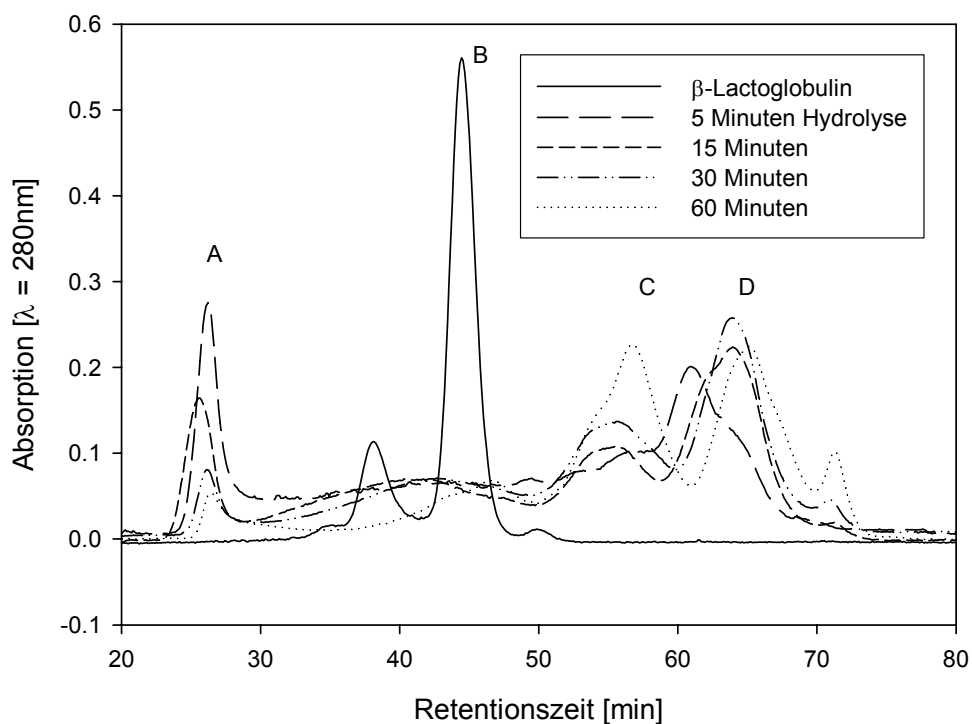


Abb. 42: Ergebnisse der Charakterisierung des β -Lactoglobulin-Hydrolysats durch Alcalase mittels FPLC (Peak A = Molmassen ca. 200.000 g/mol, B = β -LG-Monomer, C und D = Peptide < 14.000 g/mol)

Die RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysate von β -Lactoglobulin mit Alcalase zeigen viele verschiedene Peptide über die gesamte Retentionszeit verteilt, der Großteil der Peaks hat eine Elutionszeit von 40 bis 80 Minuten (im Mittel 69%) und besitzt daher eher hydrophoberen Charakter (vgl. Abb. 43).

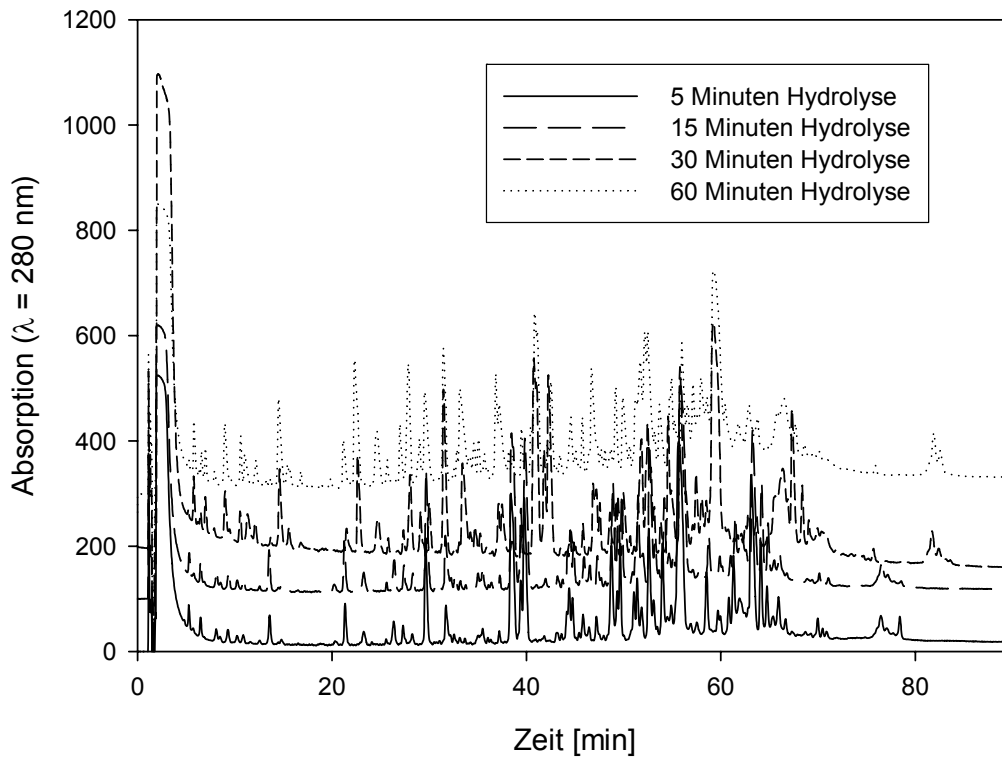


Abb. 43: RP-HPLC-Chromatogramme der β -Lactoglobulin-Hydrolysate nach Hydrolyse mit Alcalase und Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten

Die Detektion von hochmolekularen Polymeren ($>2.000.000 \text{ g/mol}$) nach Hydrolyse von Molkenproteinisolat durch Alcalase wurde von Doucet et al. (2003) ebenfalls berichtet. Die Autoren vermuten, dass die Bildung von Plasteinen stattgefunden hat (vgl. tryptische Hydrolyse von β -LG, vgl. Seite 97).

Doucet et al. (2003) untersuchen die enzym-induzierte Gelbildung von Molkenproteinisolat nach extensiver Hydrolyse (6h) mit Alcalase ohne pH-Wert-Einstellung. Um die Gelbildung zu induzieren, ist eine extensive Hydrolyse mit langer Hydrolysedauer notwendig. Die resultierenden Peptide besitzen zu 80% Molmassen unter 2.000 g/mol . Ein Vergleich der Peptidmuster der Experimente von Doucet et al. (2003) mit den in diesen Versuchen erlangten Ergebnissen ist aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials und der abweichenden Versuchsführung nicht durchführbar, da der pH-Wert sich während der Hydrolyse verringert und die Bedingungen für das Enzym verändert werden.

Mota et al. (2004) stellen beim hydrolytischen Verdau von Molkenproteinisolat durch Alcala-se sowohl einen Abbau von α -Lactalbumin als auch von β -Lactoglobulin fest. Aus den RP-HPLC-Chromatogrammen interpretieren sie eine weite Streuung der Polaritäten.

4.2.3. Bewertung der sensorischen Eigenschaften der Milchproteinfraktionen und Molkenproteinhydrolysate

Bitterer Geschmack in Milch und Milchprodukten wird durch Bitterpeptide verursacht, die bei der Hydrolyse von Milchprotein entstehen (Bumberger und Belitz, 1993). Die Hydrolyse von Protein durch *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kann bitteren Geschmack in Joghurt hervorrufen. Bitterpeptide und der resultierende Bittergeschmack geben einigen Käsesorten ihren charakteristischen Geschmack, ist der Käse jedoch zu bitter, sinkt die Akzeptanz (Singh et al. 2005). In Rohmilch kann die Aktivität des milchoriginären Enzyms Plasmin zu einem adstringierenden Geschmackseindruck führen (Harwalker et al., 1993). Generell wird angenommen, dass Peptide mit Molmassen unter 6.000 g/mol (Bumberger und Belitz, 1993) und hydrophoben Eigenschaften (Singh et al., 2005) zur Bitterkeit neigen. Pélissier und Manchon (1976) stellten nach der Hydrolyse mit u.a. Trypsin und α -Chymotrypsin fest, dass Peptide aus α_s -Casein bitterer sind als aus β -Casein.

Um die sensorischen Eigenschaften der im Technikummaßstab hergestellten Milchproteinfraktionen und –hydrolysate zu prüfen, wurden diese auf Bittergeschmack und unerwünschte Off-Flavour untersucht. Die Prüfung der sensorischen Eigenschaften der Milcheiweißfraktionen und Proteolysate wurde durch die Prüfergruppe der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel durchgeführt. Die Prüfung erfolgte nach DIN 10967-1: Sensorische Prüfverfahren – Profilprüfung – Teil 1: Konventionelles Profil.

Die Fraktionen (Casein- und Molkenproteinfraktionen) wurden als 1%ige, wässrige Lösung (w/w) angesetzt und unter Rühren 20 Stunden bei 4 bis 6°C hydratisiert. Die detektierten Geruchs- und Geschmackseigenschaften wurden von den Prüfern auf einer Skala von 1 (sehr schwach erkennbar) bis 5 (sehr stark erkennbar) eingeordnet.

Da der Variationskoeffizient der Werte hoch und somit die sensorische Prüfung nicht signifikant war, können die Testreihen nur als Hinweis auf die Eigenschaften der Milchproteinfraktionen und –hydrolysate genommen werden. Auf eine statistische Auswertung und die Auf-führung der Standardabweichungen in den Diagrammen wird deshalb verzichtet.

Die α_S - ρ - κ -Casein-Fraktion unterscheidet sich in der Verkostung von der β -Casein-Fraktion deutlich durch die Trübung der Lösung (vgl. Abb. 44). Die α_S - ρ - κ -Casein-Lösung ist trüber und weißlicher als die β -Casein-Lösung. Geschmacklich unterscheidet sich die β -Casein-Lösung von der α_S - ρ - κ -Casein-Fraktion durch einen süßlichen und Umamigeschmack.

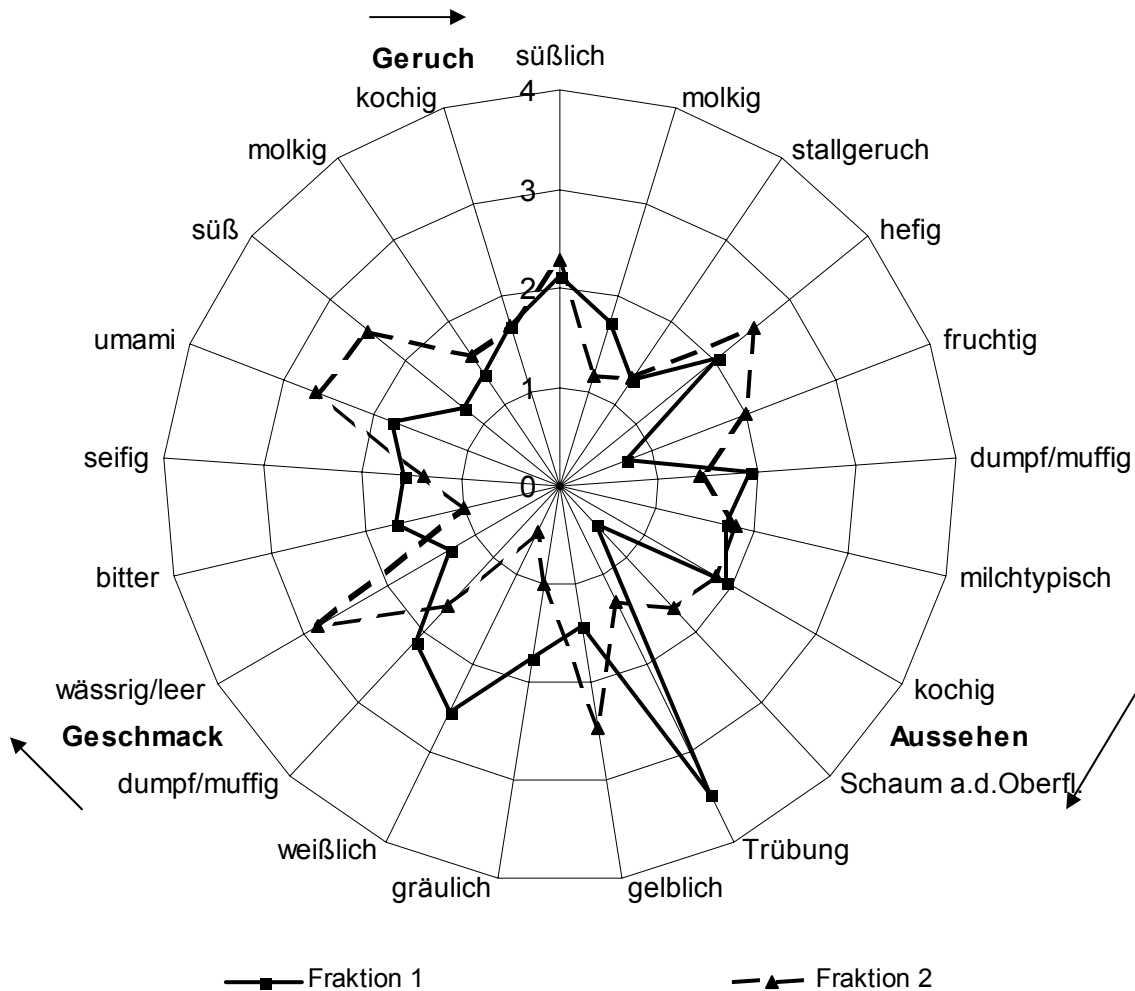


Abb. 44: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen der Casein-Fractionen (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = α_S - ρ - κ -Casein-Fraktion, Fraktion 2 = β -Casein-Fraktion)

Die Fraktionen aus der Molkenproteinfraktionierung unterscheiden sich kaum in Geschmack und Geruch (vgl. Abb. 45). Beide Fraktionen werden geschmacklich als leicht umami empfunden, die α -LA-/ BSA-/ IG-Fraktion auch als schwach bitter. Im Aussehen unterscheidet sie sich durch gräuliche Trübung.

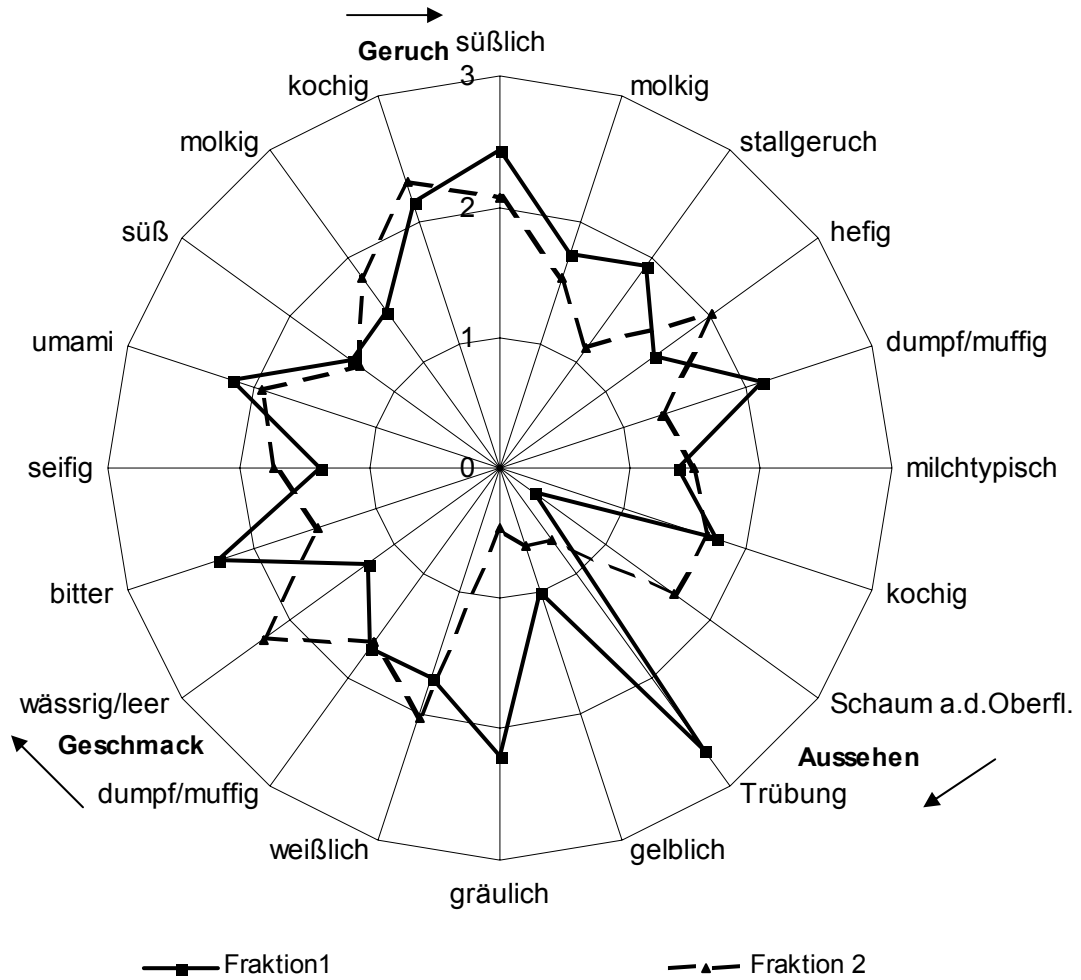


Abb. 45: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen der Molkenprotein-Fractionen (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = α -LA-/ BSA-/ IG-Fraktion; Fraktion 2 = β -LG-Fraktion)

Die sensorische Prüfung der mit Trypsin aus Molkenproteinisolat und anschließender Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol hergestellten Hydrolysate hat ergeben, dass das Retentat, das Peptide mit einer Molmasse von >10.000 g/mol enthält, höhere Intensitäten hinsichtlich der Geschmackseindrücke dumpf/muffig, bitter und umami aufweist (vgl. Abb. 46). Auch im Geruch wurde diese Fraktion in Bezug auf die Merkmalseigenschaften „dumpf/muffig, Stallgeruch, süßlich“ als intensiver empfunden. Das Permeat wird von den Prüfern in wässriger Lösung als leicht bitter, umami und kochig eingestuft. Der intensivere „kochige“ Geruch des Permeats lässt sich auf den - im Vergleich zum gefriergetrockneten Konzentrat - stärkeren Wärmeeintrag während der Sprühtrocknung zurückführen.

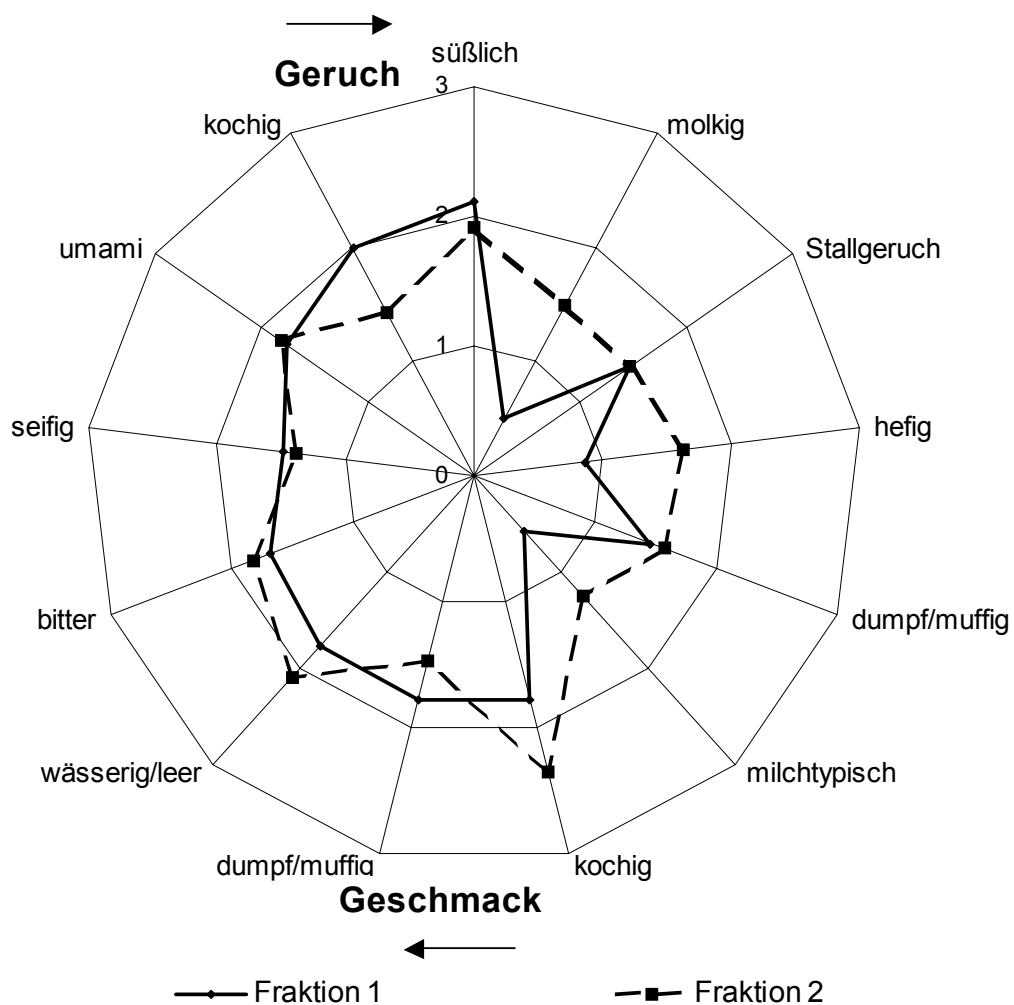


Abb. 46: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen des Permeats und des Retentats der UF (NMWCO = 10.000 g/mol) nach tryptischer Hydrolyse von Molkenproteinisolat (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = Permeat; Fraktion 2 = Retentat)

Die sensorische Prüfung der mit Chymotrypsin gewonnenen Hydrolysate hat für das Permeat und das Retentat unterschiedliche Profile ergeben, die Lösung des Retentats wies größtenteils höhere Intensitäten der detektierten Geruchs- und Geschmacksmerkmale (Geschmack: dumpf/muffig, bitter, seifig, umami; süßlicher Geruch, Stallgeruch, hefiger und dumpf/muffiger Geruch) auf (vgl. Abb. 47).

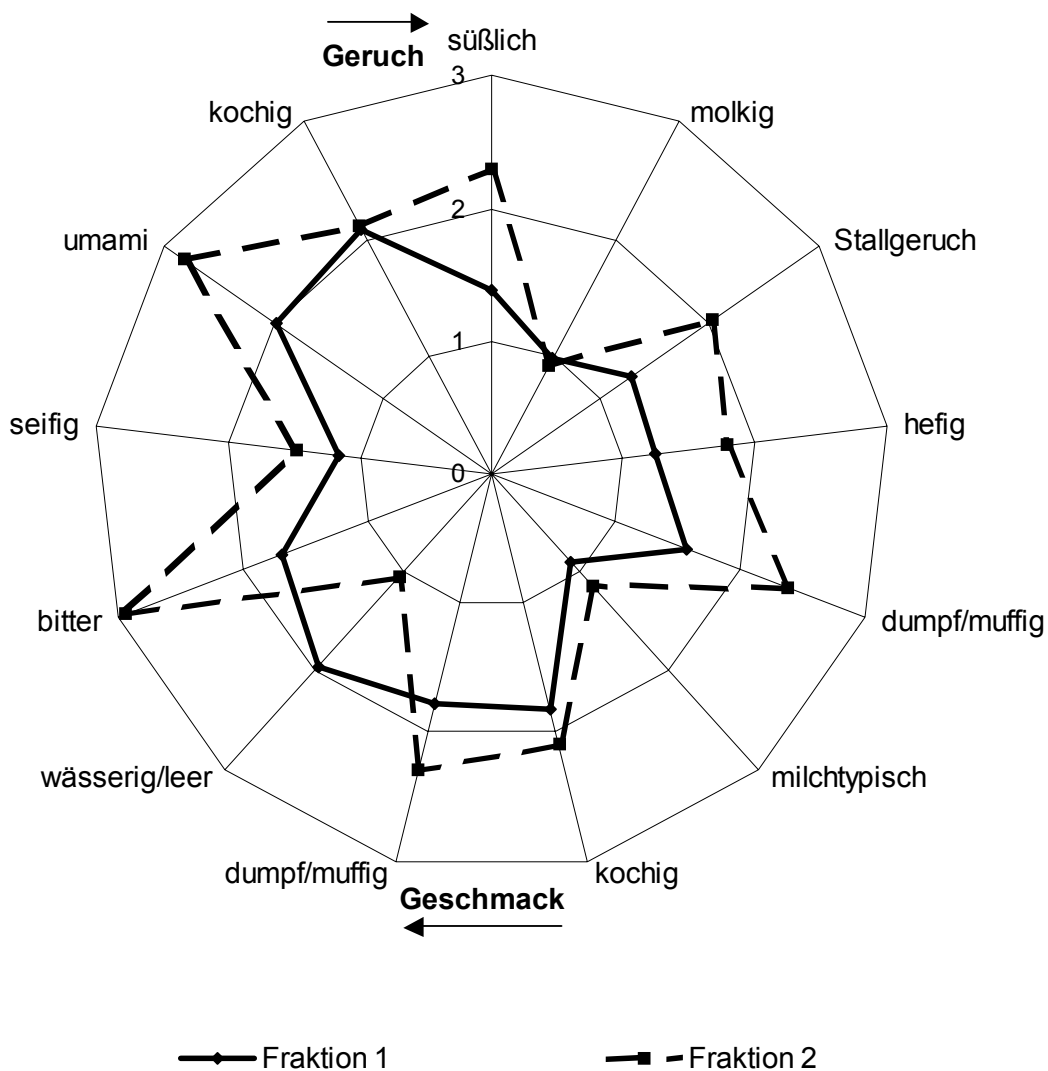


Abb. 47: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen des Permeats und des Retentats (Konzentrats) nach chymotryptischer Hydrolyse von Molkenproteinisolat (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = Permeat; Fraktion 2 = Retentat)

Das Ergebnis der Verkostung zeigt, dass das Retentat der UF (NMWCO 10000 g/mol) des Molkenproteinisolats mit Chymotrypsin in wässriger Lösung negative Geschmackseindrücke hinterlässt, es sind Bitterpeptide entstanden, die vom Panel als deutlich erkennbar einge-

schätzt wurden. Bei Anwendung in Lebensmitteln wird der Geschmack zusätzlich von den anderen Zutaten beeinflusst. Ein negatives Hervortreten der Retentatfraktion wäre möglich, ein negatives Hervortreten der Permeatfraktion in Lebensmitteln ist jedoch nicht zu befürchten.

4.3. Schaumbildungseigenschaften

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinen dargestellt. Sie sind darüber hinaus im Anhang tabellarisch zusammengefasst.

Um die Fraktionen und Hydrolysate mit den Ausgangslösungen zu vergleichen, wurden diese ebenfalls aufgeschäumt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden als Standards angesehen und nicht als Ergebnisse, aufgrund dieser Tatsache werden sie nur im Vergleich mit den modifizierten Produkten diskutiert und nicht als eigenständige Ergebnisse. Zu den Standards gehören die rekonstituierte Magermilch, Vollmilch, Natriumcaseinat, Molkenproteinisolat und Molkenproteinkonzentrat.

Wenn nicht anders beschrieben, sind alle Lösungen mit einer Konzentration von 3,4% Protein angesetzt worden, um Vergleichbarkeit untereinander und mit Kuhmilch zu ermöglichen.

4.3.1. Rekonstituierte Magermilch und Vollmilch

Um die Schaumbildungseigenschaften der Milchproteinfraktionen und der –hydrolysate mit Standards vergleichen zu können, wurden rekonstituierte Magermilch und Vollmilch verwendet. Um eine vollständige Hydratisierung der Proteine zu erreichen, wurde das Magermilchpulver zwei Stunden unter Rühren gelöst und anschließend verschäumt, die Vollmilch wurde nach Herstellung verschäumt.

Rekonstituierte Magermilch

Zur Prüfung der Präzision der Aufschäummethodik wurde rekonstituierte Magermilch aus low-heat Magermilchpulver in 10facher Wiederholung unter gleichen Bedingungen durchgeführt (vgl. Tab. 32). Der Variationskoeffizient der Parameter Overrun, Schaumdichte, Drainage-Endwert und Blasendurchmesser nach 60 Sekunden liegt unter 5%, diese Parameter sind damit statistisch signifikant.

Tab. 32: Ergebnisse der Versuchsreihe zur Prüfung der Präzision der Aufschäummethodik mit rekonstituierter Magermilch (n=10)

	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Overrun [%]	700,18	698,92	30,69	4,38
Schaumdichte [g/cm ³]	0,13	0,13	0,01	4,49
Drainage-Endwert [%]	76,62	77,36	3,26	4,26
Blasendurchmesser nach 60 s	0,16	0,17	0,01	3,72
Blasendurchmesser nach 1200 s	0,20	0,20	0,01	7,02

Der Variationskoeffizient des Mittelwerts Blasendurchmesser nach 1200 Sekunden liegt über 5%. Die Blasengrößenbewertung mittels Digitalphotographie sowie die anschließende Bearbeitung und Auswertung der Bilder ist insbesondere von der manuellen Einstellung der Bildbearbeitungsparameter abhängig. Die durchgeführte Segmentierung (Umwandelung des Bildes von Grautönen in Schwarz-Weiß) wird per Hand stufenlos eingestellt. Die optimale Auswertbarkeit des Bildes wird vom Auswertenden per subjektivem optischen Eindruck bestimmt und durchgeführt. Eine geringe Unterschiedlichkeit des Blasenprofils kann durch kleinste Einstellungsunterschiede in differierende Ergebnisse umgewandelt werden.

Rekonstituierte Magermilch, konzentrationsabhängig (0,5-3,0% Proteinkonzentration)

Rekonstituierte Magermilch wurde mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 3,0% verschäumt, um Unterschiede in den Schaumbildungseigenschaften in Abhängigkeit von der Konzentration zu prüfen.

Tab. 33: Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter Magermilch in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0,5-3,0% Protein)

Messparameter		Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
					60 s	1200 s	
Rekonstituierte (0,5%)	Magermilch	0,12	770	50,1	0,23	0,27	84,9
Rekonstituierte (1,0%)	Magermilch	0,14	641	49,7	0,23	0,25	85,4
Rekonstituierte (1,5%)	Magermilch	0,15	588	49,9	0,23	0,24	83,4
Rekonstituierte (2,0%)	Magermilch	0,15	591	49,4	0,25	0,24	84,7
Rekonstituierte (2,5%)	Magermilch	0,17	496	48,7	0,23	0,27	81,8
Rekonstituierte (3,0%)	Magermilch	0,18	475	49,1	0,22	0,25	82,6

Mit zunehmender Proteinkonzentration nahm die Schaumdichte zu, der Overrun verringerte sich dementsprechend (vgl. Tab. 33). Die Oberflächenspannung variierte nur geringfügig. Der mittlere Blasengrößendurchmesser der Schäume variiert nur geringfügig zwischen den Versuchsreihen.

Der Drainage-Endwert der Schäume mit 2,5 und 3,0% Protein ist etwas geringer und der Schaum stabiler als die Schäume aus rekonstituierter Magermilch mit geringerer Proteinkonzentration (vgl. Tab. 33). Der Verlauf der Drainage unterscheidet sich kaum zwischen den Proteinkonzentrationen (vgl. Abb. 48).

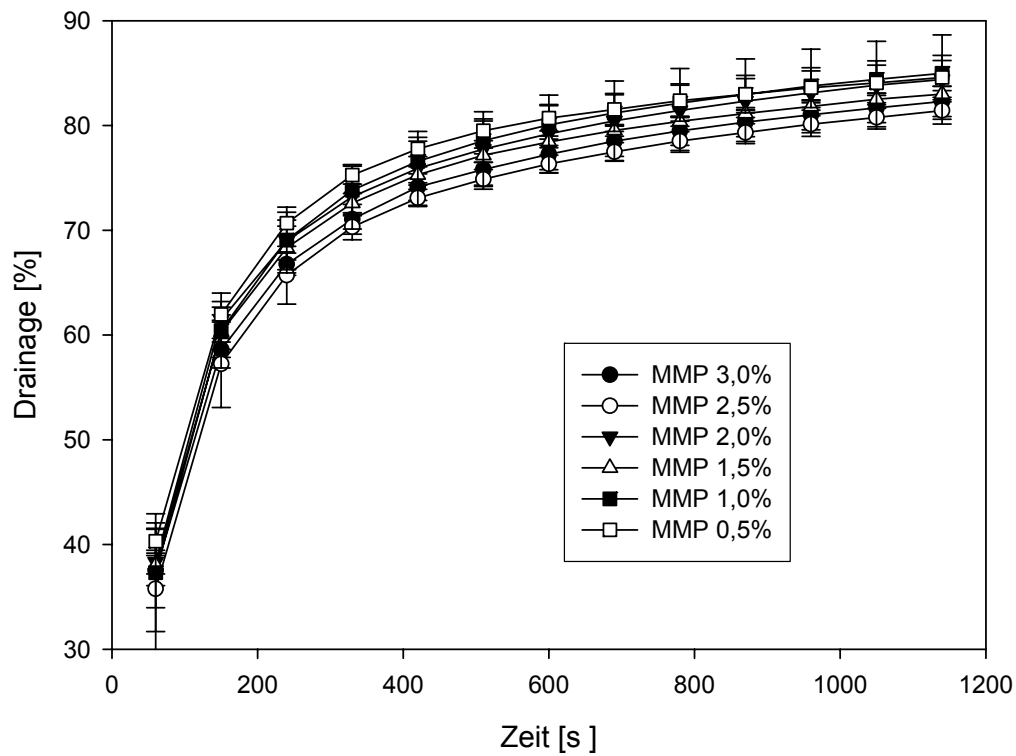


Abb. 48: Drainageverlauf der Schäume aus rekonstituierter Magermilch mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 3,0% Protein.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und den Schaumbildungseigenschaften ist nur in Bezug auf die Aufschlagfähigkeit der rekonstituierten Magermilchlösungen zu erkennen, mit zunehmendem Proteingehalt nimmt der Overrun ab. Eine Zunahme der Dichte und somit eine Abnahme des Overruns wird auch von Borchering (2004) beschrieben. Britten und Lavoie (1992) beschreiben eine Abnahme der Schaumexpansion mit zunehmendem Proteingehalt (Proben: Ovalbumin, Natriumcaseinat, Molkenproteinisolat), das Aufschlagverfahren unterscheidet sich jedoch von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten.

Vollmilch

Zur Charakterisierung einer Milch die Fett enthält, wurde Vollmilch im Fettgehalt eingestellt (3,5%), pasteurisiert, homogenisiert und verschäumt. Der Vergleich mit rekonstituierter Magermilch soll zeigen, ob der Fettgehalt einen Einfluss auf die Messparameter hat.

Tab. 34: Schaumbildungseigenschaften von Vollmilch (3,5% Fett) im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Magermilch-Standard (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Vollmilch 3,5% Fett	0,13	737	48,1	0,12	0,17	88,2

Der Overrun der Vollmilch ist im Vergleich zu dem der rekonstruierten Magermilch etwas höher (vgl. Tab. 34). Die Oberflächenspannung und die Schaumdichte unterscheiden sich kaum voneinander. Die durchschnittliche Blasengröße des Schaums aus Vollmilch ist geringer als die von Magermilch, der Schaum ist feinporiger. Nach einer Standzeit von 20 Minuten hat sich die durchschnittliche Blasengröße einander angenähert, die Blasengröße der Vollmilch ist nicht signifikant geringer als die der rekonstruierten Magermilch.

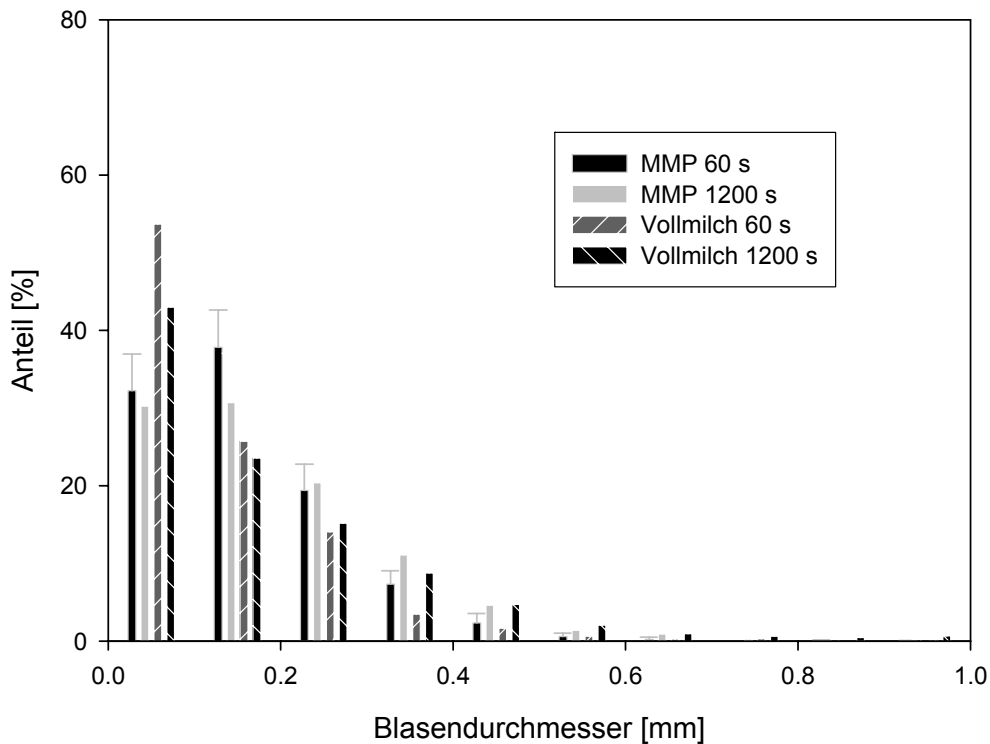


Abb. 49: Blasengrößenverteilung der Schäume aus Vollmilch im Vergleich mit den Schäumen aus rekonstituierter Magermilch

Die Blasengrößenverteilung der Schäume aus rekonstituierter Magermilch unterscheidet sich von dem aus Vollmilch darin, dass der höchste Anteil der Blasen des Vollmilchschaums nach einer Minute und nach 20 Minuten aus Blasen der kleinsten Größenklasse (0,0-0,1 mm) besteht, während der größte Anteil der Blasen des Schaums aus rekonstituierter Magermilch nach 60 Sekunden einen größeren Durchmesser von 0,1 bis 0,2 mm hat (vgl. Abb. 49). Nach zwanzig Minuten Standzeit ist der Anteil der Blasen im Schaum der rekonstituierten Magermilch mit einem Durchmesser von 0,1-0,2 mm zurückgegangen, er ist genauso groß wie der Anteil der kleineren Größenklasse.

Der Drainage-Endwert der Vollmilch ist 12% höher als der der rekonstruierten Magermilch. Der Endwert der Drainage liegt bei über 88%, nur noch 12% der Flüssigkeit sind nicht drainiert und befinden sich noch zwischen den Lamellen der Blasen (vgl. Tab. 34).

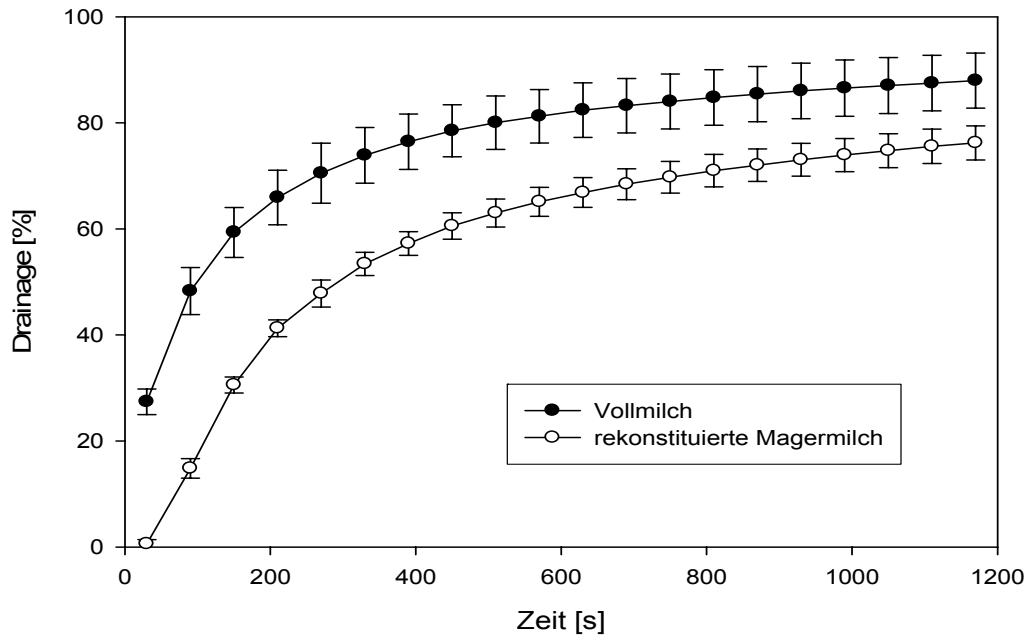


Abb. 50: Drainageverlauf der Schäume aus Vollmilch im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch

Der Drainageverlauf der Schäume aus Vollmilch ist schon beim ersten Messpunkt 25% höher als die Drainage des Schaums aus rekonstituierter Magermilch. Nach zwanzig Minuten Beobachtungszeit hat sich der Verlauf der Drainagekurve des Schaums der rekonstituierten Magermilch dem des Schaums aus Vollmilch angenähert, jedoch befindet sich in dem Schaum aus Magermilch noch wesentlich mehr Flüssigkeit.

Der Schaum aus Vollmilch ist im Vergleich mit dem Schaum aus rekonstituierter Magermilch feinporiger, die Stabilität ist jedoch deutlich geringer. Der Overrun der Milch wurde von dem Fettgehalt in diesen Experimenten nicht beeinflusst, dieses Ergebnis stimmt mit Borchering (2004) überein.

Die Vollmilch enthält im Gegensatz zur Magermilch 3,5% Fett, vor der Verschäumung wurden eine Pasteurisierung und eine Homogenisierung durchgeführt, die letztere um eine gleichmäßige Verteilung der Fettkügelchen zu garantieren. Freies Fett beeinflusst Proteinschäume negativ in Bezug auf die Schaumbildungseigenschaften, schon geringe Mengen freies Fett können die Aufschlagfähigkeit der Ausgangslösung erheblich herabsetzen (Kinsella, 1984, Walstra et al., 2006). Die Fettkügelchen reichern sich ebenfalls an der Oberfläche an und produzieren „Risse“ im Proteinfilm. Dadurch kommt es zur Koaleszenz der Blase (Walstra, 2006).

Die Homogenisierung wird durchgeführt, um die Fettkugeln der Rohmilch zu zerkleinern und die Aufrahmung zu verringern. Die Fettkugeln sind mit einer Fettkugelmembran umgeben, die in der Milchdrüsenzellen mit dem Fett abgeschnürt wird, sie wirkt als Emulgator um die Fettkügelchen in Milch zu emulgieren (Cano-Ruiz und Richter, 1997). Bei der Entstehung

kleinerer Fettkugeln muss zusätzliches Membranmaterial eingesetzt werden, es entsteht eine sekundäre Membran, eine Grenzschicht, die durch die Adsorption von Milchproteinen, vornehmlich Caseinen gebildet wird (Schlimme und Buchheim, 1999). Dadurch werden auch die Eigenschaften der Fettkügelchen beeinflusst, sehr kleine Fettkügelchen nähern sich in den Eigenschaften denen von großen Caseinmicellen an. Durch die Bildung einer sekundären Membran um die Fettkügelchen verringert sich die Proteinkonzentration in der Milch, Borchering (2004) berechnet in pasteurisierter Milch mit 3,5% Fett eine adsorbierte Proteinmenge von ca. 22% des Gesamtproteins. Eine Beeinflussung der Schaumstabilität durch die geringere Proteinmenge, die zur Verfügung steht, kann vernachlässigt werden, da die benötigte Proteinmenge zur Bildung von Grenzflächen 2 bis 37 mg /m² beträgt. Die Proteinmenge, die nach Homogenisierung in der Vollmilch verbleibt, reicht aus, um die Grenzflächen zu stabilisieren (Borchering, 2004).

Die Erhitzung der Milch auf Temperaturen über 70°C führt generell zu einer Teildenaturierung von Molkenproteinen (Corredig und Dalgleish, 1996). Eine Teildenaturierung erhöht die Aufschlagfähigkeit von Proteinen, da intramolekulare funktionelle Gruppen durch die Denaturierung exponiert werden, und der schnellen Stabilisierung der Grenzfläche zur Verfügung stehen (Kinsella, 1981). Dieser Aspekt kann hier jedoch vernachlässigt werden, da das Magermilchpulver bei der Herstellung (Trocknung etc.) ebenfalls thermischer Behandlung ausgesetzt war.

4.3.2. Caseine und Caseinfraktionen

Casein ist die Hauptproteinfraktion von Milch. Aufgrund ihres mengenmäßig größten Anteils (78% der Proteinfraktion) haben die Caseine einen großen Einfluss auf das Schaumbildungsverhalten von Milch. Um die Schaumbildungseigenschaften der Caseine zu charakterisieren, wurden micellares Casein aus der MF und die angereicherten Fraktionen aus den Verfahren zur Anreicherung von β -Casein einerseits und α_s - κ -Casein bzw. α_s -/ ρ - κ -Casein andererseits mit rekonstituierter Magermilch und kommerziellem Natriumcaseinat verglichen.

Micellares Casein und Natriumcaseinat

Die Schaumbildungseigenschaften von Lösungen mit micellarem Casein wurden bestimmt. Das micellare Casein wurde durch das Verfahren der Mikrofiltration (Mittlerer Porendurchmesser 0,1 μ m) von Magermilch gewonnen (vgl. Kap. 4.1.1). Dabei verbleibt das Casein im Retentat, da es durch den micellaren Verbund hohe Molmassen aufweist. Im Permeat der Mikrofiltration von Magermilch finden sich die Molkenproteine, die als einzelne globuläre Proteine in der Magermilch vorkommen und die in der Milch enthaltene Lactose wieder. Natriumcaseinatlösung mit einem Proteingehalt von 3,4% wurde als Vergleichs-Standard verschäumt.

Verglichen mit den Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter Magermilch hat Natriumcaseinat einen höheren Overrun und eine geringere Dichte (vgl. Tab. 35). Die Dichte der Schäume aus micellarem Casein in wässriger Lösung ($0,09 \text{ g/cm}^3$) ist niedriger als die der Schäume aus rekonstituierter Magermilch ($0,13 \text{ g/cm}^3$). Der Overrun ist entsprechend höher.

Tab. 35: Schaumbildungseigenschaften von Natriumcaseinat im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Natriumcaseinat (3,4%)	0,11	849	46,1	0,14	n.m.	97,1
Casein, micellar (3,4%)	0,09	1113	49,6	0,12	0,16	81,0

Die Oberflächenspannung der micellaren Caseinlösung ist ebenfalls höher als die der rekonstituierten Magermilch. Die Oberflächenspannung von Natriumcaseinat ist um 2,2 mN/m niedriger als die von rekonstituierter Magermilch.

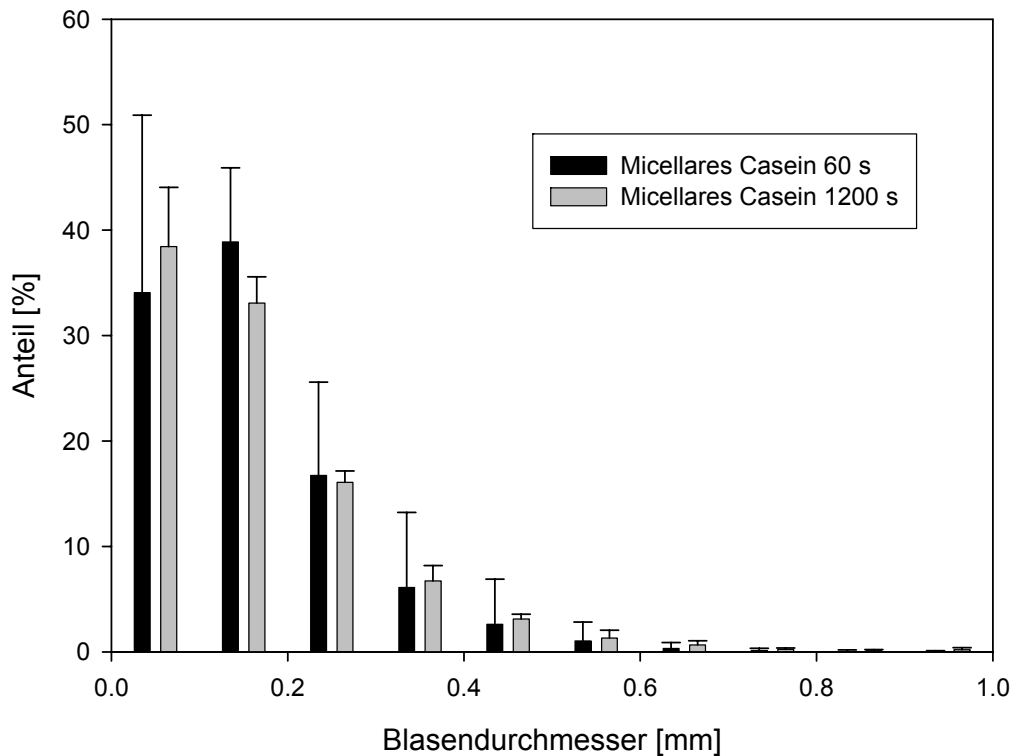


Abb. 51: Größenverteilung der Blasendurchmesser [mm] von Schäumen aus Lösungen mit micellarem Casein nach einer Minute und 20 Minuten Standzeit

Der durchschnittliche Blasendurchmesser von Natriumcaseinat ist nach einer Standzeit von 60 Sekunden um 0,02 mm geringer als bei der rekonstituierten Magermilch, nach 1200 Sekunden ist der Schaum von Natriumcaseinat vollständig zerfallen, es konnte keine zweite Aufnahme gemacht werden, um den mittleren Blasendurchmesser zu ermitteln. Der mittlere Blasendurchmesser der Schäume aus micellarer Caseinlösung liegt nach 20 Minuten über dem nach einer Minute (0,16 vs. 0,12, vgl. Tab. 35). Abbildung 51 zeigt dagegen, dass die Blasendurchmessergrößenverteilung in den Milchsäumen nach 60 Sekunden und nach 1200 Sekunden sich voneinander differenzieren lassen.

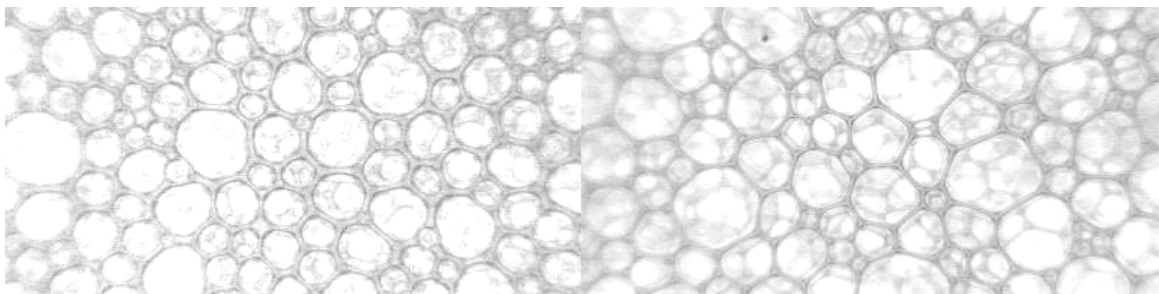


Abb. 52: Digitale Aufnahmen von Schäumen aus micellarem Casein in wässriger Lösung in nach einer Minute (links) sowie 20 Minuten Standzeit (rechts)

Der Vergleich der digitalen Aufnahmen von Schäumen aus micellarem Casein (vgl. Abb. 52) zeigt weitgehend vergleichbare Bilder nach einer Minute und nach zwanzig Minuten Standzeit. Der Unterschied ist geringer als bei den Schäumen aus rekonstituierter Magermilch.

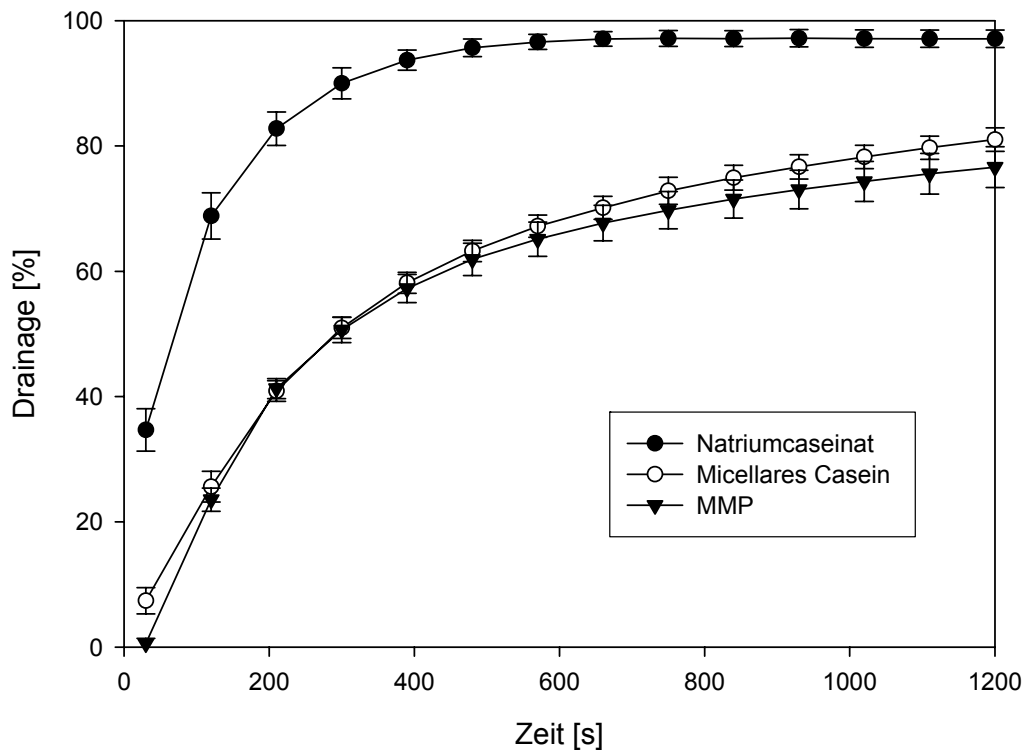


Abb. 53: Vergleich des Drainageverlaufs der Schäume aus rekonstituiertem micellarem Casein, rekonstituierter Magermilch und Natriumcaseinat in Abhängigkeit von der Zeit

Der Vergleich des Drainageverlaufs (vgl. Abb. 53) zeigt, dass die Drainage des Schaums aus Natriumcaseinat früher einsetzt und bereits nach 30 Sekunden über 30% der Flüssigkeit drainiert sind. Während die Drainage des Schaums aus rekonstituierter Magermilch stetig ansteigt, beträgt die Drainage des Schaums aus Natriumcaseinat nach 5 Minuten bereits 90%.

Der Vergleich des Verlaufs der Drainage der Schäume aus micellarem Casein in Abhängigkeit von der Zeit mit der Drainage der Schäume aus rekonstituierter Magermilch zeigt, dass die Kurven des Drainageverlaufs etwa gleichförmig verlaufen (vgl. Abb. 53). Die Drainage des Schaums beginnt nach ungefähr einer Minute, läuft zunächst linear und anschließend exponentiell bis sie abschließend einem Endwert zustrebt. Dieser Endwert liegt bei dem Schaum aus micellarem Casein geringfügig höher als der Drainageendwert der Schäume von rekonstituierter Magermilch mit 3,4% Protein (vgl. Tab. 35).

Vergleicht man den Verlauf der Drainage von Schäumen aus Lösungen mit micellarem Casein mit dem von Natriumcaseinat, so fällt auf, dass diese beiden sich deutlich voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 53). Während der Verlauf der Drainage von micellarem Casein dem von rekonstituierter Magermilch gleicht, fällt der Schaum aus Natriumcaseinat schneller in sich zusammen und weist somit eine geringere Stabilität auf. Der Schaum des rekonstituierten micellaren Casein ist demzufolge aufgrund der micellaren Struktur, die durch das Membrantrennverfahren (Mikrofiltration) erhalten geblieben ist, im Vergleich stabiler. Natriumcaseinat ist zwar ein besseres Aufschlagmittel als micellares Casein, jedoch ist die Stabilität des Schaums aus Natriumcaseinat geringer.

Aus dem Vergleich der Aufschlagfähigkeit von Natriumcaseinat und micellarem Casein mit der von rekonstituierter Magermilch könnte interpretiert werden, dass freie Caseinmoleküle auf die Aufschlagfähigkeit, die durch einen hohen Overrun gekennzeichnet wird, einen positiven Einfluss haben. Die Beobachtung, dass mit höheren Caseingehalten ein höherer Overrun erzielt werden kann, kann durch Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden (Britten und Lavoie, 1992, Borchering, 2004). Caseine können sich aufgrund ihrer offenkettigen Struktur schneller entfalten und die Grenzfläche stabilisieren, das Resultat aus der schnelleren Grenzflächenstabilisierung ist eine höhere Aufschlagfähigkeit, die durch den höheren Overrun des Proteins mit mehr Caseinanteil (Natriumcaseinat) dokumentiert werden kann. Die höhere Stabilität des micellaren Caseins im Vergleich mit dem Natriumcaseinat könnte auf das Vorhandensein der micellaren Struktur zurückgeführt werden.

Roman und Sgarbieri (2006) führten ebenfalls Experimente durch, in denen sie Caseinkonzentrat aus der Mikrofiltration mit kommerziellem Caseinkonzentrat (Natriumcaseinat) verglichen. Sie stellten ebenfalls einen höheren Overrun des Caseinkonzentrats bei pH 6 fest. In der Stabilität der Schäume von micellarem Casein und Caseinkonzentrat stellen sie über 60 Minuten bei einem pH-Wert von 6,0 keine Unterschiede fest. Die Ergebnisse der Studie wurden mit einem anderen Aufschlagsystem durchgeführt, bestätigen aber die gute Aufschlagfähigkeit des Natriumcaseinats durch die einzelnen Caseinmoleküle, die im Gegensatz zum micellaren Casein nicht an eine micellare Struktur gebunden sind. Für die Mikrofiltration wurde rekonstituierte Magermilch als Ausgangsmaterial verwendet, in den vorliegenden Versuchen handelte es sich um Magermilch, die weniger Prozessschritten unterzogen worden war als das bereits getrocknete Magermilchpulver. Dadurch wurde nicht natives Caseinkonzentrat wie in den vorliegenden Versuchen hergestellt, in denen die micellare Struktur vorhanden ist. Borchering (2004) stellte ebenfalls eine höhere Aufschlagfähigkeit des Natriumcaseinats fest, die mit dem besseren Auffaltung und Grenzflächenbildung der einzelnen Caseinmoleküle begründet wird.

Fractionen aus Labcasein (β -Casein einerseits und α_S -/p-k-Casein andererseits)

Um die Schaumbildungseigenschaften der Caseinfraktionen zu untersuchen, wurden die angereicherte β -Casein-Fraktion und die angereicherte α_S -/p-k-Caseinfraktion aus der Caseinfraktionierung von Labcasein den Versuchen zur Bestimmung der Schaumbildungseigenschaften unterzogen. Um die Eigenschaften einzuschätzen werden die Ergebnisse von rekonstituierter Magermilch und micellarem Casein herangezogen.

Die Dichte der Schäume aus α_S - p - κ -Casein-Fraktion ist etwa gleich hoch wie die der Schäume aus rekonstituierter Magermilch mit 3,4% Protein, der Overrun nur geringfügig niedriger (vgl. Tab. 36). Gegenüber den Schäumen aus micellarem Casein ist der Overrun der α_S - p - κ -Casein-Fraktion fast um die Hälfte geringer (micellares Casein: 1113%, α_S - p - κ -Casein-Fractionen: 630%).

Tab. 36: Messwerte der Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften der angereicherten α_S - p - κ -Casein- und β -Casein-Fraktion im Vergleich mit micellarem Casein und rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Casein, micellar (3,4%)	0,09	1113	49,6	0,12	0,16	81,0
α_S -/ p - κ -Casein (3,4%)	0,14	630	48,6	0,19	n.m.	83,6
β -Casein (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.

Die Oberflächenspannung der β -Casein-Fraktion in wässriger Lösung ist geringer als die der α_S - p - κ -Casein-Fraktion (vgl. Tab. 36). Damit wird deutlich, dass die Grenzflächenaktivität des β -Caseins prinzipiell höher ist als die der α_S - p - κ -Casein-Fractionen. Die Oberflächenspannung der α_S - p - κ -Fraktion ist genau so hoch wie die der rekonstituierten Magermilch, die Oberflächenspannung von β -Casein ist etwas geringer. Micellares Casein aus der Fraktionierung mittels Mikrofiltration hat eine etwas höhere Oberflächenspannung als die beiden aus Labcasein gewonnenen angereicherten Caseinfraktionen.

Die Blasengrößenverteilung konnte nur von den mit α_S - p - κ -Casein-Fractionen hergestellten Schäumen nach 60 Sekunden gemessen werden (vgl. Abb. 54). Die Anteilsverteilung der Größenklassen zeigt, dass der größte Teil der Blasen Durchmesser von bis zu 0,1 mm besitzt. Durchmesser von mehr als 0,7 mm sind kaum vorhanden. Nach 1200 Sekunden konnten keine Aufnahmen gemacht werden, da der Schaum bereits weitgehend zerfallen war. Vom β -Casein-Schaum in wässriger Lösung konnten keine Bilder gemacht werden, da dieser sofort nach der Herstellung zerfiel.

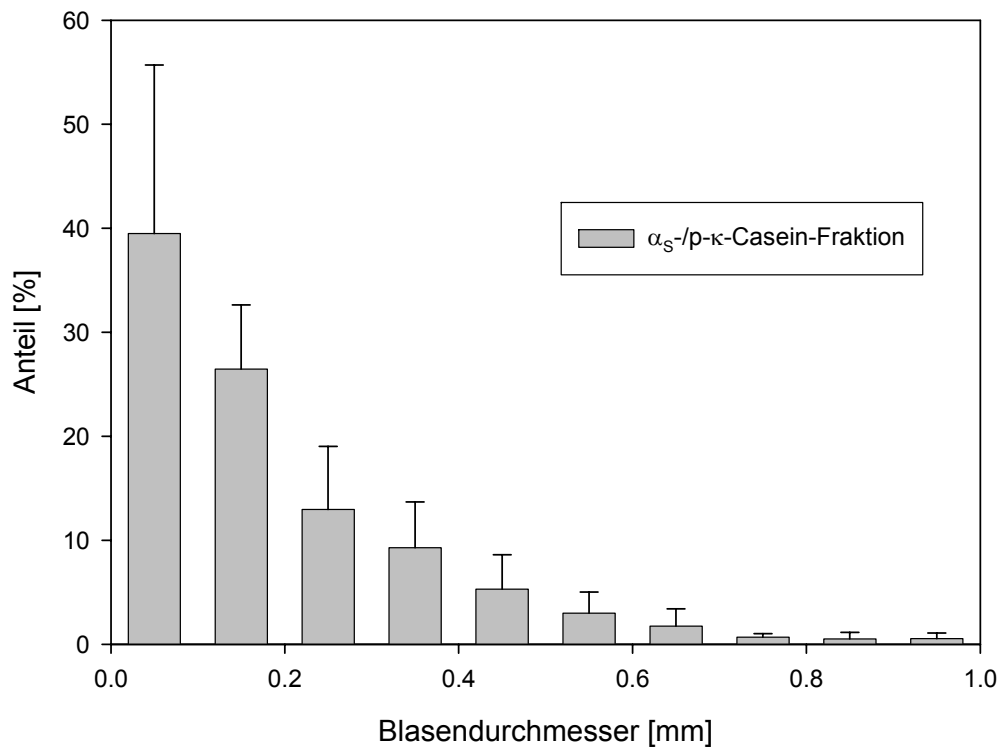


Abb. 54: Blasengrößenverteilung in Schäumen aus α_S - p - κ -Casein-Fractionen in wässriger Lösung (3,4% Protein)

Die Schaumbildungseigenschaften des β -Caseins konnten unter den gegebenen Bedingungen in wässriger Lösung (stark hydrophiles System!) nicht charakterisiert werden, weil keine ausreichend stabilen Schäume gebildet werden konnten (vgl. Tab. 36).

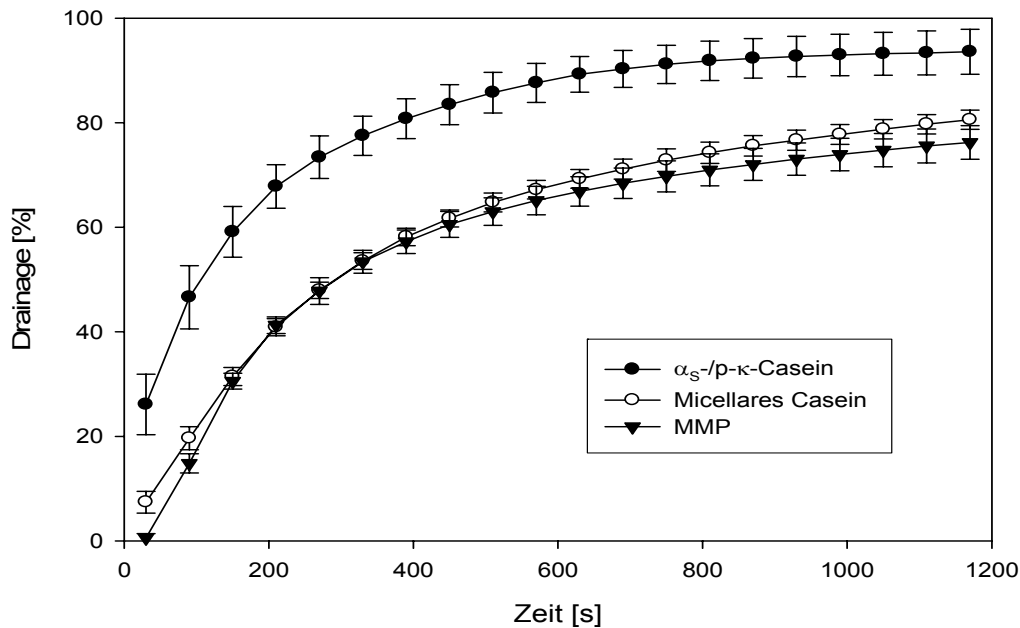


Abb. 55: Drainageverlauf der Schäume aus α_s - p - κ -Casein-Fractionen in wässriger Lösung im Vergleich mit der Drainage von micellarem Casein und Magermilchpulver

Der Drainageverlauf von Schäumen aus α_s - p - κ -Casein in wässriger Lösung zeigt 26% drainierte Flüssigkeit bereits nach den ersten 30 Sekunden (vgl. Abb. 55). Die Schaumbblasen zerfallen schneller als die der Schäume aus micellarem Casein. Nach der Hälfte der Messzeit (600 Sekunden) sind bereits 88,5% der Blasen zerfallen und die Drainageflüssigkeit aufgefangen worden.

Obwohl die Oberflächenspannung der angereicherten β -Casein-Fraktion geringer als die der α_s - p - κ -Casein-Fraktion ist, und der Theorie zufolge (Darewicz et al., 2000) die Fähigkeit zur Förderung der Grenzflächenbildung und Stabilität in Schäumen größer sein müsste, kann dieser Sachverhalt in den vorliegenden Studien zu den Schaumbildungseigenschaften nicht bestätigt werden. Der Schaum, der mit der β -Casein-angereicherten Fraktion erzeugt wurde zerfiel in wenigen Sekunden wieder, die vorhandenen Proteine waren nicht in der Lage die Grenzflächenspannung über den Beobachtungszeitraum so zu senken, dass der Schaum stabil gehalten werden konnte.

Erhöhung des Anteils von β -Casein in rekonstituierter Magermilch

Um zu prüfen, ob eine Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit β -Casein zu einer Verbesserung der Aufschlagfähigkeit oder der Stabilität der Schäume durch synergetische Effekte mit anderen Milchproteinen führt, wurde ein Teil des Magermilchpulvers durch die β -Casein-Fraktion ersetzt. In der Versuchreihe wurden 0,03 bis 1,5% Magermilchprotein durch die β -Casein-Fraktion ersetzt.

Tab. 37: Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter, mit β -Casein angereicherter Magermilch im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
3,37% MMP + 0,03% β -Casein	0,15	601	47,7	0,19	0,23	86,7
3,3% MMP + 0,3% β -Casein	0,15	607	48,1	0,18	0,21	85,3
2,8% MMP + 0,6% β -Casein	0,16	528	47,7	0,18	0,22	80,6
1,9% MMP + 1,5% β -Casein	0,18	484	47,1	0,17	0,17	86,1

Durch die Erhöhung des β -Casein-Anteils nahm der Overrun ab und die Schaumdichte zu (vgl. Tab. 37). Bereits die Zugabe von 0,03% β -Casein-Fraktion veränderte die Aufschlagfähigkeit im Vergleich zu der von Magermilch negativ. Mit zunehmendem β -Casein-Anteil verringerte sich die Aufschlagfähigkeit bis zu einem Wert von 484% bei dem Ersatz von 1,5% Magermilchpulver durch angereicherte β -Casein-Fraktion. Eine Verbesserung der Aufschlagfähigkeit konnte durch die Zugabe der β -Casein-Fraktion nicht erreicht werden.

Die Oberflächenspannung ist gegenüber der Oberflächenspannung von rekonstituiertem Magermilchpulver in der gesamten Versuchsreihe nur gering abgesenkt. Der durchschnittliche Blasengrößendurchmesser nach einer Minute Standzeit hat sich gegenüber der rekonstituierten Magermilch vergrößert, bei den Versuchen mit 0,03-0,6% Proteinaustausch vergrößert sich der durchschnittliche Blasengrößendurchmesser nach 20 Minuten Standzeit. Der Austausch von 1,5% Protein führte im Versuch zu einer gleich bleibenden durchschnittlichen Blasengröße nach der längeren Standzeit.

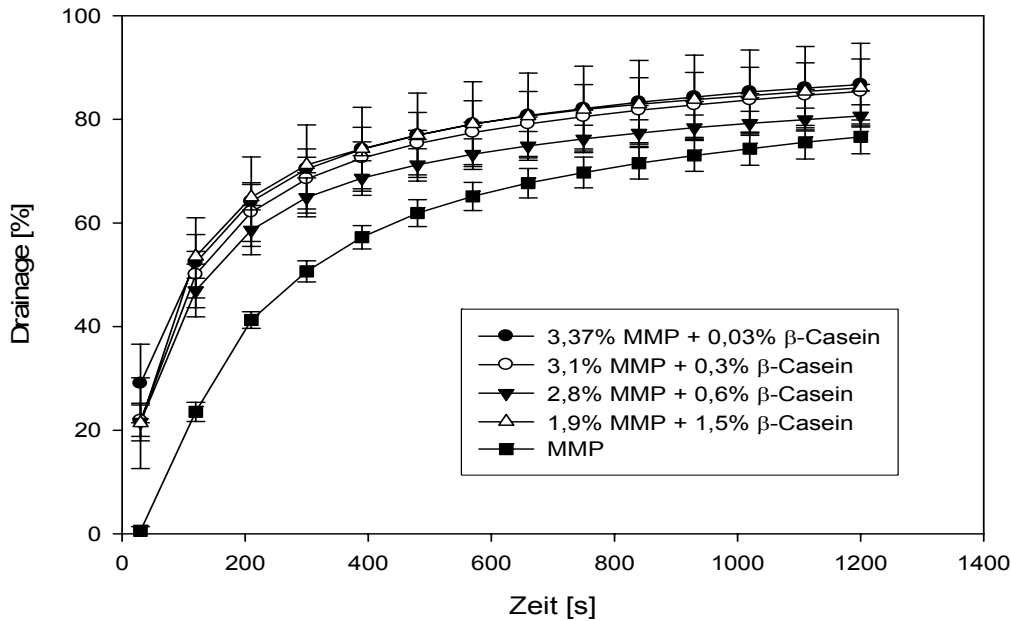


Abb. 56: Drainageverlauf von rekonstituierter Magermilch angereichert mit β -Casein aus der Fraktionierung von Labcasein (Ersatz von Magermilchprotein: 0,03-1,5%) im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Die Drainage der Schäume aus mit β -Casein angereicherter rekonstituierter Magermilch ist beim ersten Messwert nach 30 Sekunden bereits höher als bei rekonstituierter Magermilch (3,4% Protein). Der Anteil der drainierten Flüssigkeit ist im gesamten Verlauf höher. Der Drainageendpunkt ist um durchschnittlich 10% höher. Ausnahme hiervon macht nur der Schaum der Probe mit 0,6% β -Casein, der Drainageendpunkt liegt bei 80% und die Kurve des Drainageverlaufs ist der von rekonstituiertem Magermilchpulver ähnlicher.

Durch die Erhöhung des β -Caseins in rekonstituierter Magermilch konnte keine Verbesserung der Schaumbildung erzielt werden. Caessens (1999a) vermutet in ihrer Arbeit, dass β -Casein durch die hydrophoben Gruppen stabilisierend auf Schäume wirken kann. Diese Vermutung kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Weder in Hinblick auf das Aufschlagverhalten noch auf die Stabilität der Schäume wirkte sich der erhöhte Gehalt an β -Casein aus der Fraktionierung mit Labcasein positiv aus.

β -Casein-Fraktion aus partieller Fraktionierung von Natriumcaseinat mit Mikrofiltration

Die beiden angereicherten β -Casein-Fractionen unterscheiden sich in ihren Schaumbildungseigenschaften. Im Gegensatz zum β -Casein aus Labcasein, das einen instabilen Schaum ausbildet, blieb der Schaum aus der β -Casein-Lösung (Mikrofiltration) solange stabil, dass Messungen vorgenommen werden konnten (vgl. Tab. 38).

Tab. 38: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten β -Casein-Fractionen aus der Fraktionierung von Labcasein und Mikrofiltration im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
β -Casein (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.
β -Casein aus Mikrofiltration (3,4%)	0,10	975	45,3	0,18	n.m.	95,7

Der Overrun der β -Casein-Lösung (Mikrofiltration) ist im Vergleich zu dem Overrun von rekonstituierten Magermilchlösungen hoch (vgl. Tab. 38). Die Drainage ist im gesamten Verlauf etwa 15% höher als die Drainage von rekonstituierter Magermilch mit 3,4% Protein (vgl. Abb. 57). Der Schaum aus der β -Casein-Lösung aus der Mikrofiltration war zum Ende der Messzeit so weit zerfallen, dass keine zweite Digitalaufnahme gemacht werden konnte. Der Drainage-Endwert von 96% deutet auf einen vollständigen Zerfall des Schaums hin. Die mittlere Blasengröße von 0,18 mm bestätigt den optischen Eindruck, dass der Schaum feinporig ist. 85% der Blasen haben einen Blasendurchmesser von 0,0 bis 0,3 mm (ohne Abbildung).

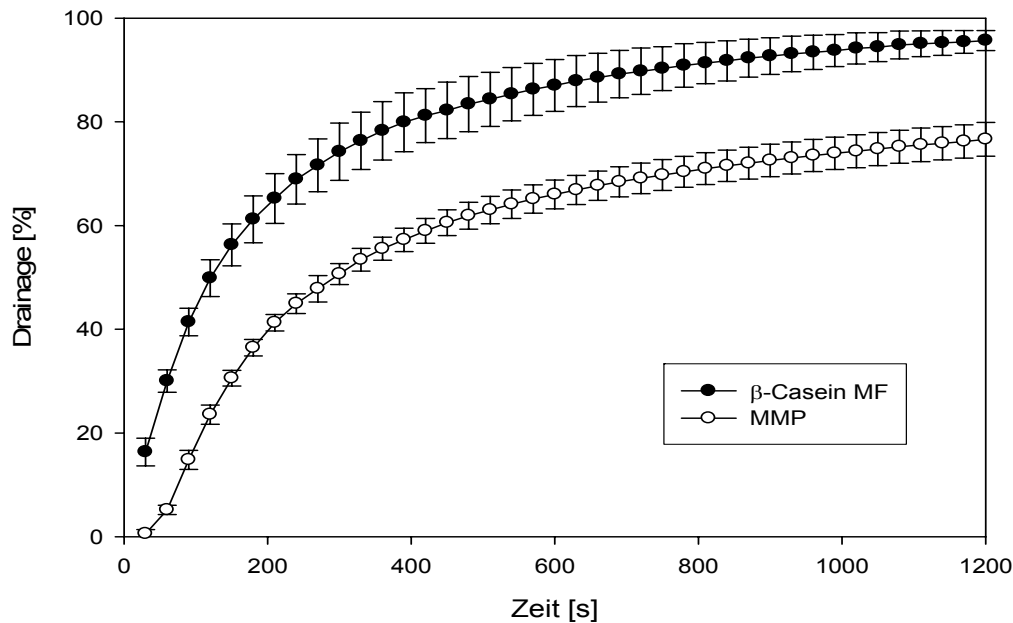


Abb. 57: Drainageverlauf von β -Casein aus der Mikrofiltration im Vergleich mit Magermilchstandard (rekonstituiert)

Die Oberflächenspannung der Lösung aus β -Casein aus der Mikrofiltration ist geringfügig niedriger als die Oberflächenspannung der Lösung von β -Casein aus Labcasein (vgl. Tab. 38).

Der Vergleich der β -Casein-Fractionen aus der Fraktionierung von Labcasein und aus der Mikrofiltration zeigt deutliche Unterschiede im Schaumverhalten. Während die β -Casein-Fraktion aus der MF eine hohe Aufschlagfähigkeit besitzt, kann diese bei β -Casein aus der Fraktionierung von Labcasein nicht gemessen werden, da der Schaum nach der Produktion sofort wieder zerfällt. Die hohe und rasche Drainage und der vollkommene Zerfall des Schaums nach 20 Minuten Standzeit zeigen, dass auch das Schäume mit β -Casein aus der Mikrofiltration eine geringere Stabilität aufweisen als solche aus rekonstruierter Magermilch.

In der Literatur wird β -Casein aufgrund seiner offenkettigen Tertiärstruktur als fähig beschrieben, sich an Grenzflächen zu entfalten (Kinsella, 1981). An der Grenzfläche bilden die Aminosäuren 1-5 eine Schleife, die in die hydrophobe Phase ragt. Die Kette der Aminosäuren 50-209 richtet sich parallel zur Grenzfläche aus. Dadurch wird die Grenzfläche stabilisiert und die Schaumbildung ermöglicht (Walstra und De Roos, 1993; Dickinson, 1994). Die Grenzflächenstabilität von Schäumen aus β -Casein ist jedoch von kürzerer Dauer als von Schäumen aus stark gefalteten oder globulären Molekülen. Proteinschäume mit Proteinen wie β -Casein, die an Grenzflächen langgestreckte Filme mit einzelnen Molekülen erzeugen, bilden aufgrund fehlender Interaktion zwischen den Molekülen instabilere Schäume als Pro-

teine, die über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Interaktionen miteinander reagieren (Graham und Phillips, 1976, Kinsella, 1981).

Die Oberflächenspannung von beiden β -Casein-angereicherten Proteinkonzentraten in Lösung war geringer als die von rekonstituierter Magermilch und geringer als die der α_S - β - κ -Casein-angereicherten Fraktion. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein, die Fähigkeit zur Senkung der Oberflächenspannung von α_S -Casein wird als ergiebiger eingeschätzt (Lorient et al., 1989).

Obwohl β -Casein in der Lage ist sich an Wasser-Luft-Grenzflächen innerhalb kürzester Zeit anzulagern und einen stabilen Film von Molekülen auszubilden (Kinsella 1981), konnte in den vorliegenden Versuchen nur mit dem Proteinkonzentrat aus der Mikrofiltration ein Schaum ausgebildet werden.

Die Aufschlagfähigkeit des β -Casein aus der Mikrofiltration ist deutlich höher als die Aufschlagfähigkeit der α_S - β - κ -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein. Auch hier stimmen die Ergebnisse mit denen anderer Forschergruppen (Lorient et al., 1989) überein, wobei diese keine angereicherten Fraktionen in Lebensmittelqualität im Technikummaßstab verwendet haben, sondern über Ionenaustauschchromatographie gewonnene Fraktionen, deren Bedeutung für den Einsatz im Lebensmittel aufgrund der Kosten als gering eingeschätzt werden kann.

Die β -Casein-angereicherte Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein ist aus dem Fraktionierungsverfahren nicht in ähnlich nativer Form wie das β -Casein aus der Mikrofiltration bei kalten Temperaturen hervorgegangen. Mögliche Veränderungen des Moleküls könnten durch die Auflösung des Labcasein bei alkalischem pH-Wert und hoher Temperatur (pH 9,0, 60°C) entstanden sein. Die Messwerte der Aminosäureanalyse haben gezeigt, dass sich der Gehalt an Alanin und Lysin deutlich verringert hat (vgl. Kap. 4.1.3). Diese Ergebnisse können ein Hinweis dafür sein, dass sich die Proteine durch die Fraktionierung verändert haben. Durch erhöhte Temperatur bei alkalischem pH-Wert könnte Lysinalanin entstanden sein, sowie andere Reaktionen zwischen den Proteinen (Furosinbildung, mit Lactose geringe Mengen von Maillardprodukten). Eine geringere biologische Wertigkeit des Proteins ist durch den Verlust von Lysin nicht ausgeschlossen. Die Schaumbildungseigenschaften von β -Casein wurden durch die Prozessführung während der Fraktionierung aus Labcasein offensichtlich verschlechtert.

Caseine gelten verglichen mit den Molkenproteinen als hitzestabil, eine Ausflockung durch thermische Behandlung erfolgt erst ab 120°C (Guo et al., 1996; Zbikowska und Szerszunowicz, 2003). Ist die Proteinlösung jedoch sehr konzentriert, kann die Hitzeempfindlichkeit der Proteine bereits bei leicht erhöhten pH-Werten (>6,6) deutlich höher sein (Töpel, 2004).

An den hier dargestellten Ergebnissen kann deutlich gezeigt werden, dass das Verfahren zur Herstellung einer funktionellen Ingredienz einen Einfluss auf die resultierenden Eigenschaften hat.

4.3.3. Molkenproteine und Molkenproteinfraktionen

Nachfolgend werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften der Molkenproteinfraktionen dargestellt. Um den Einfluss der Proteine und anderer Bestandteile der Pulver auf die Schaumbildungseigenschaften zu erforschen, wurden kommerzielle Produkte (Molkenproteinkonzentrat und Molkenproteinisolat) sowie Molkenproteinpulver aus eigener Herstellung verschäumt. Molkenproteinisolat wurde als Ausgangsmaterial für die Fraktionierung der Molkenproteine verwendet und dient ebenso wie Molkenproteinkonzentrat als Standard.

Vergleich von Molkenproteinisolat und –konzentrat (kommerzielle Produkte) mit Molkenproteinkonzentrat aus der MF von Magermilch

Die Schaumbildungseigenschaften des Molkenproteinkonzentrats aus der Mikrofiltration von Magermilch wurden mit den Schaumbildungseigenschaften eines konventionellen Molkenproteinkonzentrats und eines Molkenproteinisolats verglichen.

Der Overrun der Schäume aus Molkenproteinisolat ist höher als der der Schäume aus den beiden Molkenproteinkonzentraten, entsprechend ist die Schaumdichte geringer (vgl. Tab. 39).

Tab. 39: Schaumbildungseigenschaften von Molkenproteinisolat, Molkenproteinkonzentrat und Molkenproteinkonzentrat aus Mikrofiltration (0,1 μm)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Molkenproteinkonzentrat (3,4%)	0,14	651	48,1	0,16	0,23	89,2
Molkenproteinisolat (3,4%)	0,11	853	49,5	0,13	0,14	90,1
Molkenproteinkonzentrat aus MF (3,4%)	0,13	712	43,4	0,12	0,15	83,6

Die Oberflächenspannung des Molkenproteinisolats ist deutlich niedriger als die der beiden Molkenproteinkonzentrate. Die Blasendurchmesser aller Schäume aus Molkenproteinpulvern haben im Vergleich zu Magermilchsäumen geringe Blasendurchmesser, sowohl nach einer Minute als auch nach 20 Minuten. Nach der längeren Standzeit hat sich die mittlere Blasengröße beim Molkenproteinisolat und Molkenproteinkonzentrat aus der MF kaum verändert, die mittlere Blasengröße des konventionellen Molkenproteinkonzentrats hat sich erhöht.

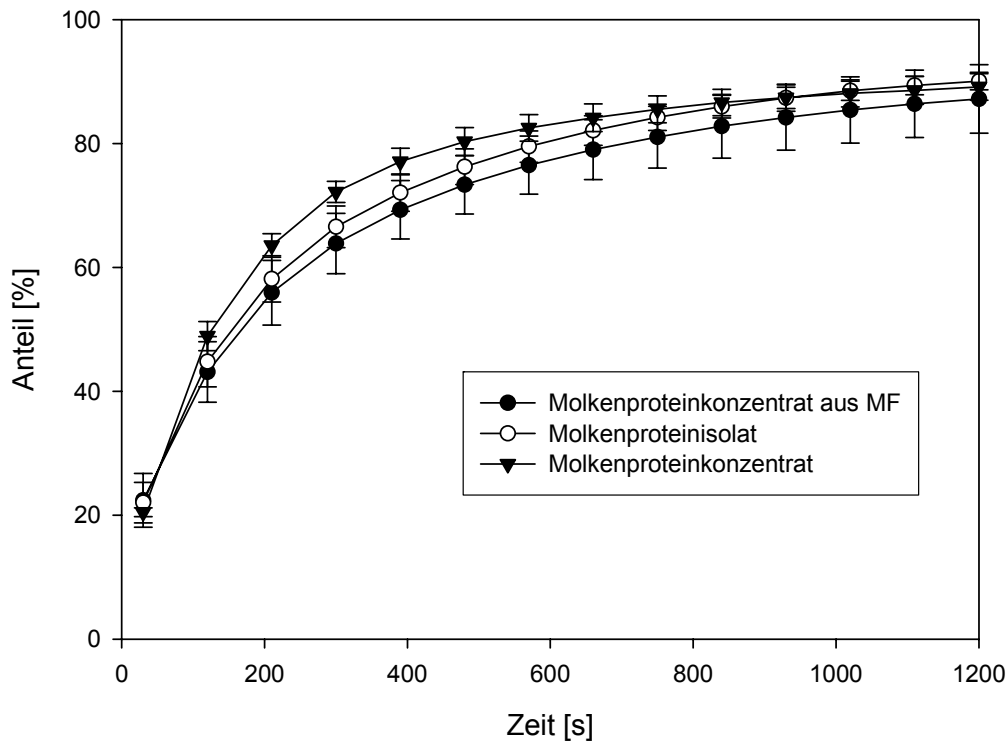


Abb. 58: Mittlerer Drainageverlauf der Schäume aus Molkenproteinkonzentrat (Mikrofiltration) Molkenproteinisolat und konventionellem Molkenproteinkonzentrat in wässriger Lösung

Die Drainage der Schäume aus Molkenproteinkonzentrat (Mikrofiltration) verläuft etwas langsamer (vgl. Abb. 58) als die Drainage der Schäume aus Molkenproteinisolat und konventionellem Molkenproteinkonzentrat. Der Endwert der Drainage der Schäume aus dem Molkenproteinkonzentrat aus der Mikrofiltration ist niedriger als der der Schäume aus anderen rekonstituierten Molkenproteinen. Die Schäume aus dem Molkenproteinkonzentrat aus der Mikrofiltration von Magermilch (mittlere Trenngrenze $0,1 \mu\text{m}$) sind nach dem Stabilitätskriterium (Drainage $<85\%$) stabil, während die Schäume aus den konventionellen Produkten nach dem Stabilitätskriterium nicht stabil sind.

Veränderungen der Schaumbildungseigenschaften könnten auf die unterschiedliche Herstellung und die damit verbundenen technologischen Verfahrensschritte zurückgeführt werden. Während das Molkenproteinisolat im Ionenaustauschverfahren hergestellt wird, mit dem selektiv nur die Molkenproteine isoliert werden, wurden die Molkenproteinkonzentrate durch Konzentration von Molke bzw. Milchserum mittels Ultrafiltration hergestellt. Das konventionelle Molkenproteinkonzentrat hat eine Proteinkonzentration von 35% und einen Lactosegehalt von 46% , der Fettgehalt liegt $<4\%$. Durch die Einstellung des Proteingehalts der Lösung zum Aufschäumen auf $3,4\%$ war der Einsatz von mehr Trockenmasse notwendig, als bei dem Molkenproteinkonzentrat aus der Mikrofiltration von Magermilch (96% Protein, davon

93% Molkenprotein) und dem Molkenproteinisolat (93% Protein, <1% Lactose, <1% Fett). Die höheren Fett- und Lactosegehalte des konventionellen Molkenproteinkonzentrates scheinen sich im Vergleich mit dem Molkenproteinisolat nicht auf die Stabilität auszuwirken, die Aufschlagfähigkeit ist jedoch verringert.

Im Gegensatz zu den beiden industriell hergestellten Produkten besitzt das in eigenen Versuchen hergestellte Molkenproteinkonzentrat aus Magermilch eine höhere Stabilität. Diese könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Molkenproteinkonzentrat aus der MF keine thermische Behandlung durch Hitze erfahren hat, da es gefriergetrocknet wurde. Die konventionellen Pulver sind beide sprühgetrocknet. Generell gilt, dass aus hitzebehandeltem Molkenprotein stabilere Schäume mit einem höheren Overrun hergestellt werden können als aus unbehandeltem Molkenprotein (Kato et al., 1983; Shon und Haque, 2007). Bals und Kulozik (2003) stellten bei Experimenten eine Abnahme von Overrun und Schaumstabilität bei hohen Denaturationsgraden durch Hitzedenaturierung fest (Bals und Kulozik, 2003). Eine derart hohe Denaturierung wie in den Experimenten von Bals und Kulozik liegt bei den hier verwendeten Molkenproteinpulvern nicht vor, eine negative Beeinflussung der Schaumbildungseigenschaften der Proteine kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Faktionen aus Molkenproteinisolat (β -LG einerseits und α -LA, BSA und IG andererseits)

Die Untersuchung der Schaumbildungseigenschaften der Molkenproteine erfolgte anhand der aus Molkenproteinisolat gewonnenen Fraktionen, der β -Lactoglobulin-Fraktion einerseits und der Fraktion aus α -LA, BSA und IG andererseits. Zusätzlich wurde der in der SDS-PAGE verwandte, hochreine BSA-Standard verschäumt.

Tab. 40: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten Fraktionen aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit Molkenproteinisolat und Rinderserumalbumin (BSA)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Molkenproteinisolat (3,4%)	0,11	853	49,5	0,13	0,14	90,1
α -LA, BSA und IG-Fraktion (3,4%)	0,12	748	48,9	0,29	0,28	90,8
β -LG-Fraktion (3,4%)	0,13	703	47,9	0,28	n.m.	88,3
BSA (3,4%)	0,13	723	53,2	0,27	0,32	92,5

Die Schäume aus angereicherten Fraktionen von Molkenproteinisolat unterscheiden sich in ihren Messwerten kaum voneinander. Schaumdichte und Overrun sind nicht signifikant un-

terschiedlich (vgl. Tab. 40). Die Oberflächenspannung (48,9 vs. 47,9 mN/m) und der Drainageendwert der Fraktionen unterscheiden sich kaum voneinander. Der mittlere Blasendurchmesser von α -Lactalbumin verringert sich während der Standzeit um 0,1 mm, der Schaum von β -Lactoglobulin war zu diesem Zeitpunkt soweit zusammengefallen, dass keine digitale Aufnahme des Schaums mehr möglich war.

Die Verschäumung von Rinderserumalbumin erbrachte eine Schaumdichte wie bei β -Lactoglobulin, der Overrun war nicht signifikant höher als der Overrun von β -Lactoglobulin (vgl. Tab. 40). Die Oberflächenspannung von Rinderserumalbumin in wässriger Lösung ist höher als die von Molkenproteinisolat und der Molkenproteinfraktionen. Der Drainageendwert des Schaums aus BSA liegt über dem der Schäume der Fraktionen und dem des Molkenproteinisolats. Die mittlere Blasengröße des Schaums aus Rinderserumalbumin nach 60 Sekunden ist statistisch genauso groß wie die mittlere Blasengröße der Molkenproteinfraktionen. Nach 20 Minuten hatte sich die mittlere Blasengröße der Blasen deutlich erhöht.

Der Vergleich der Messwerte der Fraktionen mit denen des Ausgangsmaterials zeigt, dass der Overrun des Molkenproteinisolats höher als der der Fraktionen ist. Die Oberflächenspannung liegt über der der Fraktionen und der Drainageendwert entspricht dem von α -Lactalbumin. In der mittleren Blasengröße unterscheidet sich das Molkenproteinisolat von den Fraktionen. Der mittlere Blasendurchmesser der Fraktionen ist um das 2,5fache größer als der des Ausgangsmaterials. Die Schäume der Fraktionen sind großporiger als der Schaum des Molkenproteinisolats.

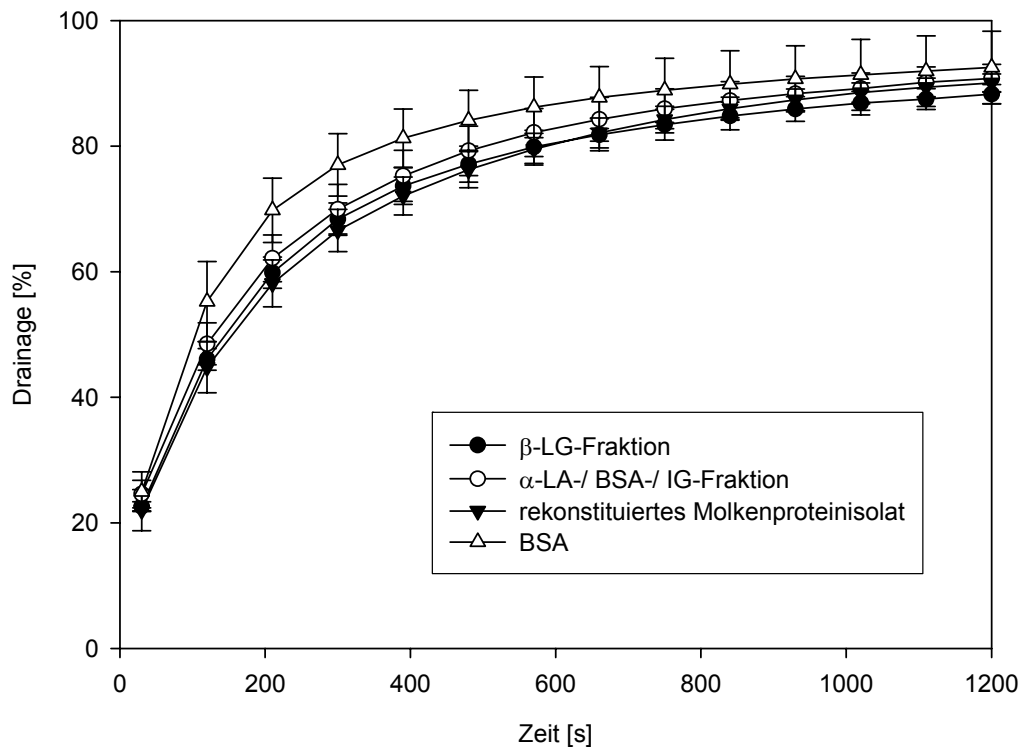


Abb. 59: Vergleich des Drainageverlaufs der α -LA/ BSA-/ IG-Fraktion und β -LG-Fraktion mit der Drainage des Ausgangsmaterials Molkenproteinisolat und BSA

Der Drainageverlauf der Schäume der angereicherten Fraktionen unterscheidet sich kaum von dem des Molkenproteinisolats und von dem Drainageverlauf des BSA (vgl. Abb. 59).

Durch die Fraktionierung von Molkenproteinisolat in eine β -LG-angereicherte Fraktion einerseits und α -Lactalbumin, BSA und IG andererseits wurde eine sehr reine β -Lactoglobulin-Fraktion gewonnen.

Foegeding et al. (2006) berichten, dass Schaum aus β -Lactoglobulin einen höheren Overrun besitzt als Schaum aus α -Lactalbumin. Die geringen Unterschiede in den Schaumbildungseigenschaften der hier vorgestellten Fraktionen sind in der Zusammensetzung der Fraktionen begründet. Der α -Lactalbumin-Anteil der α -Lactalbumin, BSA und IG -Fraktion des Verfahrens ist zwar leicht angereichert, das Hauptprotein dieser Fraktion ist jedoch das mengenmäßig stärkste Molkenprotein der Milch, β -Lactoglobulin (vgl. Tab. 41). In beiden Fraktionen und im Ausgangsprodukt ist β -Lactoglobulin das Protein, dass durch seinen hohen Anteil die Schaumbildungseigenschaften am stärksten beeinflusst.

Tab. 41: Proteinverteilung der angereicherten Molkenproteinfraktionen und des Molkenproteinisolats (SDS-PAGE).

	Ausgangsmaterial	α -LA-Fraktion (Bodensatz)	β -LG-Fraktion (Überstand)
β -Lactoglobulin [%]	62,1	54,1	98,3
α -Lactalbumin [%]	25,5	24,1	1,6
BSA [%]	12,3	21,5	0,0

Der höhere Blasendurchmesser der Proteinfraktionen könnte durch die thermische Belastung während des Fraktionierungsverfahrens und der Lyophilisation (β -LG-Fraktion) begründet sein.

4.3.4. NPN-Substanzen

Die Arbeiten von Haque et al. (1993) lassen vermuten, dass Peptide und Aminosäuren, die zur NPN-Fraktion gerechnet werden, Grenzflächenaktivität aufweisen. Um den Einfluss der NPN-Fraktion auf das Schaumverhalten von Milch zu bestimmen, wurde die Anreicherung von NPN-Substanzen durchgeführt und die entstandenen NPN-angereicherten Produkte verschäumt. Die Fraktionen wurden nicht getrocknet, da ein Proteingehalt aufgrund des Fehlens von Protein nicht eingestellt werden konnte. Die Produkte der Fraktionierung wurden direkt verschäumt.

Die Schaumbildungseigenschaften der NPN-Fraktion, die aus dem Permeat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol gewonnen wurde, wurden untersucht. Sowohl das Permeat nach Ultrafiltration von Magermilch mit einem NMWCO von 10.000 g/mol, als auch das daraus hergestellte Konzentrat wurden dem Test zur Beurteilung der Schaumbildungseigenschaften unterzogen.

Tab. 42: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten NPN-Fractionen im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
NPN Permeat UF 10.000 g/mol	0,14	646	47,4	0,23	n.m.	96,9
NPN Konzentrat UF 10.000 g/mol	0,15	586	36,9	0,22	n.m.	91,6
NPN UF 5.000 g/mol, Lac- tosereduziert	n.m.	n.m.	34,7	n.m.	n.m.	n.m.

Der Vergleich der Schaumdichte der Proben (vgl. Tab. 42) zeigt, dass diese bei Schäumen aus Permeat höher ist als bei denen aus dem lactosereduzierten NPN-Konzentrat. Der Overrun der Schäume aus dem Konzentrat ist höher als der der Schäume aus Permeat. Schäume aus Permeat und dem daraus gewonnenen Konzentrat zeigen eine geringere Schaumdichte als Schäume aus Magermilch, wohingegen der Overrun höher ist, die Schäume sind also grobporiger.

Die Untersuchungen zur Größenausschlusschromatographie hatten gezeigt, dass die Permeate aus der Ultrafiltration mit NMWCO 10.000 g/mol noch in etwa 4% Molkenproteine - insbesondere α -Lactalbumin – enthalten (vgl. Abb. 22). Diese sind vermutlich für die Bildung der Schäume des Permeats der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol verantwortlich.

Als Resultat der Konzentration ist die Oberflächenspannung im lactosereduzierten NPN-Konzentrat deutlich geringer als die der rekonstituierten Magermilch und des frischen UF-Permeats aus Magermilch (vgl. Tab. 42). Die geringere Oberflächenspannung deutet zwar auf eine erhöhte Grenzflächenaktivität der Inhaltsstoffe hin, dieses resultiert unter den gegebenen Versuchsbedingungen jedoch nicht in erhöhter Stabilität der Schäume, sie zeigen kaum Stabilität.

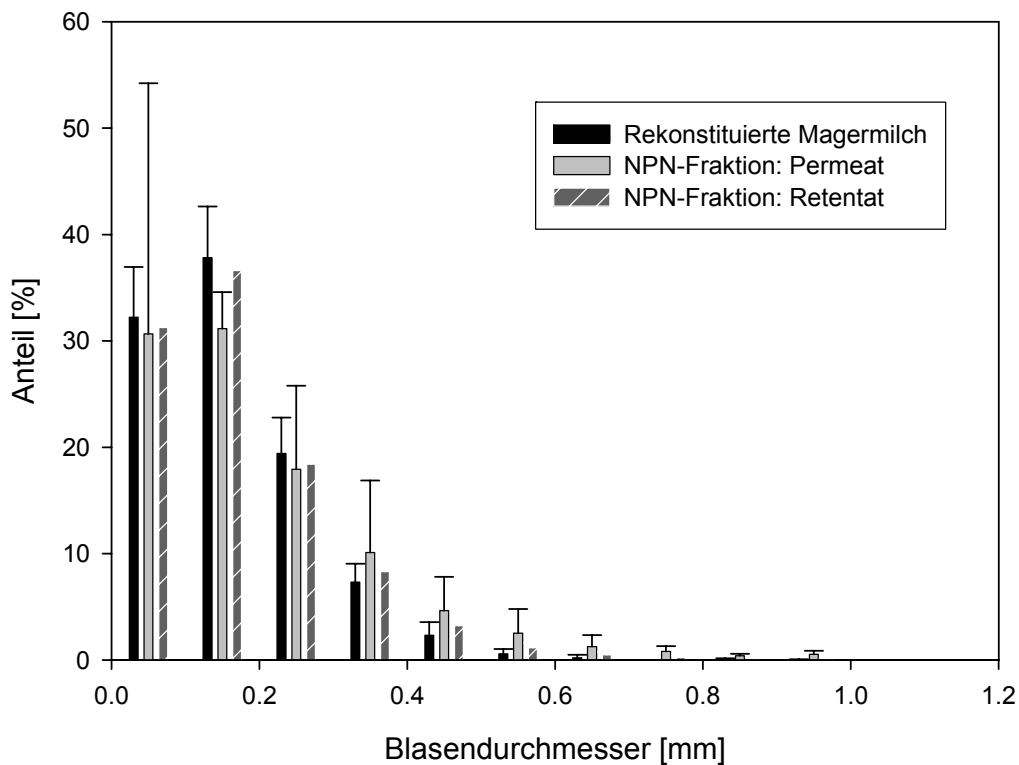


Abb. 60: Blasengrößenverteilung von Schäumen aus NPN-angereichertem UF-Permeat (NMWCO: 10.000 g/mol) und daraus gewonnenem lactosereduzierten NPN-Konzentrat im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch (60 s Standzeit)

Die Blasengrößenverteilung der Schäume aus der aufkonzentrierten NPN-Fraktion nach 60 Minuten Standzeit entspricht weitgehend der Blasengrößenverteilung von Magermilch (vgl. Abb. 60). Schäume aus Permeat bestehen tendenziell aus weniger kleinen (0,01-0,3 mm) und mehr großen Blasen. Prinzipiell lassen sich die Blasengrößenverteilungen in Abbildung 22 jedoch nicht voneinander differenzieren. Overrun und Schaumdichte der beiden Fraktionen unterscheiden sich geringfügig, der Schaum aus dem Konzentrat hat eine etwas höhere Dichte. Der Schaum beider Fraktionen war bereits nach wenigen Minuten zerfallen, nach 20 Minuten konnte keine digitale Aufnahme mehr gemacht werden, da die Schäume aufgrund fehlender Stabilität vollständig drainiert waren.

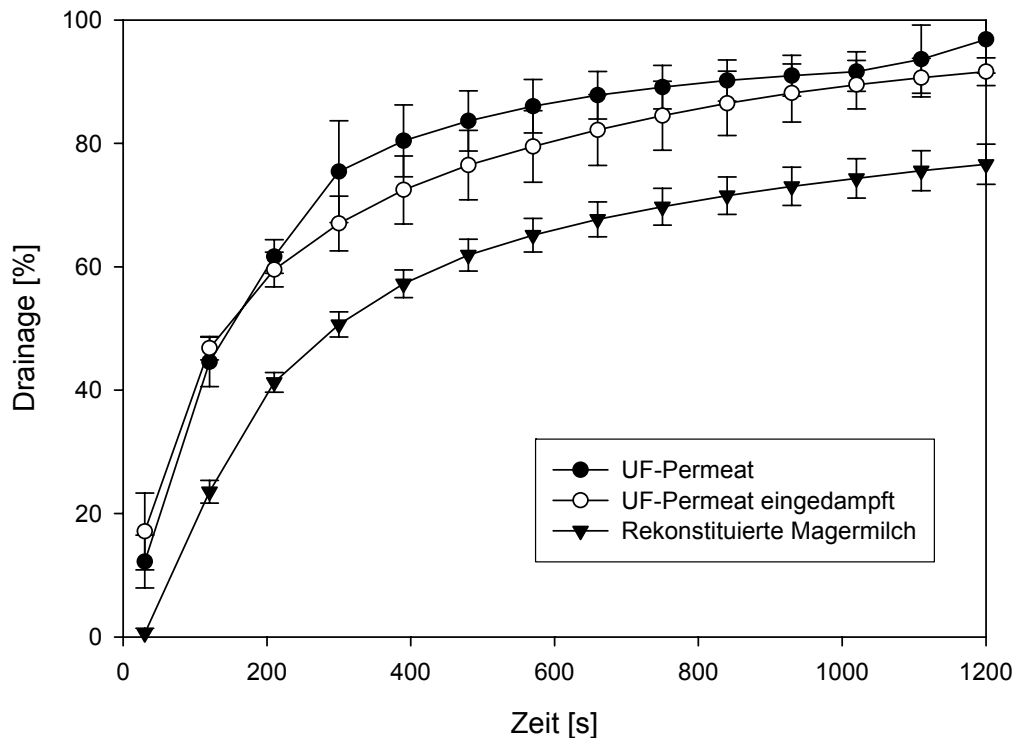


Abb. 61: Drainageverlauf der Schäume aus NPN-angereichertem UF-Permeat (NMWCO: 10.000 g/mol) und daraus gewonnenem lactosereduzierten Konzentrat im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch

Der Verlauf der Drainage der Schäume aus NPN-angereichertem UF-Permeat (NMWCO: 10.000 g/mol) und lactosereduzierten NPN-Konzentrat liegen deutlich über dem der Schäume aus rekonstituierter Magermilch (vgl. Abb. 61). Während die Drainage der Schäume aus Magermilchpulver-Lösungen nach 20 Minuten etwa 75% erreicht, beträgt diese bei den Schäumen aus NPN-angereicherten Proben über 90%, damit ist der gesamte Schaum abgebaut. Die Stabilität der Schäume aus den Permeatproben ist, gemessen an der Drainage, somit geringer als bei den Schäumen aus rekonstituierter Magermilch.

Ultrafiltration von Milch (mittlere, nominale Trenngrenze: 5.000 g/mol)

Die Prüfung der Schaumbildungseigenschaften des NPN-angereicherten und lactosereduzierten Permeats aus der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol hat ergeben, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinerlei Schaum gebildet wurde (vgl. Tab. 42). Die Oberflächenspannung des Permeats der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol ist noch geringer als die Oberflächenspannung des Permeats der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol, es sind demnach oberflächenaktive Moleküle vorhanden.

Obwohl NPN-angereicherte Proben eine deutlich geringere Oberflächenspannung aufweisen als rekonstituierte Magermilch kann somit vermutet werden, dass die NPN-Fraktion der Milch keinen Einfluss auf das Schaumbildungsvermögen der Milch hat. Die Kettenlänge der in der Fraktion verbliebenen Peptide und Aminosäuren ist offensichtlich zu kurz, um die Aufschäum- und Stabilisierungseigenschaften positiv zu beeinflussen.

Haque (1993) beschreibt, dass Peptide in der Milch sehr oberflächenaktiv sind und größere Moleküle von der Oberfläche verdrängen können. Sie verringern die Oberflächenspannung mehr als die Proteine und werden in der Milch der NPN-Fraktion zugerechnet. Diese Darstellung stimmt bezüglich der Oberflächenspannung mit den Beobachtungen in den vorliegenden Versuchen überein, jedoch war bei Vorhandensein von Protein die Oberflächenspannung weniger herabgesenkt (Permeat der UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol).

Durch das in der vorliegenden Arbeit angewandte Ultrafiltrationsverfahren sind neben den NPN-Substanzen alle Proteine mit Molmassen <5.000 g/mol angereichert. Das Vorhandensein von Molekülen mit Molmassen von 2000-5000 g/mol soll der Schaumbildung zuträglich sein (Caessens, 1999a), dieser Zusammenhang kann anhand der Schaumbildungsergebnisse der NPN-Fractionen nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit anderen überein, Haque (1993) beschreibt eine negative Auswirkung kurzkettiger Peptide auf die Schaumbildung in fetthaltigen Produkten. Damodaran und Paraf (1997) beschreiben eine Destabilisierung von Schäumen durch niedermolekulare Peptide und Aminosäuren, die Schaumbildungseigenschaften von Bier verbessern sich ebenfalls nicht durch die Zugabe von Aminosäuren und niedermolekularen Peptiden (Dale und Young, 1992).

Einfluss von Harnstoff auf die Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter Magermilch

Um den Einfluss von Harnstoff, dem quantitativ wichtigsten Bestandteil der NPN-Fraktion, auf die Schaumbildungseigenschaften zu prüfen, wurde reiner Harnstoff in zunehmender Konzentration rekonstituierter Magermilch zugesetzt.

Die Aufschlagfähigkeit (Overrun) von rekonstituierter Magermilch ändert sich durch die Zugabe von Harnstoff. Der Overrun verringert sich durch die Zugabe einer geringen Menge Harnstoff (0,03%) um 35%. Bei zunehmender Harnstoffkonzentration wird der Overrun geringfügig höher (vgl. Tab. 43).

Tab. 43: Schaumbildungseigenschaften von Harnstoff-angereicherter rekonstituierter Magermilch und von rekonstituierter Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
3,37% MMP + 0,03%HS	0,19	451	49,2	0,26	0,34	81,8
3,1% MMP + 0,3%HS	0,17	498	49,1	0,32	0,31	80,0
2,7% MMP + 0,6%HS	0,18	480	49,5	0,31	0,31	81,5

Die Oberflächenspannung wird durch den Austausch von Magermilchpulver durch Harnstoff um ca. 1,0 mN/m erhöht, zwischen den Proben mit Harnstoff ist kein Unterschied in der Oberflächenspannung zu erkennen.

Die durchschnittliche Blasengröße des Schaums nach 60 Sekunden Standzeit ist bei allen harnstoffangereicherten rekonstituierten Magermilchproben erheblich höher als bei nicht harnstoffangereicherter rekonstituierter Magermilch. Die durchschnittliche Blasengröße ist bei den Proben mit 0,3 bzw. 0,6% Harnstoff größer als bei der Probe mit 0,03% Harnstoff. Nach einer Standzeit von 20 Minuten hat sich der Blasendurchmesser der Probe mit 0,03% Harnstoff noch einmal stark vergrößert (von 0,26 mm nach 60 Sekunden auf 0,34 mm nach 1200 Sekunden), bei den höheren Harnstoffkonzentrationen ist keine weitere Zunahme des durchschnittlichen Blasengrößendurchmessers zu erkennen.

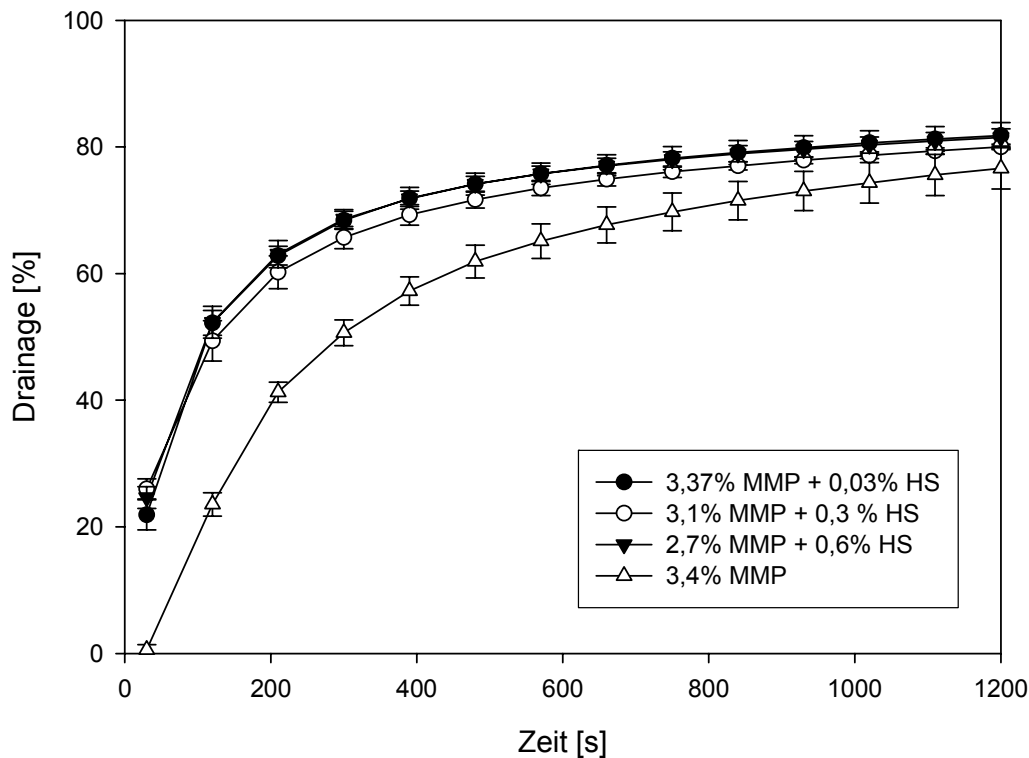


Abb. 62: Drainageverlauf der Harnstoff-angereicherten Magermilchsäume aus rekonstituierter Magermilch im Vergleich mit der Drainage des Schaums aus rekonstituierter Magermilch. MMP= Magermilchpulver; HS = Harnstoff.

Der Drainageverlauf der Schäume aus Harnstoff-angereicherter rekonstituierter Magermilch unterscheidet sich durch den Drainageverlauf der Schäume aus reiner rekonstituierter Magermilch (Abb. 62) deutlich. Bereits beim ersten Messpunkt nach 30 Sekunden ist die Drainage aller Schäume mit Harnstoffzusatz um 20% höher als ohne. Zwischen den Schäumen aus harnstoffangereicherter rekonstituierter Magermilch gibt es keine deutlichen Unterschiede im Drainageverlauf.

Durch die Zugabe von Harnstoff zu rekonstituierter Magermilch wurde die Aufschlagfähigkeit verringert (Overrun) und die Blasengröße erhöht. Auch die Stabilität wurde verringert (Drainage). Durch die Zugabe von Harnstoff wurden die schaumfördernden Eigenschaften von rekonstituierter Magermilch verringert.

4.3.5. Einfluss einer Transglutaminasebehandlung auf die Schaumbildungseigenschaften verschiedener Milchproteinpulver

Die Behandlung von Milchproteinen mit dem Enzym Transglutaminase führt zu einer Quervernetzung von Proteinen und somit zu Molekülen mit Molmassen $>2.000.000$ g/mol. Unter anderem wurden Natriumcaseinat, Molkenproteinkonzentrat und Magermilchpulver mit Transglutaminase vernetzt. Die Schaumbildungseigenschaften dieser Pulver werden mit den Eigenschaften des Ausgangsmaterials verglichen, um sie einschätzen zu können.

Tab. 44: Schaumbildungseigenschaften von Transglutaminase-vernetzten Milchproteinen und den Ausgangsmaterialien

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Natriumcaseinat (3,4%)	0,11	849	46,1	0,14	n.m.	97,1
Molkenproteinkonzentrat (3,4%)	0,14	651	48,1	0,16	0,23	89,2
MMP TG 3,4%	0,14	618	47,5	0,20	n.m.	95,5
Natriumcaseinat TG 3,4%	0,13	729	44,0	0,12	0,22	89,3
Molkenprotein TG 3,4%	0,15	603	44,1	0,20	0,30	87,6

Die Vernetzung von Magermilchpulver mit Transglutaminase hat zu einer Verringerung des Overrun um etwa 18% und damit zu Erhöhung der Dichte um $0,2$ g/cm³ geführt (vgl. Tab. 44). Die Oberflächenspannung hat sich nur geringfügig verringert (um $0,8$ mN/m). Der durchschnittliche Blasendurchmesser der Schäume aus Transglutaminase-behandelten Pulvern nach einer Minute Standzeit ist höher als der der Schäume aus rekonstituiertem Magermilchpulver. Eine digitale Aufnahme des Schaums nach zwanzig Minuten konnte aufgrund des vollständigen Zerfalls nicht gemacht werden.

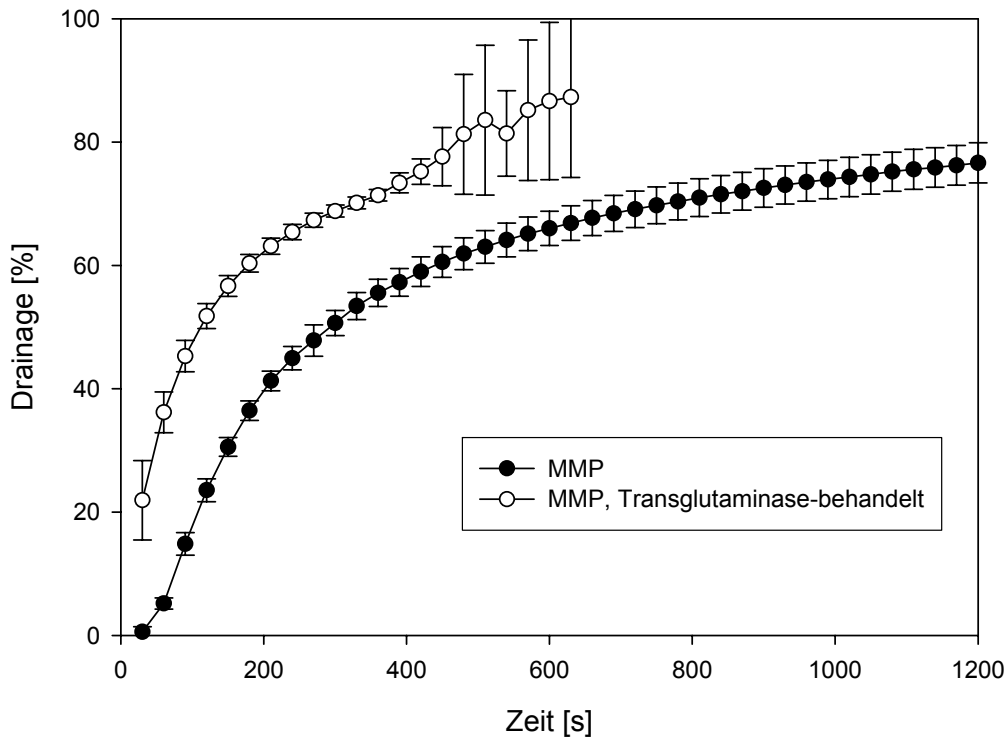


Abb. 63: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituierter Magermilch unbehandelt mit Transglutaminase-behandelter rekonstituierter Magermilch

Der Drainageverlauf zeigt, dass nach der Hälfte der Messzeit (10 Minuten) bereits 85% der Flüssigkeit aus dem Schaum drainiert sind (vgl. Abb. 63).

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass sich sowohl die Stabilität als auch die Aufschlagfähigkeit der Schäume aus rekonstituierter Magermilch durch die Quervernetzung mit Transglutaminase verschlechtert hat.

Die Behandlung von Natriumcaseinat mit dem quervernetzenden Enzym Transglutaminase führt zu einem Proteinpulver mit veränderten technologischen Eigenschaften in Bezug auf die Verschäumung. Der Overrun der Schäume aus behandeltem Protein ist geringer als der des unbehandelten Natriumcaseinats (vgl. Tab. 44). Die Oberflächenspannung des TG-behandelten Natriumcaseinats ist geringfügig geringer als die des unbehandelten Proteins (44,0 vs. 46,1 mN/m). Die durchschnittliche Blasengröße des Schaums aus dem rekonstituierten TG-behandelten Natriumcaseinat hat nach einer Beobachtungszeit von einer Minute einen geringeren durchschnittlichen Blasendurchmesser als der Schaum aus dem unbehandelten Natriumcaseinat. Nach zwanzig Minuten ist die Blasengröße des Schaums aus unbehandeltem Natriumcaseinat nicht mehr bestimmbar, da der Schaum schon in sich zusammengefallen ist. Der Blasendurchmesser des Schaums aus TG-behandeltem Natriumcasei-

nat hat nach 20 Minuten Standzeit deutlich zugenommen, er ist fast doppelt so groß wie zu Beginn.

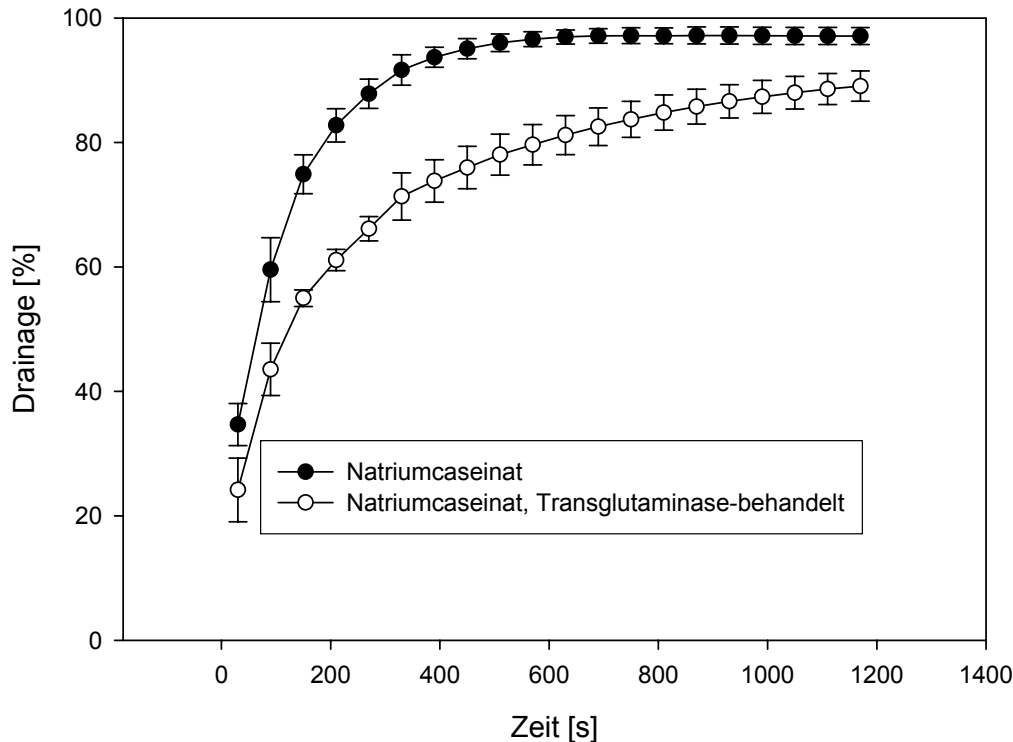


Abb. 64: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituiertem Natriumcaseinat unbehandelt mit Schäumen aus Transglutaminase-behandeltem rekonstituiertem Natriumcaseinat

Der Vergleich des Verlaufs der Drainage zeigt, dass die Behandlung von Natriumcaseinat mit dem quervernetzenden Enzym Transglutaminase, gemessen an der Menge der drainierten Flüssigkeit, zu einer Stabilitätszunahme führt (vgl. Abb. 63). Die Flüssigkeit drainiert aus dem Schaum aus TG-behandeltem Protein langsamer als aus dem unbehandelten. Der Drainageendwert liegt zwar niedriger jedoch auch in einem Bereich, in dem man von einem fast vollständigen Zerfall des Schaums sprechen kann (85%).

Die Behandlung von Natriumcaseinat mit dem quervernetzenden Enzym Transglutaminase hat zu einer Zunahme der Stabilität, aber zu einer Abnahme der Aufschlagfähigkeit geführt.

Die Behandlung von Molkenproteinkonzentrat mit Transglutaminase führte ebenfalls zu Veränderungen in den Eigenschaften. Die Dichte des Schaums aus TG-behandeltem Molkenproteinkonzentrat ist um 0,01 mm höher, der Overrun ist nur geringfügig niedriger. Die Ober-

flächenspannung hat sich durch die Behandlung verringert. Die durchschnittliche Blasengröße des behandelten Pulvers hat sich deutlich verändert. Nach einer Standzeit von 20 Minuten liegt der durchschnittliche Blasendurchmesser 0,04 mm über dem des unbehandelten Proteins, nach 20 Minuten Standzeit hat sich der mittlere Blasendurchmesser um 0,07 mm gegenüber dem des unbehandelten Proteins verändert.

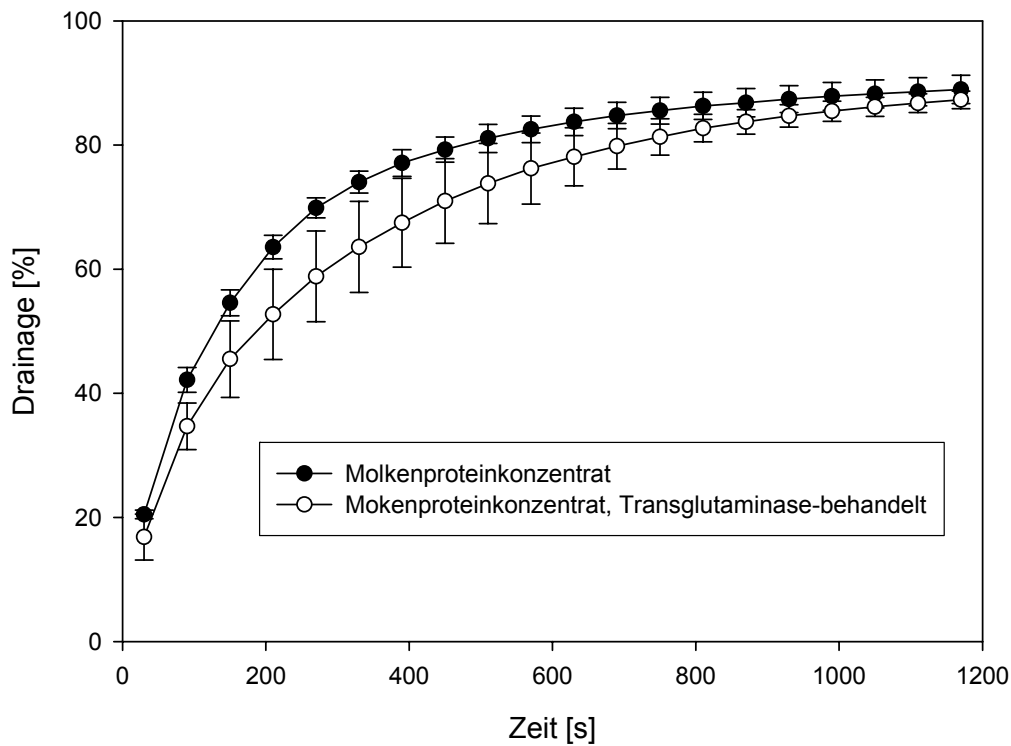


Abb. 65: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituiertem Molkenproteinkonzentrat unbehandelt mit Schäumen aus Transglutaminase-behandeltem rekonstituiertem Molkenproteinkonzentrat

Die Drainage des TG-behandelten Molkenproteinkonzentrates verläuft etwas langsamer als die des unbehandelten Proteins (vgl. Abb. 72). Der Endwert der Drainage ist um 2% geringer als der des unbehandelten Produktes.

Die Quervernetzung von Molkenproteinen in Molkenproteinkonzentrat hat zu einer Vergrößerung des durchschnittlichen Blasendurchmessers der aus diesen Proteinen hergestellten Schäumen geführt und damit zu einem gröberen Schaum. Die Aufschlagfähigkeit und die Drainage der Proteine haben sich durch die Behandlung mit dem quervernetzenden Enzym Transglutaminase nur geringfügig verändert.

Die Quervernetzung von Milchproteinen mittels des Enzyms Transglutaminase wurde an Magermilchpulver, Natriumcaseinat und Molkenproteinkonzentrat durchgeführt. Die technofunktionellen Eigenschaften der Proteine haben sich in Bezug auf die Schaumbildungseigenschaften in unterschiedlicher Weise verändert. Während die Quervernetzung von Natriumcaseinat zu einer Verbesserung der Stabilität geführt hat, sind der Overrun und die Aufschlagfähigkeit von Magermilchpulver im Vergleich zum Ausgangsmaterial schlechter geworden. Die Schaumbildungseigenschaften von Molkenproteinkonzentrat haben sich kaum verändert.

Die Schaumbildungseigenschaften Transglutaminase-behandelter Proteine sind geringer als die der Ausgangsprodukte, nur das vernetzte Natriumcaseinat zeigt eine erhöhte Stabilität. Flanagan et al. (2003) fanden bei vernetztem Natriumcaseinat eine deutliche Abnahme der Schaumbildungseigenschaften durch die Quervernetzung sowohl hinsichtlich der Stabilität als auch hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit. Derartige Ergebnisse wurden von Lorenzen (2000a) ebenfalls erzielt. Miao et al. (2002) stellten wie in den vorliegenden Ergebnissen eine Zunahme der Schaumstabilität durch die Behandlung von Casein mit Transglutaminase fest. Die Autoren stellten jedoch auch einen erhöhten Overrun fest, dieses Ergebnis kann nicht bestätigt werden.

Yildirim et al. (1996) führten eine Transglutaminasebehandlung an einer Mischung aus Molkenproteinisolat und Sojaprotein durch und untersuchten die Schaumbildungseigenschaften. Durch die TG-Behandlung konnte gegenüber der unbehandelten Proteinmischung keine Verbesserung der Aufschlagfähigkeit jedoch eine deutliche Stabilitätserhöhung erreicht werden. Die Autoren erklären die Stabilitätzunahme als Folge der höheren Molmassen und der Eliminierung von Aminosäureresten durch die Quervernetzung mit Transglutaminase.

4.3.6. Hydrolysate aus Molkenproteinisolat

Die Schaumbildungseigenschaften der durch enzymatische Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin hergestellten Produkte wurden untersucht. Dabei wurden Lösungen sprühgetrockneter Permeate aus der Ultrafiltration sowie lyophilisierter Permeate und Retentate eingesetzt. Die weitere Fraktionierung des Permeats aus der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol über eine Membran mit einem NMWCO von 5.000 g/mol führte zu zwei weiteren Hydrolysatfraktionen, diese wurden ebenfalls lyophilisiert und nach Rekonstitution auf ihre Schaumbildungseigenschaften hin untersucht.

Hydrolysate aus Molkenproteinisolat mit Trypsin

Die Aufschlagfähigkeit der Molkenproteinhydrolysate nahm bei allen Fraktionen gegenüber dem Ausgangsmaterial ab (vgl. Tab. 45). Die höchste Aufschlagfähigkeit der Fraktionen der Hydrolysate besitzt das Retentat nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol. Diese Fraktion enthält die Peptide mit Molmassen >10.000 g/mol.

Die Oberflächenspannung der sprühgetrockneten Permeatfraktion nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol ist gegenüber dem Ausgangsmaterial deutlich verringert, die Oberflächenspannung der gefriergetrockneten Permeatfraktion hat sich gegenüber dem Ausgangsmaterial kaum verändert. Die Oberflächenspannung des Retentats der 10.000er-UF hat sich um 5,3 mN/m verringert. Die Fraktionen aus der Ultrafiltration der Membran mit einem NMWCO von 5.000 g/mol hat sich nur wenig verringert.

Tab. 45: Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysate (Hydr) aus der tryptischen Hydrolyse (Tr) und den anschließenden Ultrafiltrationen von Molkenproteinisolat (MPI) (NMWCO = 10.000 und 5.000 g/mol, Perm = Permeat, Ret = Retentat, gefr = lyophilisiert, sprüh = sprühgetrocknet)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Molkenproteinisolat (3,4%)	0,11	853	49,5	0,13	0,14	90,1
MPI Tr Hydr Perm 10.000 sprüh	0,12	755	40,8	0,17	n.m.	89,9
MPI Tr Hydr Perm 10.000 gefr	0,15	603	48,5	0,16	n.m.	90,1
MPI Tr Hydr Ret 10.000 gefr	0,12	782	44,2	0,18	n.m.	100
MPI Tr Hydr Perm 5.000 gefr	0,16	557	47,8	0,13	n.m.	85,9
MPI Tr Hydr Ret 5.000 gefr	0,18	486	49,3	0,18	0,22	85,6

Die durchschnittliche Blasengröße der Schäume aus Hydrolysaten hat sich nach einer Standzeit von 60 Sekunden bei allen Fraktionen mit Ausnahme des Permeats der 5.000er Membran vergrößert, der Schaum ist gröber als der des Ausgangsmaterials Molkenproteinisolat. Die durchschnittliche Blasengröße nach 20 Minuten konnte nur bei dem Schaum des Retentats der UF mit einem NMWCO von 5.000 g/mol gemessen werden, der mittlere Blasendurchmesser ist gegenüber dem Ausgangsmaterial 0,08 mm größer und dadurch gröber in der Struktur. Bei den anderen Fraktionen war die Messung des mittleren Blasendurchmessers nicht möglich, da der Schaum bereits zerfallen war.

Die Drainage der Schäume aus Hydrolysatfraktionen nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol hat gegenüber der Drainage des Schaums des Ausgangsprodukts um etwa 4% abgenommen, der Anteil der drainierten Flüssigkeit liegt aber wie auch in allen anderen Fraktionen über 85%, der Schaum ist also nach dem hier angewandten Kriterium nicht stabil.

Die tryptische Hydrolyse hat in allen Hydrolysatfraktionen weder eine Verbesserung der Aufschlagfähigkeit noch eine Verbesserung der Stabilität erbracht. Die Fraktionierung hat zu

keiner Differenzierung der Eigenschaften der Fraktionen des tryptischen Hydrolysats von Molkenprotein geführt.

Althouse et al. (1995) hydrolysierten ebenfalls Molkenproteinisolat mit Trypsin, anschließend wurde das Hydrolysat erhitzt (85°C, 15 min), ultrafiltriert (NMWCO = 10.000 g/mol), durch Umkehrosiose konzentriert und lyophilisiert. Die Schaumbildungseigenschaften wurden nach Aufschlag mit einem Mixer charakterisiert (vgl. Tab. 46).

Tab. 46: Vergleich der Schaumbildungseigenschaften zur tryptischen Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Althouse et al. (1995)

	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]
Molkenproteinisolat (3,4%)	853	49,5
<i>Molkenproteinisolat Althouse (5%)</i>	<i>756</i>	<i>69,1</i>
MPI Tr Hydr Perm 10.000 gefr	603	48,5
<i>MPI Tr Hydr Perm 10.000 Althouse (5%)</i>	<i>966</i>	<i>60,0</i>
MPI Tr Hydr Ret 10.000 gefr	782	44,2
<i>MPI Tr Hydr Ret 10.000 Althouse (5%)</i>	<i>1169</i>	<i>57,9</i>

Der Vergleich von den hier vorgestellten mit den von Althouse et al. (1995) erzielten Ergebnissen zeigt für Schäume aus Molkenproteinisolat einen geringeren Overrun. Sowohl in der Permeatfraktion als auch in der Retentatfraktion stellen die Autoren eine Zunahme der Aufschlagfähigkeit über einen angestiegenen Overrun fest. In den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen kam es in beiden Fällen zu einer Abnahme des Overrun. Die Veränderung der Aufschlagfähigkeit in verschiedene Richtungen (Zunahme/Abnahme) kann nicht auf die unterschiedlichen Aufschäummethoden (Mixer vs. Aerationmethode) zurückgeführt werden. Die Tendenz der Veränderung müsste trotz unterschiedlicher Methoden übereinstimmen, die Unterschiede sind eher im Verfahrensablauf zu suchen.

Die Versuchsführung bei Althouse et al. (1995) unterscheidet sich darin, dass das Hydrolysat zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt wurde. Die Aufkonzentration durch Umkehrosiose könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Aufschlagfähigkeit durch Erhöhung des Mineralstoffgehalts gehabt haben. Die Proteinkonzentration der Lösungen, die zur Schaumbildung eingesetzt wurden, ist höher als die in den hier vorgestellten Versuchen (5,0% bzw. 3,4%). Althouse et al. (1995) geben die Konzentration ohne Hinweis an, ob es sich um Trockenmasse oder Proteinkonzentration handelt. Die Proteinkonzentration hat ebenfalls Auswirkungen auf die Eigenschaften der Lösung (Clarkson et al., 1999).

Die Werte für die Oberflächenspannung unterscheiden sich deutlich, obwohl in beiden Fällen ein Messgerät verwendet wurde, das die Oberflächenspannung am hängenden Tropfen misst. Es kann deshalb nur ein Vergleich der Tendenzen vorgenommen werden. Durch die Hydrolyse kam es in der Studie von Althouse et al. (1995) ebenso zu einem Abfall der Ober-

flächenspannung wie in den hier vorgestellten Versuchen. Die Unterschiede in Bezug auf die Substrate sind bei Althouse et al. deutlich größer als in den hier dargestellten Untersuchungen. Die von Althouse et al. gemessene Oberflächenspannung für die Proteinlösungen erscheint sehr hoch. Foegeding et al. (2006) messen für Wasser ca. 72 mN/m, für Proteinlösungen um 45 mN/m und werden von anderen Autoren darin bestärkt (Prins, 1986). Diese Messwerte stimmen mit den Messwerten in den hier vorgestellten Versuchen überein. In der Tendenz, dass die Oberflächenspannung von Molkenproteinisolat durch die tryptische Hydrolyse abnimmt, bestätigen die Messungen von Althouse et al. (1995) die in diesen Versuchen gefundenen Ergebnisse.

Mutilangi et al. (1996) führten Hydrolysen mit Trypsin an hitze-denaturiertem Molkenproteinisolat durch. Obwohl zur Verschäumung wie in den vorliegenden Versuchen die Aerationmethode verwendet wurde, sind die einzelnen Ergebnisse nicht vergleichbar, da andere Parameter zur Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften herangezogen wurden als in der vorliegenden Arbeit. Aus den Ergebnissen schließen Mutilangi et al. (1996), dass die tryptische Hydrolyse zu besseren Schaumbildungseigenschaften führt als z.B. die Hydrolyse durch Chymotrypsin. Die Stabilität der Schäume aus dem Permeat der Ultrafiltration des Hydrolysats (NMWCO = 10.000 g/mol) ist höher als die Stabilität von Molkenproteinisolat, auch die Aufschlagfähigkeit des Permeats wird als besser eingestuft als die von Molkenproteinisolat. Diese Ergebnisse widersprechen den in den vorliegenden Versuchen entstandenen Ergebnissen. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen ist neben der Anwendung anderer Parameter (Schaumkapazität in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad, Schaumstabilität in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad) auch auf die Hitzebehandlung des Molkenproteinisolat zurückzuführen, die vor der Hydrolyse durchgeführt wurde. Die Schaumbildungseigenschaften zwischen hitzedenaturiertem und nicht-hitzedenaturiertem Molkenproteinisolat werden von Mutilangi et al. (1996) als gleichbleibend dargestellt. Generell wird davon ausgegangen, dass eine Hitzebehandlung die technofunktionellen Eigenschaften fördert (Walstra, 2006). Die besseren Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate von Molkenproteinisolat müssen auch auf die Hitzebehandlung zurückgeführt werden.

Zur Fraktionierung von tryptischen Hydrolysaten mit einer Ultrafiltrationseinheit mit einem NMWCO von 5.000 g/mol sind in der Literatur keine vergleichbaren Ergebnisse vorhanden. Eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften durch Peptide mit einer Molmasse zwischen 2.000 und 5.000 g/mol, die von einigen Autoren propagiert wird (Caessens, 1999; Turgeon et al., 1992; Chobert et al., 1988) kann nur hinsichtlich einer leichten Verbesserung der Stabilität, nicht aber hinsichtlich der Verbesserung der Aufschlagfähigkeit bestätigt werden.

Hydrolysate aus Molkenproteinisolat mit Chymotrypsin

Die chymotryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat hat zu einer Erhöhung der Aufschlagfähigkeit in allen Hydrolysatfraktionen gegenüber dem Ausgangsmaterial geführt. Am stärksten ist die Zunahme der Aufschlagfähigkeit in der Retentatfraktion nach Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol (Molmassen >10.000 g/mol) und in der Permeatfrak-

tion der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol (Molmassen < 5.000 g/mol). Die Aufschlagfähigkeit der beiden Fraktionen liegt über 1000%.

Tab. 47: Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysate aus der chymotryptischen (CT) Hydrolyse von Molkenproteinisolat und anschließender Ultrafiltrationen (NMWCO = 10.000 und 5.000 g/mol, Abkürzungen wie Tab. 45)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Molkenproteinisolat (3,4%)	0,11	853	49,5	0,13	0,14	90,1
MPI CT Hydr Perm 10.000 sprüh	0,11	872	44,8	0,11	n.m.	86,0
MPI CT Hydr Perm 10.000 gefr	0,10	966	46,9	0,24	n.m.	87,7
MPI CT Hydr Ret 10.000 gefr	0,09	1044	46,0	0,09	n.m.	84,0
MPI CT Hydr Perm 5.000 gefr	0,09	1133	46,0	0,1	n.m.	91,0
MPI CT Hydr Ret 5.000 gefr	0,10	924	46,4	0,24	n.m.	88,5

Die Oberflächenspannung der Hydrolysate ist im Vergleich zur Oberflächenspannung des Ausgangsmaterials herabgesetzt. Während die gefriergetrockneten Fraktionen eine um ca. 3 mN/m verringerte Oberflächenspannung besitzen, ist die Oberflächenspannung des sprühgetrockneten Permeats aus der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol um ca. 5 mN/m verringert (vgl. Tab. 47).

Die durchschnittliche Blasengröße der Schäume nach einer Minute ist bei Einsatz der verschiedenen Fraktionen deutlich unterschiedlich, bei dem sprühgetrockneten Permeat und dem Retentat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol sowie dem Permeat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 5.000 g/mol hat sich der mittlere Blasendurchmesser verringert. Beim lyophilisierten Permeat der 10.000er Membran sowie dem Retentat der 5.000er Membran hat sich der mittlere Durchmesser im Vergleich zum Ausgangsmaterial erhöht. Nach der Beobachtungsdauer von 20 Minuten waren alle Schäume bereits zerfallen und es konnte keine digitale Messung der Blasengrößen vorgenommen werden.

Die Menge drainierter Flüssigkeit ist nur bei der Retentatfraktion der Ultrafiltration mit einem NMWCO unter 85%, also nach den hier angewandten Stabilitätskriterien stabil, alle anderen Schäume haben wie das Ausgangsmaterial mehr als 85% drainierte Flüssigkeit.

Ansatzweise vergleichbare Ergebnisse wurden von Althouse et al. (1995) hinsichtlich der chymotryptischen Hydrolyse von Molkenproteinisolat veröffentlicht (Diskussion der Vergleichbarkeit siehe Kap. Tryptische Hydrolyse von MPI). Der Vergleich der Aufschlagfähig-

keit zeigt, dass die Ergebnisse von Althouse et al. (1995) die hier vorgestellten Ergebnisse hinsichtlich der Zunahme der Aufschlagfähigkeit durch die chymotryptische Hydrolyse und die anschließende UF bestätigen (vgl. Tab. 48). Während bei Althouse et al. (1995) die Permeatfraktion, die die Peptide mit geringeren Molmassen enthält, besser schäumt als die Retentatfraktion, wurde in den vorliegenden Ergebnissen eine bessere Aufschlagfähigkeit der Retentatfraktion gemessen. Die UF-Fraktionen von Althouse et al. (1995) unterscheiden sich von den hier vorliegenden Fraktionen durch eine Erhitzung und die an die UF anschließende Aufkonzentrierung mit Umkehrosmose. Die Vergleichbarkeit ist deshalb nur partiell gegeben, die hier vorliegenden Fraktionen sind im Vergleich zu den von Althouse et al. (1995) hergestellten Produkten weniger Verarbeitungsschritten unterzogen worden.

Tab. 48: Vergleich der Schaumbildungseigenschaften zur chymotryptischen Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Althouse et al. (1995)

	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]
Molkenproteinisolat (3,4%)	853	49,5
<i>Molkenproteinisolat Althouse (5%)</i>	<i>756</i>	<i>69,1</i>
MPI CT Hydr Perm 10.000 gefr	966	48,5
<i>MPI CT Hydr Perm 10.000 Althouse (5%)</i>	<i>2049</i>	<i>57,5</i>
MPI CT Hydr Ret 10.000 gefr	1044	44,2
<i>MPI CT Hydr Ret 10.000 Althouse (5%)</i>	<i>1571</i>	<i>59,3</i>

Der Vergleich des Overrun ist aufgrund der Messunterschiede nur in der Tendenz sinnvoll, sowohl die Versuche von Althouse et al. (1995) als auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen verringerte Oberflächenspannungen durch die chymotryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat.

Die Ergebnisse von Mutilangi et al. (1996) an hitze-denaturiertem Molkenproteinisolat stimmen mit den hier vorliegenden weder in der Schaumkapazität noch in der Schaumstabilität überein, die Aufschlagfähigkeit des chymotryptischen Permeats wird als geringer als die des Ausgangsmaterials dargestellt, die Stabilität gleichbleibend. In den vorliegenden Versuchen wurde eine geringe Stabilitätszunahme und eine deutliche Overrun-Zunahme in beiden Fraktionen der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol gemessen. Die Unterschiede müssen auch hier, wie bei den Ergebnissen zur tryptischen Hydrolyse auf die Erhitzung und die unterschiedlichen Auswertungsparameter zurückgeführt werden.

Anhand der Ergebnisse der chymotryptischen Hydrolyse kann hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit bestätigt werden, dass die besten Eigenschaften bei Molmassen <5.000 g/mol erreicht werden, wobei das Retentat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol ebenfalls eine deutlich verbesserte Aufschlagfähigkeit aufweist, die eher auf Proteine oder Peptide mit Molmassen >10.000 g/mol hinweist. Hinsichtlich der Stabilität zeigt das Retentat der 10.000er Membran die besten Schaumbildungseigenschaften.

Vergleich der chymotryptischen und tryptischen Permeate der UF (NMWCO 10.000 g/mol)

Der Drainageverlauf der Schäume aus den rekonstituierten Permeaten aus tryptischer und chymotryptischer Hydrolyse ist am Anfang weitgehend vergleichbar, im weiteren Verlauf ist die Drainage der Schäume aus dem chymotryptischen Proteolysat etwas geringer. Allerdings ist eine Differenzierung nicht möglich (vgl. Abb. 66).

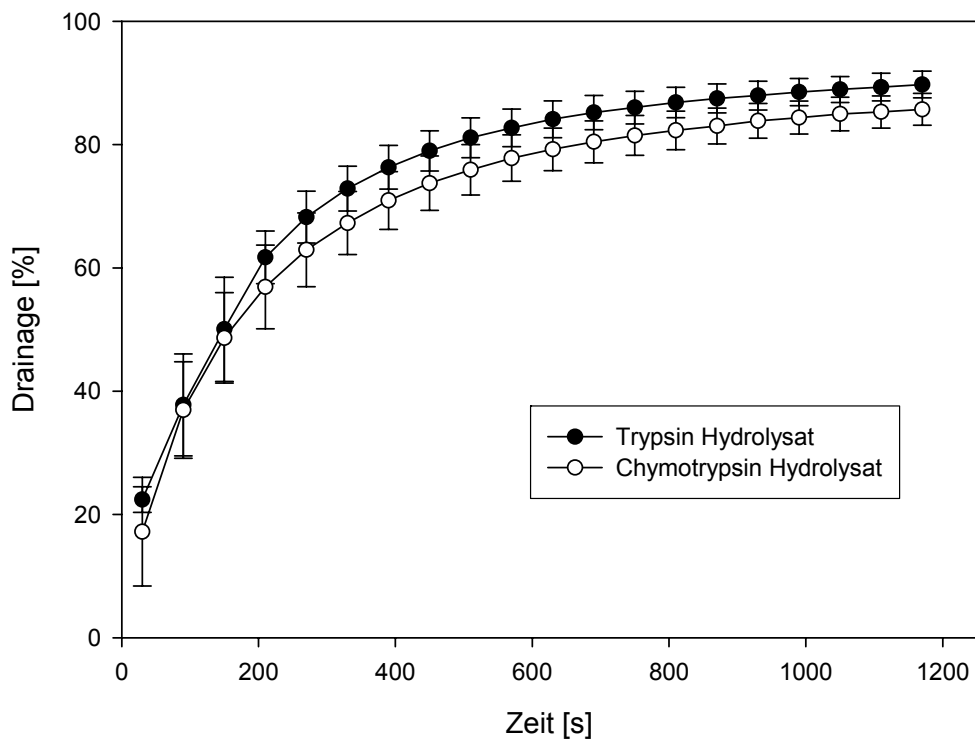


Abb. 66: Ergebnisse der Drainagemessung an Schäumen aus den Permeaten tryptischer und chymotryptischer Hydrolysate

Der Vergleich der Blasengrößenverteilungen in Abbildung 67 zeigt, dass Schäume aus Chymotrypsin-Hydrolysat anteilig aus mehr kleinen Blasen (0,01-0,2 mm) bestehen als Schäume aus Trypsin-Hydrolysat. In Schäumen aus Trypsin-Hydrolysat weisen Blasen zwischen 0,1 und 0,4 mm Durchmesser den größten Anteil auf. Die Berechnung des durchschnittlichen Blasendurchmessers zeigt, dass die durchschnittliche Blasengröße der Schäume aus Trypsin-Hydrolysat (0,17, vgl. Tab. 45) wesentlich größer ist als die aus Chymotrypsin-Hydrolysat (0,11 mm). Overrun und Schaumdichte zeigen keine großen Unterschiede, auch im Vergleich zu Magermilchpulver sind diese Parameter kaum unterschiedlich. Die Oberflächenspannung der Hydrolysate in wässriger Lösung ist niedriger als die von Magermilch (vgl. Tab. 45 und Tab. 47).

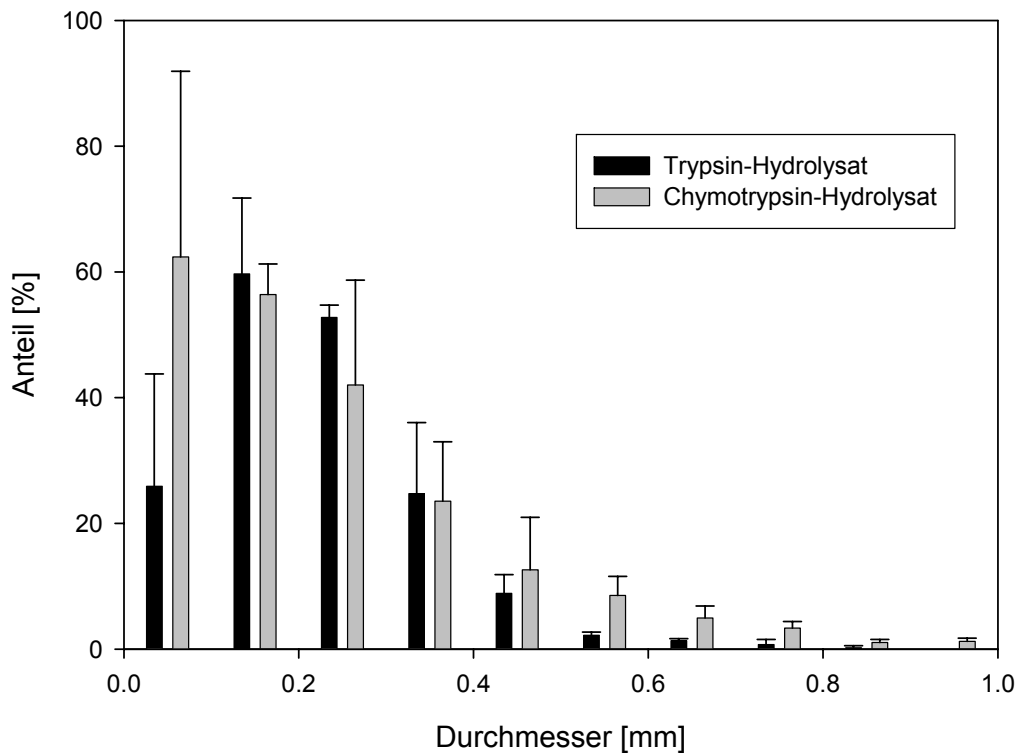


Abb. 67: Blasengrößenverteilung der Schäume aus den Permeaten der Molkenproteinhydrolysate nach Ultrafiltration nach 60 Sekunden

Vergleich der tryptischen und chymotryptischen Retentate der UF (NMWCO 10.000 g/mol)

Die Retentate aus der Ultrafiltration der tryptischen und chymotryptischen Hydrolysate wurden ebenfalls in wässriger Lösung auf ihre Schaumbildungseigenschaften untersucht.

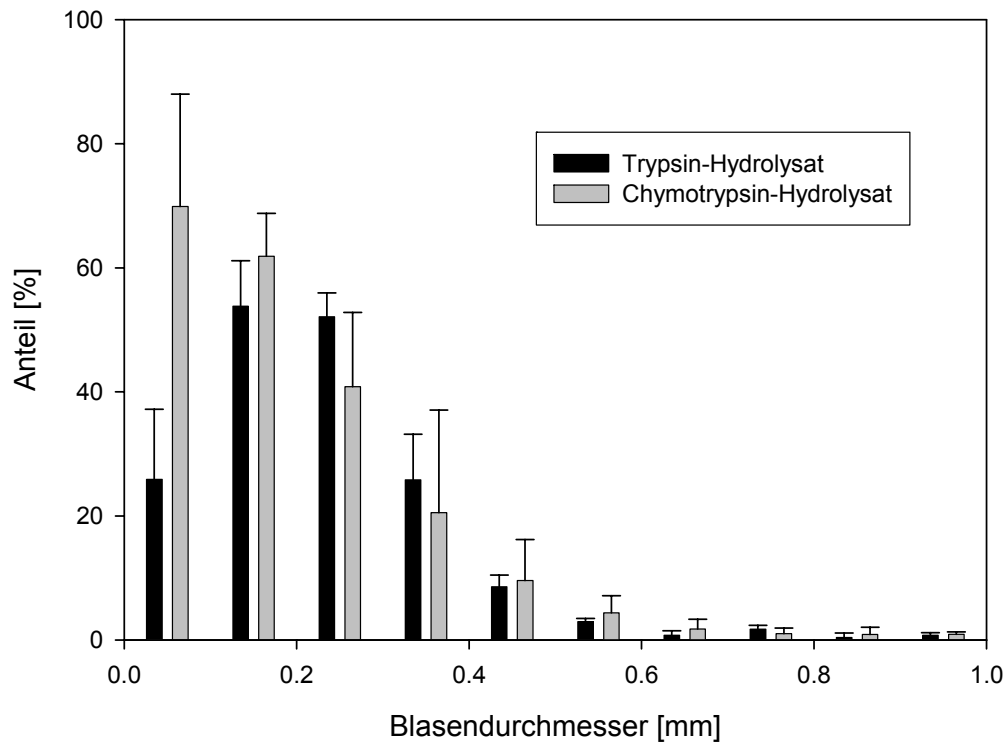


Abb. 68: Blasengrößenverteilung der Schäume aus Retentaten der Molkenproteinhydrolyse nach 60 Sekunden

Der Vergleich der Blasengrößenverteilungen macht deutlich, dass Schäume aus dem Retentat des Chymotrypsin-Hydrolyсата eine deutlich höhere Anzahl an Blasen der untersten Größenkategorie (0,01-0,1 mm) aufweisen als solche aus dem Retentat des Trypsin-Hydrolyсата. Der weitere Kurvenverlauf der Blasengrößenverteilung von Schäumen aus Retentaten ist weitgehend mit dem der Schäume aus Permeaten vergleichbar und lässt sich nicht weiter differenzieren (vgl. Abb. 67 und Abb. 68).

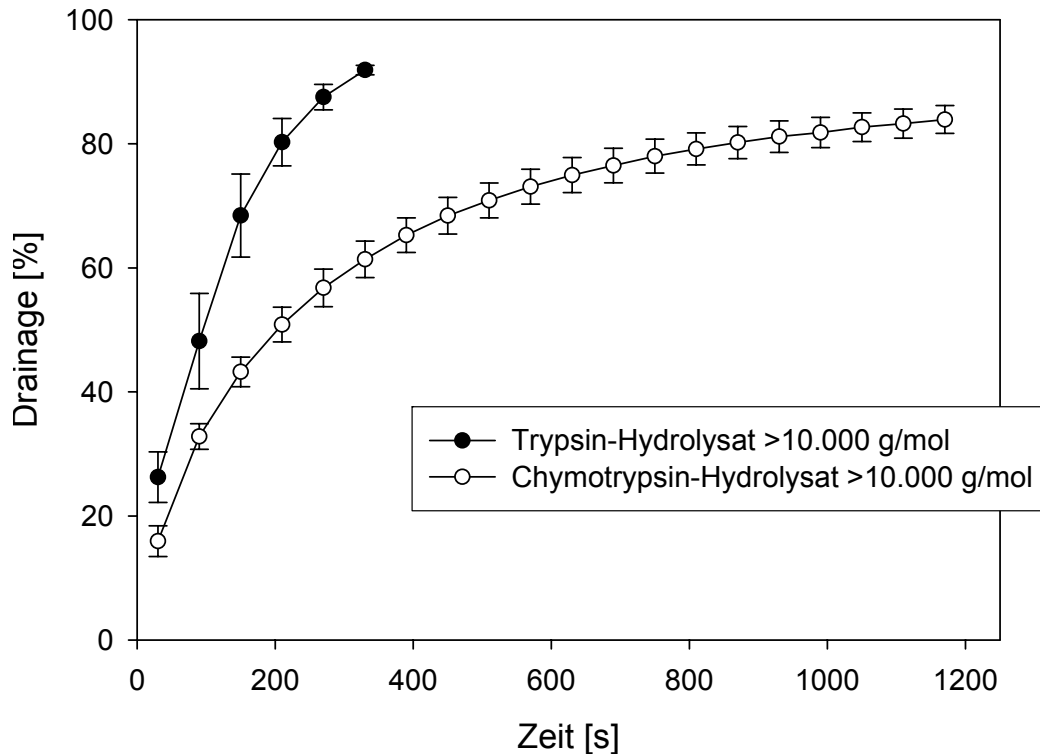


Abb. 69: Drainageverlauf der Schäume aus UF-Retentaten tryptischer und chymotryptischer Proteolysate

Schäume, die mit dem Retentat tryptischer Hydrolysate hergestellt wurden, waren bereits nach wenigen Minuten zerfallen (vgl. Abb. 69), wohingegen Schäume, die mit dem Retentat chymotryptischer Hydrolysate produziert wurden, eine deutlich höhere Stabilität und darüber hinaus einen sehr hohen Overrun von über 1000% aufwiesen. Im Gegensatz zu den weitestgehend übereinstimmenden Schaumbildungseigenschaften der Permeate aus tryptischer und chymotryptischer Hydrolyse, zeigen die entsprechenden Retentate deutlich unterschiedliche Eigenschaften. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Lösungen der Retentate eine höhere Oberflächenspannung aufweisen als die aus Permeaten.

Anreicherung rekonstituierter Magermilch und Vollmilch mit Hydrolysatfraktionen aus Molkenproteinisolat

Um nicht nur die Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysatfraktionen, sondern auch den Einfluss der Hydrolysate auf die Schaumbildung intakter Milchproteine zu prüfen, wurden rekonstituierte Magermilch und Vollmilch mit Hydrolysaten angereichert. Dabei wurden Proteingehalte eingestellt, die in kommerziellen Produkten zur Herstellung von Milchsäumen (vgl. Kap. 4.3.9) zum Einsatz kommen. Der Gesamtproteingehalt der Lösungen betrug 3,8 %, davon 3,4 % Magermilchproteine und 0,4 % Hydrolysatfraktion.

Rekonstituierte Magermilch

Die Zugabe der tryptischen Hydrolysatfraktionen hat zu einer Zunahme der Aufschlagfähigkeit um durchschnittlich 158 Prozentpunkte geführt, durch alle Hydrolysatfraktionen wurde eine Zunahme des Aufschlagvolumens gegenüber rekonstituierter Magermilch ohne Hydrolysatzusatz gemessen (vgl. Tab. 49). Die Anreicherung der Magermilch durch chymotryptische Hydrolysatfraktionen führte, die Aufschlagfähigkeit betreffend, zu heterogenen Ergebnissen. Während die Permeatfraktionen der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol und 5.000 g/mol zu einer Zunahme des Overrun führten, nahm der Overrun nach Anreicherung mit der Retentatfraktion der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol um 64 Prozentpunkte ab. Die Anreicherung mit der Retentatfraktion der 5.000er Membran führte zu gleichbleibender Aufschlagfähigkeit.

Tab. 49: Auswirkung der Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit tryptischen und chymotryptischen Hydrolysatfraktionen auf die Schaumbildungseigenschaften von Magermilchpulver (Abkürzungen vgl. Tab. 45 und Tab. 47)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
MMP + MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,11	874	45,1	0,13	n.m.	93,5
MMP + MPI Tr Hydr Perm 10.000 gefr.	0,11	829	43,7	0,15	n.m.	93,2
MMP + MPI Tr Hyd Ret 10.000 gefr	0,11	834	47,2	0,11	0,21	91,0
MMP + MPI Tr Hydr Perm 5.000 gefr	0,11	854	43,7	0,16	n.m.	92,0
MMP + MPI Tr Hydr Ret 5.000 gefr	0,11	866	44,2	0,17	n.m.	92,0
MMP + MPI CT Hyd Perm 10.000 sprüh	0,13	720	48,1	0,15	0,18	86,3
MMP + MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,12	752	46,7	0,17	0,22	73,9
MMP + MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,14	629	46,4	0,14	0,16	72,0
MMP + MPI CT Hyd Perm 5.000 gefr	0,12	776	47,0	0,16	0,20	86,5
MMP + MPI CT Hyd Ret 5.000 gefr	0,13	696	47,1	0,16	0,22	85,2

Die Oberflächenspannung der mit tryptischen Hydrolysaten angereicherten Magermilchlösungen wurde gegenüber dem Ausgangsmaterial stärker abgesenkt als die Oberflächenspannung der mit chymotryptischen Hydrolysaten angereicherten Magermilchlösungen. Insgesamt führte die Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit tryptischen und chymotryptischen Hydrolysaten nur zu geringen Absenkungen der Oberflächenspannung.

Der durchschnittliche Blasendurchmesser nach 60 Sekunden wurde durch die Zugabe einiger Hydrolysate verringert (tryptische Hydrolysatfraktionen, chymotryptisches Permeat sprühgetrocknet und chymotryptisches Retentat, alle aus UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol), durch die Zugabe einiger Hydrolysate veränderte sich die Blasengröße nicht (tryptisches Permeat, chymotryptische Hydrolysatfraktionen, beide nach UF mit NMWCO von 5.000 g/mol) und in einigen Fällen ist eine geringfügige Zunahme zu beobachten (tryptische Retentatfraktion nach UF mit einem NMWCO von 5.000 g/mol, chymotryptische Permeatfraktion nach UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol).

Die durchschnittliche Blasengröße nach 20 Minuten konnte nur bei Schäumen aus rekonstituierter Magermilch mit Zusatz von tryptischem Retentat (NMWCO 10.000 g/mol) gemessen werden, gegenüber der rekonstituierten Magermilch ohne Zusatz war der durchschnittliche Blasendurchmesser erhöht. Durch die Zugabe der chymotryptischen Hydrolysatfraktionen konnte die Messung der Blasengröße auch nach 20 Minuten vorgenommen werden. Der mittlere Blasendurchmesser war bei dem Retentat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol verringert, beim sprühgetrockneten Permeat unverändert und bei den übrigen Fraktionen gegenüber den Schäumen der rekonstituierten Magermilch leicht erhöht.

Die Stabilität der Schäume, gemessen an der Drainage, wurde durch alle tryptischen Hydrolysate verringert. Durch den Zusatz von chymotryptischen Hydrolysaten, insbesondere rekonstituierte Permeate und Retentate nach einer Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol, konnte die Drainage verringert und die Schaumstabilität damit verbessert werden. Die Drainage der übrigen Schäume mit chymotryptischen Retentatfraktionen war gegenüber dem Ausgangsmaterial erhöht.

Vollmilch

Unterschiede in den Auswirkungen der Hydrolysate auf fetthaltige und fettfreie Milch wurden anhand von Vollmilch mit 3,5% Fett untersucht. Diese wurde ebenso wie die rekonstituierte Magermilch mit 0,4% Hydrolysatprotein angereichert.

Tab. 50: Auswirkung der Anreicherung von Vollmilch (3,5% Fett) mit tryptischen und chymotryptischen Hydrolysatfraktionen auf die Schaumbildungseigenschaften (Abkürzungen siehe Tab. 45 und Tab. 47)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Vollmilch 3,5% Fett	0,13	737	48,1	0,12	0,17	88,2
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,09	1037	51,6	0,17	0,22	82,5
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 10.000 gefr	0,10	979	47,4	0,12	n.m.	90,0
Vollmilch + MPI Tr Hyd Re- tentat 10.000 gefr	0,09	1007	51,8	0,20	0,20	90,4
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 5.000 gefr	0,09	1048	51,7	0,11	n.m.	88,4
Vollmilch + MPI Tr Hyd Ret 5.000 gefr	0,10	924	57,7	0,10	n.m.	95,6
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 10.000 sprüh	0,14	652	52,5	0,17	0,16	85,3
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,12	738	48,3	0,17	0,21	80,6
Vollmilch + MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,15	591	50,9	0,14	0,22	88,1
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 5.000 gefr	0,12	744	49,8	0,14	0,30	83,2
Vollmilch + MPI CT Hyd Ret 5.000 gefr	0,13	674	51,7	0,19	0,24	76,0

Die Zugabe der tryptischen Hydrolysatfraktionen führte zu einer Verbesserung der Aufschlagfähigkeit. Durch alle Fraktionen wurde der Overrun erhöht, durch die tryptische Permeatfraktionen nach UF mit einem NMWCO von 5.000 und 10.000 g/mol sogar um ungefähr ein Drittel. Durch die Zugabe der chymotryptischen Hydrolysatfraktionen kam es zu keinen Veränderungen oder zu einer Abnahme des Aufschlagvermögens.

Die Oberflächenspannung der angereicherten Milchproben wurde mit Ausnahme des lyophilisierten tryptischen Permeats erhöht. Eine deutliche Absenkung wurde in keiner der Lösungen gemessen.

Die durchschnittliche Blasengröße hat sich durch die Zugabe der Hydrolysate nur in zwei Fällen verringert, durch die Zugabe der Fraktionen nach UF (NMWCO 5.000 g/mol) der tryptischen Hydrolysate wurde der mittlere Blasendurchmesser verringert, in allen anderen Fällen blieb die mittlere Blasengröße gleich oder sie stieg an.

Die durchschnittliche Blasengröße nach 20 Minuten konnte nur in zwei der Milchproben mit tryptischem Hydrolysatzusatz gemessen werden, in diesen Milchproben war der mittlere Blasendurchmesser gegenüber dem Ausgangsmaterial deutlich erhöht. Bei den chymotryptischen Hydrolysaten konnte nach Zugabe der Hydrolysate in allen Proben eine Bestimmung der mittleren Blasendurchmessers stattfinden. Durch die Zugabe des sprühgetrockneten Permeats nach UF (NMWCO 10.000 g/mol) wurde der mittlere Blasendurchmesser um 0,01 mm abgesenkt, durch die Zugabe der übrigen chymotryptischen Hydrolysate wurde der mittlere Blasendurchmesser erhöht.

Eine deutliche Absenkung der Drainage und somit eine Verbesserung der Stabilität wurde durch das chymotryptische Permeat der 5.000er Membran erreicht. Durch die Zugabe der Hydrolysatfraktion mit Molmassen zwischen ca. 5.000 bis 14.000 g/mol ergab sich eine Verringerung der Drainage um 12%.

Diskussion

Durch die Zugabe von Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat kann prinzipiell eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften von Vollmilch und rekonstituierter Magermilch sowohl hinsichtlich der Stabilität als auch hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit erzielt werden.

Eine Verbesserung der Aufschlagfähigkeit von Magermilch und Vollmilch konnte durch die Zugabe tryptischer Hydrolysate erfolgen. Die tryptischen Hydrolysatfraktionen enthalten alle Peptide geringer Molmasse, die bei der Charakterisierung mittels FPLC eine Retentionszeit von 55-70 Minuten haben (vgl. Kap. 4.2.1). Diese Retentionszeit liegt über der von α -Lactalbumin, das bei einer Molmasse von etwa 14.000 g/mol eine Retentionszeit von 50 Minuten besitzt. Die Erhöhung des Overrun ist auf Peptide von Molmassen < 14.000 g/mol zurückzuführen, die sowohl in den Retentaten verblieben sind, als auch mit dem Permeatstrom die Membran permeiert haben. Die Aufschlagfähigkeit der tryptischen Hydrolysate ohne den Zusatz von Protein ist gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht erhöht. In Verbindung mit Milchprotein führen die tryptischen Hydrolysate von Molkenproteinisolat jedoch zu einer Erhöhung der Aufschlagfähigkeit. In der Literatur ist keine vergleichbare Arbeit zu finden, in der der Einsatz von tryptischen Hydrolysaten in Milch untersucht wird.

Die Erhöhung der Oberflächenspannung von Vollmilch nach Zugabe der Hydrolysate kann auf den Einfluss der Fettkugeln zurückgeführt werden (vgl. Kap. 4.3.1). Die Oberflächenspannung der Hydrolysate ist prinzipiell gegenüber dem Ausgangsmaterial leicht abgesenkt, auch in Magermilch führt die Zugabe von Hydrolysat prinzipiell zu einer Absenkung der Oberflächenspannung. Durch das Vorhandensein von Fettkügelchen kann es zu Rissen in der mit Peptiden und Proteinen besetzten Filmschicht an der Grenzfläche gekommen sein (Walstra, 2006). Die Erhöhung der Oberflächenspannung hat keinen Einfluss auf die Aufschlagfähigkeit des Milch-Hydrolysatgemischs.

Die Schaumstabilität wird in rekonstituierter Magermilch am effizientesten vom chymotryptischen Permeat nach UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol verbessert, in Vollmilch wird die Stabilität am effizientesten durch die chymotryptische Retentatfraktion nach UF mit einem NMWCO von 5.000 g/mol stabilisiert. Gemeinsam ist diesen beiden Fraktionen, dass sie

Peptide mit Molmassen von ca. 5.000 bis 14.000 g/mol enthalten. Peptide in diesem Molmassenbereich sind im Zusammenspiel mit den Magermilchproteinen offenbar in besonderem Maße zur Stabilisierung von Milchsäumen geeignet. In der Literatur ist keine vergleichbare Arbeit zu finden, in der der Einsatz von chymotryptischen Hydrolysaten in Milch untersucht wird.

4.3.7. Hydrolysate aus β -Casein

Die aus Labcasein gewonnene β -Casein-Fraktion wurde mit den Enzymen Trypsin, Pepsin und Alcalase hydrolysiert. Die Hydrolysezeiten betragen 5, 15, 30 und 60 Minuten, die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzung (vgl. Material und Methoden). Die Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysate wurden direkt im Anschluss an die Hydrolyse charakterisiert.

Tryptische Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion

Die Eigenschaften der tryptischen Hydrolysate von β -Casein konnten hinsichtlich der Parameter Schaumdichte, Overrun, Blasengrößenverteilung und Drainage keiner Messung und Auswertung unterzogen werden, da kein Schaum entstand. Wie bei dem Ausgangsmaterial konnte kein Schaum produziert werden, der ausreichend stabil war, um ihn mit dem Messzylinder abzuheben und zu wiegen und zu photographieren.

Tab. 51: Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion; Tr: Trypsin)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Casein-Fraktion (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Tr, 5 min	n.m.	n.m.	46,0	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Tr, 15 min	n.m.	n.m.	40,8	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Tr, 30 min	n.m.	n.m.	30,7	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Tr, 60 min	n.m.	n.m.	43,9	n.m.	n.m.	n.m.

Auswertbare Daten der Versuchsreihe zur Hydrolyse von β -Casein mit Trypsin entstanden nur bei der Messung der Oberflächenspannung (vgl. Tab. 51). Bereits nach einer Hydrolysedauer von fünf Minuten war die Oberflächenspannung des Hydrolysats im Vergleich zu einer Ausgangslösung mit 3,4% angereicherter β -Casein-Fraktion herabgesetzt. Nach einer Hydrolysezeit von 15 Minuten hat sich die Oberflächenspannung auf 41 mN/m abgesenkt, nach

30 Minuten Hydrolyse betrug die Oberflächenspannung der Lösung nur noch 31 mN/m. Nach der Hydrolyse der β -Casein-angereicherten Fraktion mit Trypsin über eine Dauer von 60 Minuten betrug die Oberflächenspannung 44 mN/m, war also höher als nach 15 und 30 Minuten Hydrolyse.

Die Entstehung von kurzkettigen Peptiden durch die Hydrolyse hat nicht zu einer Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften der angereicherten β -Casein-Fraktion in Bezug auf die Aufschlagfähigkeit und die Stabilität geführt. Die tryptische Hydrolyse hatte eine Absenkung der Oberflächenspannung zur Folge, jedoch scheint eine limitierte, kurzzeitige Hydrolyse der Absenkung der Oberflächenspannung stärker zuträglich zu sein als eine lange Hydrolysedauer (60 Minuten). Aufgrund der FPLC-Chromatogramme der Hydrolysate kann keine Begründung für die höhere Oberflächenspannung gefunden werden, das Peakprofil des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 60 Minuten unterscheidet sich nur in der Höhe der Peaks, d.h. in der Konzentration der Peptide, nicht aber in der Anzahl oder den Retentionszeiten der Peaks (vgl. Abb. 32). Für eine exakte Unterscheidung ist die Auflösung der FPLC nicht ausreichend. Der Peak bei einer Retentionszeit von ca. 52 Minuten, der einem Peptid mit einer Molmasse von <14.000 g/mol entspricht, ist in allen vier Chromatogrammen zu finden. Er nimmt mit zunehmender Hydrolysezeit sogar zu. Die Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 30 und 60 Minuten besitzen zusätzliche Peaks bei Retentionszeiten von ca. 58 resp. 64 Minuten. Aufgrund des Vorkommens dieser Peaks, deren Retentionszeit auf Molmassen im niedermolekularen Bereich hinweist, in beiden Fraktionen, können diese Peptide als Verursacher für die höhere Oberflächenspannung des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 60 Minuten ausgeschlossen werden.

Die RP-HPLC-Chromatogramme zur Charakterisierung der Hydrolysate zeigen deutlich, dass das Hydrolysat überwiegend eher hydrophile Peptide enthält (vgl. Abb. 33). Hier könnte ein Zusammenhang zwischen der geringen Hydrophobizität der Peptide und den Schaumbildungseigenschaften bestehen. Konträr zu dem geringen Anteil hydrophober Peptide steht die deutliche Absenkung der Oberflächenspannung, die durch Moleküle mit hydrophoben und hydrophilen Abschnitten verursacht wird, da diese sich an der Grenzfläche ausrichten können (Graham und Phillips 1979). Ein Zusammenhang zwischen der technofunktionellen Eigenschaft, die Oberflächenspannung abzusenken und dem Vorhandensein zur Befähigung, Schäume zu bilden und zu stabilisieren (Foegeding et al. 2006), kann anhand des tryptischen β -Casein-Hydrolysat nicht festgestellt werden.

Peptische Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion

Die Prüfung der Schaumbildungseigenschaften peptischer Hydrolysate von β -Casein nach unterschiedlichen Hydrolysezeiten hat zu heterogenen Ergebnissen geführt. Bei den Schäumen aus Hydrolysaten mit Hydrolysezeiten von 5 und 15 Minuten konnten Schäume gemessen werden, bei den Schäumen von Hydrolysaten mit Hydrolysezeiten von 30 und 60 Minuten war der Schaum zu instabil, um ihn zu transportieren. Um die Messwerte einordnen zu können, werden die Ergebnisse der Verschäumung der peptischen Hydrolysate auch mit den Ergebnissen der rekonstituierten Magermilch verglichen.

Tab. 52: Schaumbildungseigenschaften der peptischen Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion, P: Pepsin)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Casein-Fraktion (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
β -CF, P, 5 min	0,12	794	42,8	0,15	n.m.	91,5
β -CF, P, 15 min	0,11	844	43,9	0,19	0,20	84,4
β -CF, P, 30 min	n.m.	n.m.	43,1	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, P, 60 min	n.m.	n.m.	42,9	n.m.	n.m.	n.m.

Der Overrun der Schäume des peptischen Hydrolysats von β -Casein mit einer Hydrolysezeit von 5 und 15 Minuten ist höher als der Overrun von rekonstituierter Magermilch (vgl. Tab. 52). Der durchschnittliche Blasendurchmesser nach 60 Sekunden ist bei dem Hydrolysat mit einer Hydrolysedauer von 5 Minuten statistisch unverändert, bei einer Hydrolysedauer von 15 Minuten ist der durchschnittliche Blasendurchmesser um 0,03 mm größer. Nach 20 Minuten ist der Schaum des Hydrolysats mit einer Hydrolysezeit von 5 Minuten so stark zerfallen, dass kein zweites digitales Bild gemacht werden konnte. Der Blasendurchmesser des Schaums des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 15 Minuten hat sich nur geringfügig vergrößert.

Der Drainageendwert spiegelt dieses Ergebnis wider, während der Schaum des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 15 Minuten noch stabil ist (84% Drainage), sind 92% der Flüssigkeit aus dem Schaum des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 5 Minuten drainiert. Der Drainageverlauf des Hydrolysats mit einer Einwirkzeit von 5 Minuten ist deutlich höher als der des Hydrolysats mit der längeren Einwirkzeit (ohne Abbildung).

Die Oberflächenspannung hat sich durch die Hydrolyse und die damit verbundene Entstehung von Peptiden im Vergleich zum Ausgangsmaterial (β -Casein-Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein) in allen vier Hydrolysaten um ca. 4 mN/m abgesenkt.

In den FPLC-Chromatogrammen der peptischen β -Casein-Hydrolysate (vgl. Seite 92) ist zu erkennen, dass mit zunehmender Hydrolysedauer die Menge niedrigmolekularer Substanzen (<14.000 g/mol) zunimmt und die Menge der Moleküle im Molmassenbereich von Caseinen abnimmt. Der Peak bei einer Retentionszeit von ungefähr 52 Minuten wird mit zunehmender Hydrolysedauer größer, die Molmasse liegt etwas unter der von α -Lactalbumin (14.000 g/mol), das bei 50 Minuten eluiert. Die Zunahme dieses Peaks und des Peaks von Peptiden mit kleineren Molmassen hat keinerlei Einfluss auf die Oberflächenspannung der peptischen Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion. Auf die Schaumstabilität scheint die Veränderung des Molmassenprofils in Richtung der Peptide mit Molmassen <14.000 g/mol Auswirkungen zu haben. Eine partielle Hydrolyse durch geringe Hydrolysezeiten hat schaumsta-

bilisierenden Einfluss auf das Hydrolysat, während nach den längeren Hydrolysezeiten der Schaum keine Stabilität besitzt.

Anhand der Ergebnisse zur Charakterisierung der Hydrolysate mittels RP-HPLC können die Unterschiede in der Schaumbildung nicht erklärt werden, denn alle vier RP-HPLC-Chromatogramme weisen ein ausgesprochen hydrophobes Peptid-Profil auf.

Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion mit Alcalase

Die Hydrolyse der β -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein hat zu keiner Verbesserung der Aufschlagfähigkeit und der Stabilität der Schäume geführt (vgl. Tab. 53). Wie beim β -Casein war keine Charakterisierung mittels der Parameter Schaumdichte, Overrun, durchschnittlicher Blasendurchmesser und Drainage möglich, da der Schaum schnell wieder in sich zusammenfiel und kein Transport möglich war.

Tab. 53: Schaumbildungseigenschaften der Alcalase-Hydrolysate der β -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion, Alc: Alcalase)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Casein-Fraktion (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Alc, 5 min	n.m.	n.m.	47,1	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Alc, 15 min	n.m.	n.m.	45,1	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Alc, 30 min	n.m.	n.m.	44,4	n.m.	n.m.	n.m.
β -CF, Alc, 60 min	n.m.	n.m.	41,1	n.m.	n.m.	n.m.

Die Oberflächenspannung des Hydrolysats nimmt mit zunehmender Hydrolysedauer ab. Während eine Hydrolysedauer von 5 Minuten nur eine Verringerung der Oberflächenspannung um 0,6 mN/m hervorruft, wird die Oberflächenspannung durch die Hydrolyse der β -Casein-angereicherten Fraktion mit Alcalase nach einer Hydrolysedauer von 60 Minuten um 6,6 mN/m abgesenkt.

Aus den FPLC-Chromatogrammen der Hydrolysate (vgl. Seite 95) kann entnommen werden, dass bereits nach kurzer Hydrolysedauer (5 min) das β -Casein nicht mehr detektierbar ist. Mit zunehmender Hydrolysedauer vergrößert sich die Fläche des Peaks bei ca. 61 Minuten, die Retentionszeit deutet auf Peptide mit Molmassen deutlich unter der Molmasse von α -LA, das bei 50 Minuten eluiert, hin. Die Abnahme der Oberflächenspannung kann im Falle der mittels Alcalase hergestellten Hydrolysate aus der β -Casein-angereicherten Fraktion auf die Zunahme der Peptide mit geringen Molmassen zurückgeführt werden.

Die Fähigkeit zur Verringerung der Oberflächenspannung, die mit der Fähigkeit zur Schaumbildung und Schaumstabilisierung in Zusammenhang gebracht wird (Foegeding 2006), kann im Falle dieses Hydrolysats nicht bestätigt werden, da kein Schaum erzeugt werden konnte.

Die RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysate zeigen, dass sowohl eher hydrophobe als auch eher hydrophile Peptide vorhanden sind, jedoch scheint die Konzentration der eher hydrophob einzuschätzenden Peptide größer zu sein als die der eher hydrophilen.

Die Hydrolyse von β -Casein mit Trypsin, Alcalase oder Pepsin und die Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften ist in der bekannten Literatur noch nicht beschrieben worden. Ein Vergleich der Ergebnisse ist darum nicht möglich.

Die Hydrolyse der β -Casein-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein hat nur im Falle der kurzzeitigen peptischen Hydrolyse (bis 15 Minuten) zu einer Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften der Ausgangsfraktion geführt. Die Oberflächenspannung konnte durch die Hydrolyse mit Trypsin und Alcalase abgesenkt werden, ein Zusammenhang zwischen der Absenkung der Oberflächenspannung und der Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften, wie es in der Literatur beschrieben ist (Foegeding et al., 2006), konnte nicht nachgewiesen werden.

4.3.8. Hydrolysate aus β -Lactoglobulin

Die β -Lactoglobulin-Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Technikummaßstab wurde ebenfalls mit den Enzymen Trypsin, Pepsin und Alcalase hydrolysiert. Die Hydrolysezeiten betragen 5, 15, 30 und 60 Minuten, die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzung (vgl. Material und Methoden). Die Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften von Hydrolysaten aus β -LG ist in der Literatur beschrieben (Caessens et al., 1999; Davis et al., 2005; Creusot et al., 2006 usw.), hier können Vergleiche vorgenommen werden.

Tryptische Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion

Die tryptischen Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion aus Molkenproteinisolat besitzen eine erhöhte Aufschlagfähigkeit im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Mit einer Hydrolysedauer von 5 Minuten wird eine Zunahme des Overrun um 73% erzielt, mit zunehmender Hydrolysezeit wird die Zunahme geringer, alle Hydrolysate besitzen höhere Overruns als das Ausgangsmaterial (vgl. Tab. 54). Die Aufschlagzunahme nach den längeren Hydrolysezeiten beträgt 45% nach 15 Minuten Hydrolyse, 31% nach 30 Minuten Hydrolyse und 16% nach der längsten Hydrolysezeit (60 Minuten). Die Schaumdichte nimmt dementsprechend ab.

Die Oberflächenspannung ist bei den Hydrolysaten mit Hydrolysezeiten von 5 bis 30 Minuten höher als die Oberflächenspannung des Ausgangsproteins, nach einer Hydrolysezeit von 60 Minuten ist sie um 1 mN/m geringer.

Tab. 54: Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, Tr: Trypsin)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Lactoglobulin-Fraktion (3,4%)	0,13	703	47,9	0,28	n.m.	88,3
β -LGF, Tr, 5 min	0,08	1216	49,9	0,38	0,41	83,3
β -LGF, Tr, 15 min	0,09	1017	48,9	0,34	0,43	84,3
β -LGF, Tr, 30 min	0,10	919	49,5	0,32	0,24	79,9
β -LGF, Tr, 60 min	0,11	812	46,9	0,24	n.m.	94,0

Der durchschnittliche Blasendurchmesser des Schaums nach einer Minute Standzeit ist bei dem Hydrolysat mit der kürzesten Hydrolysedauer um 0,1 mm größer als der mittlere Blasendurchmesser des Ausgangsmaterials. Mit zunehmender Hydrolysedauer nimmt der Blasendurchmesser ab, bei dem Hydrolysat mit einer Hydrolysedauer von 60 Minuten liegt der durchschnittliche Blasendurchmesser unterhalb dessen des Ausgangsmaterials. Der Rückgang des Blasendurchmessers der Schäume der Hydrolysate mit einer Hydrolysezeit von 30 Minuten ist auf die Destabilisierungsmechanismen von Schaum zurückzuführen (vgl. Kap. 2.2). Die Disproportionation beschreibt den Gastransport von der kleineren in die größere Blase. Unterliegt die größere Blase gleichzeitig der Koaleszenz, wird die Anzahl der großen Blasen geringer, während Blasen kleiner werden. Der Mittelwert bezieht sich auf die Menge an Blasen und berechnet die durchschnittliche Größe. Durch die Destabilisierungsmechanismen in Schaum kann es zu einer geringeren mittleren Blasengröße nach einer längeren Standzeit kommen.

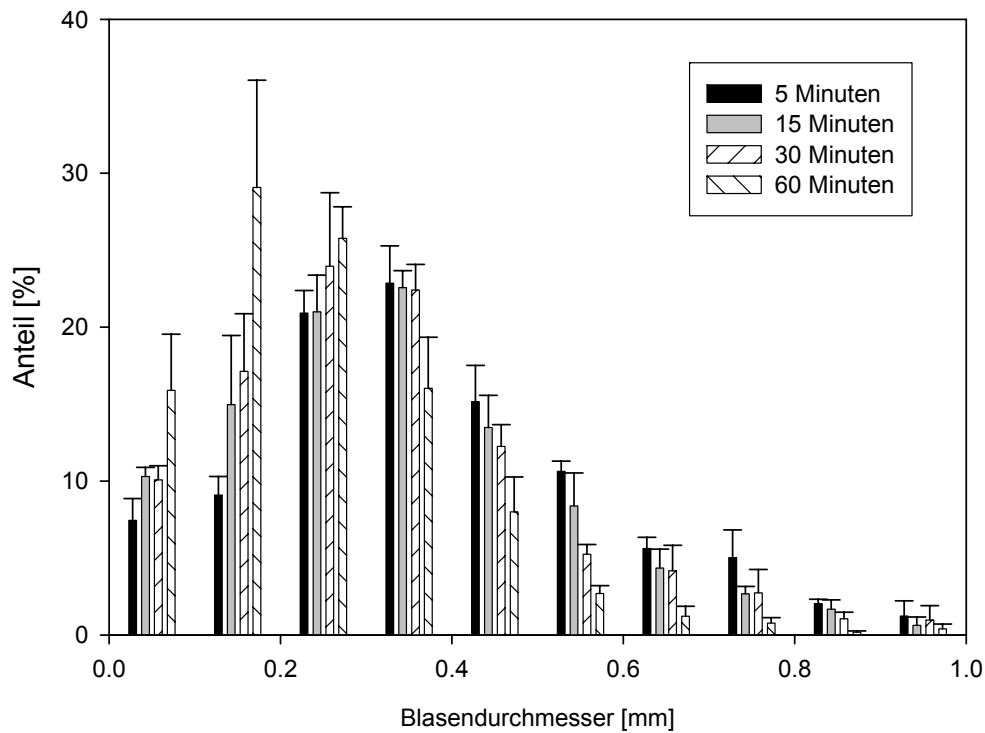


Abb. 70: Blasengrößenverteilung der Schäume aus tryptischen Hydrolysaten von β -LG mit Hydrolysezeiten von 5-60 Minuten nach 60 Sekunden Standzeit

Der Vergleich der Blasengrößenverteilungen der Hydrolysate nach 60 Sekunden Standzeit zeigt, dass bei den Hydrolysaten mit Hydrolysezeiten von 5 bis 30 Minuten die Blasen zwischen 0,2 und 0,4 mm den höchsten Anteil haben, bei dem Hydrolysat mit einer Hydrolysezeit von 60 Minuten ist die Größenklasse zwischen 0,1 und 0,2 mm die stärkste Fraktion.

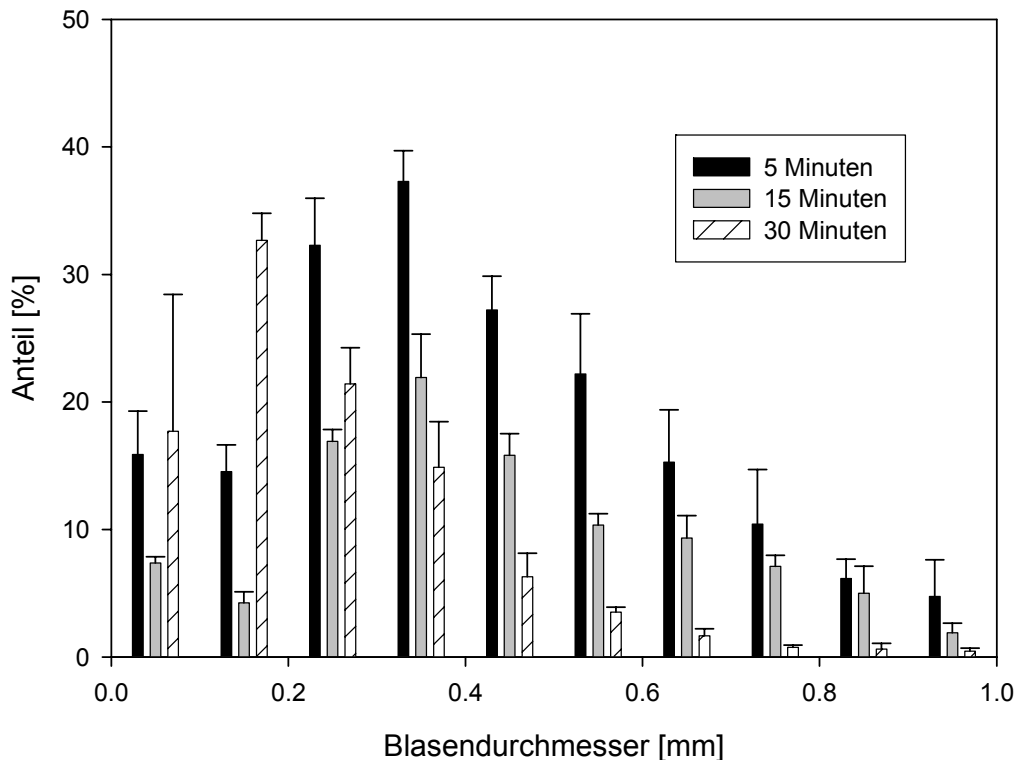


Abb. 71: Blasengrößenverteilung der Schäume aus tryptischen Hydrolysaten von β -LG mit Hydrolysezeiten von 5-60 Minuten nach 20 Minuten Standzeit

Die Blasengrößenverteilungen der Hydrolysate nach 20 Minuten Standzeit können nur für die Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 30 Minuten verglichen werden, da der Schaum des 60 Minute hydrolysierten β -LG bereits kollabiert war. Bei dem Vergleich der Größenverteilung fällt auf, dass die Hydrolysate mit den kürzeren Hydrolysezeiten ihre stärkste Blasenfraktion bei Durchmessern von 0,3 bis 0,4 haben, bei dem Hydrolysat mit der Hydrolysezeit von 30 Minuten beträgt der Durchmesser der stärksten Fraktion zwischen 0,1 und 0,2 mm. Es hat eine Verschiebung stattgefunden, die auch in der durchschnittlichen Blasengröße festzustellen ist (vgl. Tab. 54).

Der Drainage-Endwert der Schäume ist niedriger als der des Ausgangsmaterials, er nimmt mit zunehmender Hydrolysedauer ab, nur der Schaum des Hydrolysats mit einer Hydrolysedauer von 60 Minuten hat eine höhere Drainage (vgl. Tab. 54).

Durch die Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Trypsin kann sowohl das Aufschlagvermögen als auch die Stabilität des Schaums erhöht werden. Die Hydrolysedauer war in den vorliegenden Versuchen bei 30 Minuten optimal, um die Stabilität des Schaums zu verbessern. Ähnliche Ergebnisse erzielten Huang et al. (1996) hinsichtlich der Emulgierereigenschaften von tryptischen β -LG-Hydrolysaten, auch hier war eine kurze Hydrolysedauer den techno-

funktionellen Eigenschaften zuträglich, eine extensive Hydrolyse führte zu einem vollständigen Verlust der Emulgiereigenschaften.

Die Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften von β -LG durch die Hydrolyse mit Trypsin wird auch durch Caessens (1999a) positiv beurteilt. Die Autorin vermutet, dass durch die Exposition von funktionellen Gruppen die Oberflächenspannung gesenkt wird und die Schaumbildungseigenschaften verbessert werden. Davis et al. (2005) hydrolysierten ebenfalls β -LG mit Trypsin. Der gemessene Overrun (Aufschlagmethode: Küchenmixer) war gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht erhöht. Nach Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung kann die Verbesserung der schaubildenden Eigenschaften nicht auf eine Absenkung der Oberflächenspannung zurückgeführt werden, denn diese wurde durch die Hydrolyse kaum verändert.

Die RP-HPLC-Chromatogramme zeigen eine heterogene Verteilung von eher hydrophilen und hydrophoben Gruppen, wobei der höchste Anteil der Peptide eine mittlere Elutionszeit aufweist. Verbesserte Schaumbildungseigenschaften können nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen nicht ausschließlich auf hydrophobe Peptide zurückgeführt werden.

Die FPLC-Chromatogramme der Hydrolysate mit verbesserter Aufschlagfähigkeit und Stabilität der Schäume zeigen einen Peak Molmassenbereich von $>2.000.000$ g/mol. Ob die Proteinaggregate durch kovalente oder nicht-kovalente Bindungen entstanden sind, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Offensichtlich tragen die Polymere aber zu einer verbesserten Stabilisierung der Schäume bei. Die Veränderungen in der Tertiärstruktur der Proteine durch die Reaktion funktioneller Gruppen (Creusot et al., 2006) könnte zu der Exposition weiterer, intramolekularer funktioneller Gruppen geführt haben. Die Autoren Creusot et al. (2006) fanden im Alcalase-behandelten Hydrolysat aus Molkenproteinisolat Aggregate, die aus Peptiden und Proteinen bestanden.

Die Gewinnung der Hydrolysate aus β -LG mit Trypsin wird von verschiedenen Autoren beschrieben (Turgeon et al., 1992; Caessens, 1999; Groleau et al., 2002; Hernández-Ledesma et al., 2005 u.a.). Die Autoren charakterisieren die entstandenen Hydrolysate mittels RP-HPLC, um die Peptide anschließend detektieren zu können. Die Aggregate mit einer Molmasse $> 2.000.000$ g/mol werden bei der Vorbehandlung der Proben ausgefällt und deswegen nicht detektiert (Groleau et al., 2003). Mittels SDS-Page sind die Aggregate in den vorliegenden Versuchen nicht detektiert worden, da die reduzierenden Bedingungen nicht-kovalente Bindungen auflösen.

Eine Charakterisierung von tryptischem Hydrolysat aus Molkenproteinisolat mittels Größenausschlusschromatographie wird von Huang et al. (1994) vorgenommen, die Ergebnisse werden jedoch nur für die ersten 40 Minuten Retentionszeit diskutiert, die bei der von den Autoren verwendeten Methode Molekülen mit geringen Molmassen entsprechen.

Groleau et al. (2003) stellen mittels Trübungsmessung ebenfalls die Existenz von Aggregaten fest. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurden die Aggregatbestandteile als Peptide, die SS-Bindungen enthalten (β -LG 61-69 + 149-162 und β -LG 61-70 + 149-162), bestimmt. Diese Peptide enthalten keine S⁻-Gruppe, wodurch eine Interaktion zwischen S⁻- und SS-Gruppen eigentlich ausgeschlossen werden kann. Die Autoren vermuten, dass das

Peptid β -LG 102-124, welches die SH-Gruppe enthält, zwar nicht mittels HPLC detektiert werden konnte, aber dennoch vorhanden ist. Laut Groleau et al. (2003) bilden die Peptide bei pH-Wert 4,0 mit intakten α -LA-Molekülen das Aggregat. Aufgrund der Detektion von Peptiden mit funktionellen Gruppen in den Aggregaten kann davon ausgegangen werden, dass die schaumstabilisierenden Eigenschaften der tryptischen Hydrolysate von den Aggregaten beeinflusst werden. Die Aufschlagszunahme kann nur bedingt von dem Aggregat beeinflusst werden, da bei dem Hydrolysat mit einer Hydrolysezeit von 60 Minuten der Overrun erhöht war, ohne dass Aggregate detektiert werden konnten.

Peptische Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion

Die peptische Hydrolyse der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion resultierte ebenfalls in veränderten Schaumbildungseigenschaften. Die Schaumdichte wurde bei allen Hydrolysaten abgesenkt (vgl. Tab. 55). Dementsprechend führte die Hydrolyse zu einem erhöhten Aufschlag, der mit zunehmender Hydrolysedauer zunahm. Nach einer Hydrolysezeit von 5 Minuten war der Overrun um 50% höher als der des Ausgangsmaterials, nach 60 Minuten Hydrolysezeit war der Overrun um fast 90% höher als der Overrun der angereicherten Fraktion ohne Hydrolyse.

Tab. 55: Schaumbildungseigenschaften der peptischen Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, P: Pepsin)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Lactoglobulin-Fraktion (3,4%)	0,13	703	47,9	0,28	n.m.	88,3
β -LGF, P, 5 min	0,09	1039	47,1	0,17	0,24	41,8
β -LGF, P, 15 min	0,08	1120	45,7	0,15	0,20	88,2
β -LGF, P, 30 min	0,08	1221	46,9	0,16	0,19	89,9
β -LGF, P, 60 min	0,07	1318	46,8	0,16	0,21	90,1

Die Oberflächenspannung der Hydrolysate war im Vergleich zum Ausgangsmaterial um 0,8 bis 1,1 mN/m abgesenkt.

Die durchschnittliche Blasengröße nach einer Standzeit von 60 Sekunden wurde durch die Hydrolyse gegenüber dem Ausgangsmaterial deutlich verringert. Während das Ausgangsmaterial eine durchschnittliche Blasengröße von 0,28 mm besaß, hatten die Hydrolysate mittlere Blasengrößen von 0,15 bis 0,17 mm, der Schaum war demnach deutlich feinporiger.

Der Drainage-Endwert des Hydrolysats mit einer Hydrolysezeit von 5 Minuten ist deutlich verringert durch die Hydrolyse. Nach 20 Minuten Standzeit war nicht mal die Hälfte der Flüssigkeit, die zum gleichen Zeitpunkt beim Schaum des Ausgangsmaterials gemessen werden konnte, drainiert. Die Drainage-Endwerte der Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 15 bis 60 Minuten haben sich gegenüber dem Ausgangsmaterial kaum verändert.

Die Hydrolyse der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion mit Pepsin führte hinsichtlich des Aufschlagvermögens zu einer Verbesserung der technofunktionellen Eigenschaften. Eine limitierte Hydrolyse (5 Minuten) führte in den vorliegenden Versuchen auch zu einer Erhöhung der Stabilität des Schaums, gemessen an der Flüssigkeitsmenge, die während der Standzeit drainierte.

Die Hydrolyse von β -LG mit Pepsin wurde von Schmidt und Poll (1991) in einem Natriumcitrat-gepufferten System durchgeführt. Die Autoren beschreiben, dass natives β -LG gegen die Hydrolyse mit Pepsin resistent ist. Die FPLC-Chromatogramme der Hydrolysate der vorliegenden Versuche bestätigen diesen Sachverhalt, der β -LG- Peak bleibt weitgehend erhalten.

Caessens (1999a) führte die β -LG-Hydrolyse mit Pepsin ebenfalls in wässriger Lösung durch. Obwohl mittels präparativer HPLC intaktes Protein gefunden werden konnte, wurden auch von β -LG stammende Peptide detektiert. Die Schaumbildungseigenschaften des Hydrolysats, gemessen an der Schaumhöhe in Abhängigkeit von der Zeit (Aufschlagmethode: Quirl), sind gegenüber dem Ausgangsmaterial leicht erhöht. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Davis et al. (2005) überein, auch hier ist der Overrun nach Hydrolyse mit Pepsin erhöht. Durch die Fraktionierung mittels präparativer HPLC konnte Caessens (1999a) bestimmen, dass die Schaumbildungseigenschaften mit abnehmender Molmasse geringer werden.

In den vorliegenden Ergebnissen hat das peptische Hydrolysat von β -LG mit der geringsten Hydrolysezeit den geringsten Overrun, mit zunehmender Hydrolyse nimmt die Aufschlagfähigkeit zu. Unterschiede in der Größenverteilung der Peptide sind mit Hilfe der FPLC-Chromatogramme (vgl. Abb. 40) nicht zu erkennen, es kann mittels der angewandten Methodik also kein Rückschluss auf den Einfluss der Peptidgrößen gemacht werden.

Die Zunahme der Aufschlagfähigkeit kann auch mittels der Auswertung der RP-HPLC-Chromatogramme nicht von Molekülen mit bestimmten Molmassen abhängig gemacht werden, denn auch hier ähneln sich die Peptidmuster. Bei allen vier Hydrolysaten ist der Charakter der Peptide eher hydrophob, bei der Hydrolyse von β -LG mit Pepsin kann also festgestellt werden, dass die Hydrolysate, die verbesserte Schaumbildungseigenschaften aufweisen, eher hydrophoben Charakter besitzen. Vor der Charakterisierung mittels HPLC werden noch intakte Proteine ausgefällt, der Einfluss der Hydrophobizität von β -LG wird nicht ausgewertet. Aufgrund des hohen Anteils von β -LG in den Hydrolysaten ist davon auszugehen, dass die Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften auf das gemeinsame Vorhandensein von Peptiden mit Disulfidbindungen (Caessens, 1999a) und intakten Proteinen zurückzuführen ist. Die Aufschlagfähigkeit scheint durch Peptide im Zusammenspiel mit Proteinen verbessert zu werden, die Stabilität scheint nur bei äußerst limitierter Hydrolyse zuzunehmen.

Ähnliche Ergebnisse zeigen die Untersuchungen von Konrad et al. (2005a und 2005b). Bei der Hydrolyse von Molkenproteinisolat konnte ein Abbau von α -Lactalbumin und hitze geschädigtem β -Lactoglobulin (ungefähr 12% des β -LG) festgestellt werden, das nativ erhaltene β -Lactoglobulin wurde nicht abgebaut. Die Hydrolysate hatte erhöhte Aufschlagfähigkeiten, während die Stabilität abgenommen hatte.

Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion mit Alcalase

Die Hydrolysate der mit Alcalase hydrolysierten β -LG-angereicherten Fraktion haben sich in ihren Schaumbildungseigenschaften im Vergleich zum Ausgangsmaterial verändert.

Der Overrun der Hydrolysate ist erhöht, den am stärksten erhöhten Overrun hat die Fraktion mit einer Hydrolysezeit von 5 Minuten (vgl. Tab. 56). Obwohl alle Hydrolysate gegenüber der Ausgangsfraktionen eine erhöhte Aufschlagfähigkeit aufweisen, nimmt diese mit der Verlängerung der Hydrolysedauer ab, zwischen den Hydrolysaten nach 30 und 60 Minuten findet wieder eine geringe Erhöhung des Overrun statt.

Tab. 56: Schaumbildungseigenschaften der Alcalase-Hydrolysate der β -Lactoglobulin-angereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, Alc: Alcalase)

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
β -Lactoglobulin-Fraktion (3,4%)	0,13	703	47,9	0,28	n.m.	88,3
β -LGF, Alc, 5 min	0,09	1098	45,5	0,18	0,18	97,7
β -LGF, Alc, 15 min	0,10	933	44,7	0,17	n.m.	91,1
β -LGF, Alc, 30 min	0,11	866	44,6	0,20	n.m.	95,6
β -LGF, Alc, 60 min	0,11	887	44,9	n.m.	n.m.	92,5

Die Oberflächenspannung ist bei allen Hydrolysaten im Vergleich zum Ausgangsmaterial um ca. 2 mN/m abgesenkt. Zwischen den Hydrolysaten gibt es nur geringe Unterschiede, es ist keine Gesetzmäßigkeit zu erkennen.

Der durchschnittliche Blasengrößendurchmesser nach 60 Minuten hat sich gegenüber dem durchschnittlichen Blasendurchmesser des Ausgangsmaterials verkleinert, die Hydrolyse hat zu einer Verfeinerung des Schaumbildes durch die Verringerung der Porengröße geführt. Die durchschnittliche Blasengröße der Schäume aus Hydrolysaten mit einer Hydrolysedauer von 60 Minuten konnte nicht bestimmt werden, da der Schaum kaum Licht der Durchlichtlampe durchscheinen ließ. Aus diesem Grund konnte die Blasengrößenauswertung mittels digitaler Bildbearbeitung nicht vorgenommen werden.

Die Drainage-Endwerte der Hydrolysate sind gegenüber dem des Ausgangsmaterials erhöht. Die Drainagemenge hat sich gegenüber dem Ausgangsmaterial, dessen Schaum nach den Stabilitätskriterien als instabil eingestuft werden kann, noch erhöht.

Davis et al. (2005) stellten keine erhöhte Aufschlagfähigkeit der Hydrolysate aus β -Lactoglobulin nach Hydrolyse mit Alcalase fest. Durch die Hydrolyse wurde jedoch die Oberflächenspannung um ca. 8 mN/m abgesenkt.

Die FPLC-Chromatogramme der Alcalase-Hydrolysate von β -LG haben wie die Chromatogramme der tryptischen Hydrolysate einen Peak nach 20-30 Minuten Retentionszeit, die auf Moleküle im hochmolekularen Bereich hinweisen. Die Aggregate, die sich offensichtlich während der Hydrolyse gebildet haben, scheinen auch im Falle der Alcalase zu einer Förderung der Aufschlagfähigkeit und der Stabilität der Hydrolysate führt zu haben.

4.3.9. Schaumbildungseigenschaften kommerzieller Hydrolysat-angereicherter Proben

Kaffeegetränke mit Milchschaum (Latte Macchiato, Cappuccino usw.) werden in Deutschland immer beliebter. Um den Ansprüchen der Kunden nach einem stabilen, cremigen Milchschaum gerecht zu werden, haben einige deutsche milchverarbeitende Unternehmen Produkte hergestellt, die einen besonders cremigen und stabilen Schaum garantieren sollen.

Drei sich derzeit auf dem Markt befindliche Produkte wurden mit dem von Borcharding (2004) entwickelten Aufschäumssystem auf die Eignung zur Verschäumung untersucht.

Den Zutatenlisten der aufschäumbaren Milchprodukte ist zu entnehmen, dass die Handelsproben 1 und 2 Milcheiweißerzeugnisse enthalten, wahrscheinlich Milchproteinhydrolysate, Handelsprobe 3 enthält eine Weizenproteinhydrolysat. Der durchschnittliche Proteingehalt der Milch beträgt ca. 3,4%, aus den Angaben zum Proteingehalt der Produkte kann berechnet werden, dass der Milch zwischen 0,3% (Handelsprobe 3) und 0,5% (Handelsprobe 1) Hydrolysat zugesetzt wurden.

Alle drei Produkte enthalten Stabilisatoren, die Handelsproben 1 und 2 enthalten zusätzlich Zucker. Der Fettgehalt der Produkte ist verschieden, er beträgt zwischen 1,5% (Handelsprobe 1) und 2,6% (Handelsprobe 2).

Aufgrund der unterschiedlichen Fettgehalte der kommerziellen Milchprodukte zur Herstellung von Milchschaum werden die Eigenschaften sowohl mit denen von rekonstituierter Magermilch als auch mit den Eigenschaften von Vollmilch verglichen (vgl. Tab. 57).

Tab. 57: Vergleich der Messwerte der Handelsproben für Milchschaum mit rekonstituiertem Magermilchpulver und Vollmilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Standards						
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Vollmilch 3,5% Fett	0,13	737	48,1	0,12	0,17	88,2
Handelsproben						
Handelsprobe 1	0,14	643	48,2	0,17	0,23	83,4
Handelsprobe 2	0,15	620	48,2	0,16	0,20	78,4
Handelsprobe 3	0,17	510	45,2	0,15	0,21	81,2

Im Vergleich mit der rekonstituierten Magermilch und der Vollmilch ist der Overrun aller kommerziellen Produkte niedriger und die Schaumdichte höher (vgl. Tab. 57). Die Oberflächenspannung der Handelsprobe 3 ist deutlich geringer als die der Vergleichssubstanzen, die Oberflächenspannung der Handelsproben 1 und 2 unterscheidet sich nicht von der Oberflächenspannung der rekonstituierten Magermilch und der Vollmilch.

Die durchschnittliche Blasengröße der Handelsproben liegt nach 60 Sekunden im Bereich der durchschnittlichen Blasengröße der rekonstituierten Magermilch, nach einer Beobachtungszeit von 1200 Sekunden hat die durchschnittliche Größe gegenüber den Messwerten der Vergleichssubstanzen deutlich zugelegt. Eine größere durchschnittliche Blasengröße bedeutet größere Poren und einen weniger cremig wirkenden Schaum.

Der Vergleich der Drainage-Endwerte zeigt, dass aus den Schäumen aller Handelsproben ein höherer Anteil Flüssigkeit drainiert als aus dem Schaum von rekonstituierter Magermilch. Gegenüber der Drainage des Schaums von Vollmilch haben sich der Drainage-Endwert und damit die Stabilität verbessert. Den geringsten Drainage-Endwert besitzt die Handelsprobe 2.

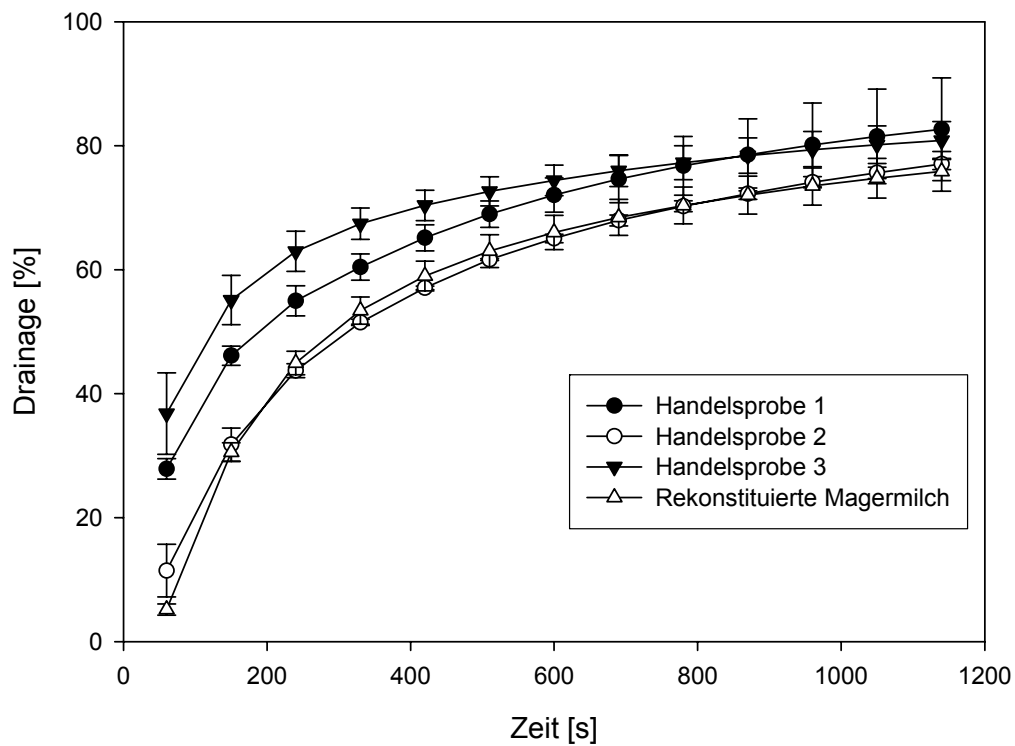


Abb. 72: Drainageverlauf der Handelsproben im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch

Der Vergleich des Verlaufs der Drainage aus den Schäumen der Handelsproben mit dem Verlauf der Drainage von rekonstituierter Magermilch zeigt, dass Handelsprobe 2 sich im Verlauf der Drainage kaum von der rekonstituierten Magermilch unterscheidet. Die Drainage des Schaums aus Handelsprobe 1 startet mit einem Anfangswert von 18%, der Abstand zwischen den Kurven bleibt über den gesamten Verlauf gleich. Die Drainage des Schaums aus Handelsprobe 3 hat den höchsten Anfangswert, im Verlauf nimmt die Drainagegeschwindigkeit jedoch ab und der Endwert ist geringer als der von Handelsprobe 1.

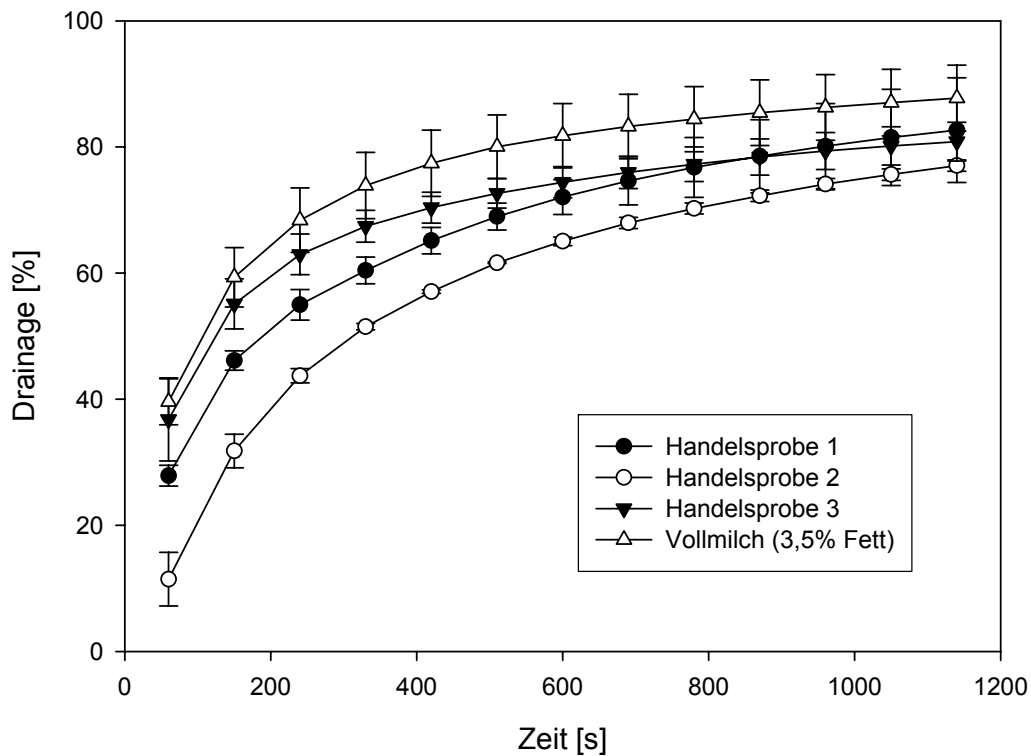


Abb. 73: Drainageverlauf der Handelsproben im Vergleich mit Vollmilch

Der Vergleich der Drainage der Schäume der Handelsproben mit den von Vollmilch zeigt, dass sich der Verlauf der Drainage gegenüber dem Ausgangsmaterial Vollmilch verbessert hat. Besonders langsam und gleichförmig verläuft die Drainage der Schäume aus Handelsprobe 1, die auch den geringsten Drainage-Endwert besitzt.

Die Handelsproben zeigen geringere Aufschlagfähigkeiten als die Vergleichssubstanzen rekonstituierte Magermilch und Vollmilch. Die geringere Aufschlagfähigkeit im Vergleich zu rekonstituierter Magermilch könnte auf den höheren Fettgehalt der Produkte zurückgeführt werden. Fett beeinflusst Proteinschäume negativ in Bezug auf die Schaumbildungseigenschaften, d.h. schon geringe Mengen freies Fett können die Aufschlagfähigkeit erheblich herabsetzen (Kinsella, 1984, Walstra et al. 2006). Die Fettkügelchen drängen wie die Proteine an die Oberfläche und produzieren Risse im Proteinfilm. Dadurch kommt es zu Koaleszenz der Blase (Walstra 2006). Dass sich die Aufschlagfähigkeit jedoch auch gegenüber der Vollmilch, die einen höheren Fettgehalt besitzt als die Handelsproben, verschlechtert hat, kann nicht erklärt werden.

Die kommerziellen Produkte wurden alle durch eine Ultraschallbehandlung haltbar gemacht. Die Erhitzung der Milch auf Temperaturen über 70°C führt generell zu einer Denaturierung von Molkenproteinen (Corredig und Dalgleish 1996). Eine Teildenaturierung erhöht die Auf-

schlagfähigkeit von Proteinen, da sonst im Molekül liegende funktionelle Gruppen durch die Denaturierung exponiert werden und der schnellen Stabilisierung der Grenzfläche zur Verfügung stehen (Kinsella 1981). Bei den vorliegenden Produkten kann von einer vollständigen Denaturierung der Molkenproteine durch die Ultraheißerhitzung ausgegangen werden, es ist keine Erhöhung der Aufschlagfähigkeit erfolgt.

Die durchschnittliche Blasengröße hat zugenommen, der Schaum hat demnach eine gröbere Struktur und ist nicht so cremig.

Die Drainage hat gegenüber der Drainage des Schaums aus Vollmilch abgenommen, die Stabilität wurde durch die Zugabe von Hydrolysat und Stabilisatoren erhöht. Eine Rückführung der Stabilitätsverbesserung auf das Hydrolysat ist nicht möglich, da die Stabilität durch Stabilisatoren (Natriumalginat bzw. Methylcellulose und Carrageen, vgl. Tab. 11) verstärkt wurde. Gegenüber rekonstituierter Magermilch ist die Stabilität der kommerziellen Produkte niedriger, Handelsprobe 2 kommt der Stabilität von Magermilch am nächsten.

Die Handelsproben für besonders stabilen Milchschaum zeigen im Vergleich zu Vollmilch eine Verbesserung der Stabilität, die Aufschlagfähigkeit ist jedoch geringer. Die erhöhte Stabilität kann nicht ausschließlich auf den Einsatz von Hydrolysaten zurückgeführt werden, da alle Produkte Stabilisatoren enthalten. Mit dem vorliegenden Verfahren konnte keine Verbesserung gegenüber Magermilch festgestellt werden, die den Einsatz der teureren Spezialmilch gegenüber herkömmlicher Magermilch rechtfertigt.

Vergleich der Handelsproben mit Hydrolysat-angereicherten Proben

Der Vergleich der Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysat-angereicherten Proben mit den Handelsproben zeigt, dass einige der in den Versuchen hergestellten Hydrolysat-angereicherten Proben den Handelsproben überlegen sind (vgl. Tab. 55).

Tab. 58: Vergleich der Messwerte der Handelsproben für Milchschaum mit eigenen Proben

Messparameter	Schaum- dichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Handelsproben						
Handelsprobe 1	0,14	643	48,2	0,17	0,23	83,4
Handelsprobe 2	0,15	620	48,2	0,16	0,20	78,4
Handelsprobe 3	0,17	510	45,2	0,15	0,21	81,2
Eigene Proben						
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,09	1037	51,6	0,17	0,22	82,5
MMP + MPI Tr Hyd Ret 5.000 gefr	0,11	866	44,2	0,17	n.m.	92,0
MMP + MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,12	752	46,7	0,17	0,22	73,9
MMP + MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,14	629	46,4	0,14	0,16	72,0

In den eigenen Versuchen zu den Schaumbildungseigenschaften von Hydrolysaten in einem komplexen System wurden Schäume hergestellt, die in den Aufschlagseigenschaften den Handelsproben überlegen sind (z.B. Vollmilch angereichert mit dem tryptischen Permeat der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol). Die Stabilität der Schäume konnte in mit chymotryptischen Hydrolysaten aus Molkenproteinisolat verbessert werden, die Schäume des chymotryptischen Permeats und Retentats der Ultrafiltration mit einem NMWCO von 10.000 g/mol sind stabiler als die Handelsproben. Gleichzeitig wurde eine gleichwertige (Retentat) oder höhere Aufschlagkapazität der hydrolysatangereicherten rekonstituierten Magermilch erreicht.

4.3.10. Hydrolysat von Magermilch mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

Die proteolytisch wirksamen Hydrolasen von *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sind zellwandständig (Kawai et al., 1999). Eine hohe hydrolytische Aktivität der zellwand-ständigen Proteasen wurde von Ezzat et al. (1985) nachgewiesen. An einer dieser extracellulären Proteasen wurde die Fähigkeit zur Hydrolyse von α_s -Casein aufgezeigt (Kawai et al., 1999). Proteasen von *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sind auch in der Lage, β - und κ -Casein zu spalten (Singh und Sharma 1983). Die Proteolyse von Casein der als Serinproteasen charakterisierten Enzyme ist nicht nur durch die isolierten Proteasen, sondern auch durch den Einsatz von ganzen Zellen in Milch möglich (Laloi et al., 1991).

Tab. 59: Schaumbildungseigenschaften der mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* inkubierten Magermilch

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurchmesser [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Rekonstituierte Ma- germilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Hydrolysat aus MO	0,12	783	31,8	n.m.	n.m.	92,3

Die Hydrolysate von Magermilch wurden nach Erhitzung verschäumt. Die Hydrolyse von Magermilch mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* führt zu einer Erhöhung des Overrun und damit zu einer erhöhten Aufschlagkapazität der Magermilch. Die Oberflächenspannung ist gegenüber der Oberflächenspannung von rekonstituierter Magermilch deutlich abgesenkt worden.

Der durchschnittliche Blasendurchmesser konnte nicht gemessen werden, da kein Licht durch den optisch sehr dichten Schaum drang und keine digitale Aufnahme des Schaums gemacht werden konnte.

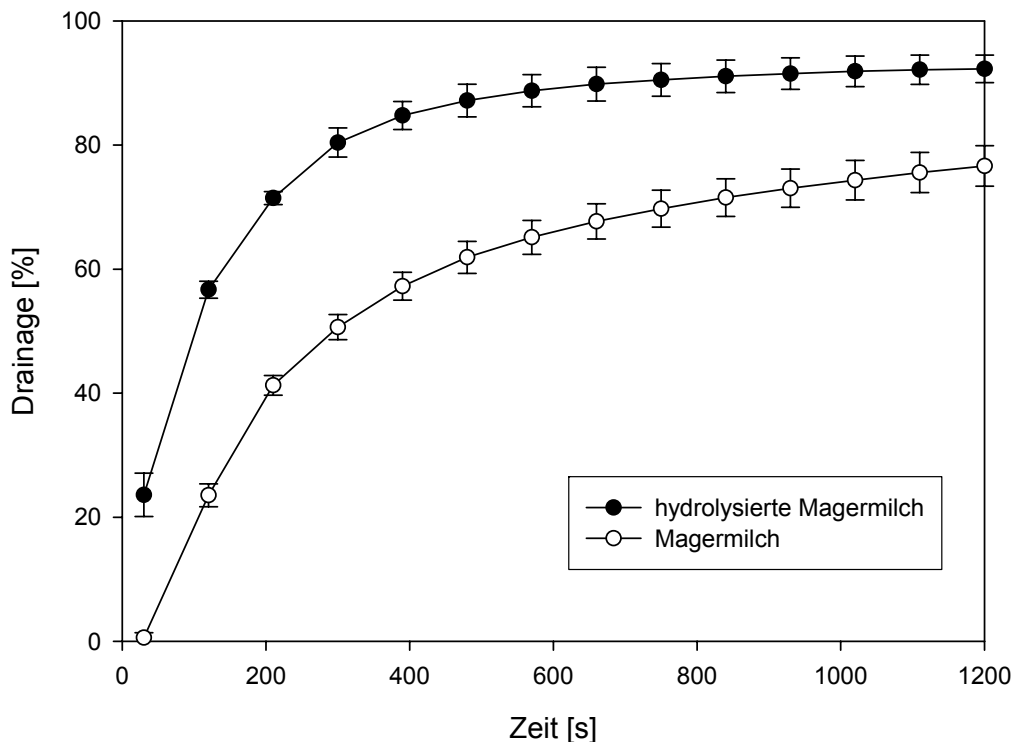


Abb. 74: Vergleich des Drainageverlaufs von mit *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* hydrolysiertes Magermilch und rekonstituierter Magermilch

Die Schäume aus hydrolysiertes Magermilch sind sehr instabil, schon nach sechs Minuten sind 80% der Flüssigkeit drainiert (vgl. Abb. 74) und der Schaum stark zerfallen.

Die proteolytische Spaltung von Milchprotein durch *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* hat zu einer Erhöhung der Aufschlagfähigkeit von Magermilch geführt. Eine Beteiligung der in der Lösung vorhandenen Bakterien an dem Vorgang der Grenzflächenbildung kann aufgrund der Größe der Bakterien (5-12 μm) ausgeschlossen werden. Andererseits könnten die außerordentlich dichten Lamellen der Schäume, die eine digitale Aufnahme verhinderten, darauf hinweisen, dass in den Lamellen Mikroorganismen vorhanden sind. Dagegen spricht, dass die Schäume von Alcalase-hydrolysiertes β -Lactoglobulin ebenfalls lichtundurchlässig waren. Da die Lösungen von Alcalase-hydrolysiertes β -LG keine Lactobacillen enthielten, muss die optisch hohe Dichte der Schäume auf andere Bestandteile zurückgeführt werden.

Die Stabilität der Schäume wurde verringert. Dieser Sachverhalt lässt sich auf die entstandenen Peptide zurückführen, Stabilitätsverringern gegenüber dem Ausgangsmaterial wurden auch bei einigen tryptischen und chymotryptischen Hydrolysaten von Molkenproteinisolat festgestellt.

Die starke Verringerung der Oberflächenspannung kann nicht in Verbindung gebracht werden mit der Verbesserung der Aufschlagfähigkeit. Während die Oberflächenspannung ge-

nüber dem Ausgangsmaterial deutlich abgesenkt ist, ist die Zunahme in der Aufschlagfähigkeit nur gering.

Literatur zu den Schaumbildungseigenschaften von mit Milchsäureproduzierenden Bakterien inkubierter Milch ist nicht bekannt.

5. Abschließende Bewertung

Im Zuge der Internationalisierung der Lebensmittelmärkte ist es in den vergangenen Jahren zu einem erhöhten Angebot an Kaffeegetränken gekommen, zu denen als Markenzeichen der Milchschaum gehört, der dem Kaffee- oder auch einem Teegetränk eine leichte, lockere und cremige Note verleiht. Die Schaumbildungseigenschaften von Milch werden durch die enthaltenen Proteine und ihre technofunktionellen Eigenschaften bestimmt.

Milchproteine unterscheiden sich in Molmasse, Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur und in ihren technofunktionellen Eigenschaften. Es wird diskutiert, ob die technofunktionellen Eigenschaften von Milchproteinfraktionen denen des Gesamt-Milchprotein- bzw. Casein- oder Molkenprotein-komplexes überlegen sind (Rantamäki et al., 2000; Lorenzen, 2003). NPN-Substanzen, die in der Milch enthalten sind, könnten aufgrund der enthaltenen kurzkettigen Peptide die Schaumbildungseigenschaften beeinflussen (Nielsen, 1997).

Nach Untersuchungen an reinen Proteinen (Zhu und Damodaran, 1994; Dickinson, 1999; Damodaran, 2005) und ihren Hydrolysaten und in jüngster Zeit auch an Milch (Borcherding, 2004) sollten in dieser Arbeit Milchproteine und Proteinfraktionen, die in Lebensmittelqualität im Technikummaßstab hergestellt worden sind, untersucht werden. Die enzymatische Hydrolyse von Proteinen und die Schaumbildungseigenschaften von Proteinen werden in der Literatur positiv korreliert (Caessens, 1999; Tuergeon et al., 1991). Der Einsatz von Hydrolysaten in Milch erscheint zur Verbesserung technofunktioneller Eigenschaften sinnvoll.

Aus diesem Zusammenhang heraus sollten in der vorliegenden Arbeit folgende aufeinander aufbauende thematische Bereiche untersucht werden:

1. Gewinnung von angereicherten Proteinfraktionen mit Lebensmittelqualität im Technikummaßstab
2. Enzymatische Modifizierung von Proteinen durch Hydrolyse und Quervernetzung
3. Charakterisierung der Fraktionen und Hydrolysate sowie Prüfung der resultierenden Schaumbildungseigenschaften.

Zur **Gewinnung von Milchproteinfraktionen** aus Magermilch, die überwiegend micellare Caseine und globuläre Molkenproteine enthält, wurden Mikro- und Ultrafiltration im Technikummaßstab eingesetzt. Dabei wurden Caseinretentate mit einem Caseingehalt von bis zu 95% und, nach Ultrafiltration der Permeate, Molkenproteinkonzentrate mit Molkenproteingehalten von bis zu 93% gewonnen (Hoffmann, Johannsen und Ströbel, 2006).

Die Caseinfraktion war im Gegensatz zu Rohmilch im Caseingehalt (95% CN, 4,8% MPN) stärker angereichert als in vergleichbaren Studien (Punidades und Rizvi, 1998: 87% CN; Pouliot et al., 1996: 92%), die Molkenproteinfraktion war im Molkenproteinanteil deutlich angereichert (93% MPN, 7% CN).

Die von Le Magnen und Maugas (1991/1995) sowie Ward and Bastian (1996) beschriebenen Verfahren zur Gewinnung von β -Casein einerseits sowie α_S -/ ρ - κ -Casein andererseits konnten im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf den Verfahrensablauf vereinfacht und bezüglich der Ausbeute/Reinheit der Produkte optimiert werden. Die Reinheit des β -Caseins im entwickelten Verfahren beträgt 78% bei einer Ausbeute von 41%. Pouliot et al. (1994) reicherten β -Casein mit einer Reinheit von 48% an, LeMagnen und Maugas (1991) gehen von einem β -Casein-Gehalt von mehr als 90% bezogen auf den Proteingehalt aus, dieser Wert konnte in eigenen Versuchen nach dem beschriebenen Verfahrensablauf nicht bestätigt werden. Die von Huppertz et al. (2006) erzielte β -Casein-Ausbeute ist mit 20% sehr gering im Vergleich mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren. Ward und Bastian (1996) erzielten im Labormaßstab eine höhere Ausbeute als das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren, eine Abnahme im Labormaßstab wird angedeutet, Zahlen werden von den Autoren nicht angegeben. Auswirkungen der Auflösung von Labcasein bei 60°C und pH 9,0 (Proteinvernetzung, Lysinoalaninbildung, Furosinbildung; Belitz et al., 2001; Faist et al., 2000; Moret et al., 1994) wurden anhand der Abnahme von Lysin und Alanin gegenüber Magermilchpulver bestimmt. Aufgrund der Abnahme an Lysin und Alanin könnte Protein geschädigt worden sein, was sich sowohl auf die ernährungsphysiologische Wertigkeit (Belitz et al., 2001) als auch auf technofunktionellen Eigenschaften auswirken kann (De Koning und van Rooijen, 1982).

Dagegen sind die Auswirkungen auf die Eigenschaften von β -Casein-Molekülen deutlich geringer, wenn es mit Hilfe der Mikrofiltration bei niedrigen Temperaturen aus Natriumcaseinat nach Murphy und Fox (1991) gewonnen wird. Allerdings ist dieses Verfahren zur Produktion größerer Mengen nicht geeignet, weil die erzielbaren Ausbeuten von 14% zu gering sind. Dieser Kritikpunkt wird auch von Murphy und Fox (1991) benannt.

Die Fraktionierung von Molkenproteinisolat in eine β -Lactoglobulin-angereicherte Fraktion einerseits und eine α -LA-/BSA-/IG-angereicherte Fraktion andererseits wurde durch wärmeinduzierte Ausfällung der α -LA-/BSA-/IG-Fraktion durch Aggregation bei saurem pH-Wert erreicht. Es wurde eine angereicherte Fraktion mit im Mittel >98% β -Lactoglobulin hergestellt. In der α -LA-/BSA-/IG-Fraktion ist der Gehalt an β -Lactoglobulin deutlich abgereichert, bildet jedoch immer noch die Hauptfraktion. Eine Reinheit der β -Lactoglobulinfraktion von >98% des Proteingehalts wurde von keinem bekannten Verfahren zur Fraktionierung von Molkenproteinen im Technikummaßstab erreicht (Konrad und Lieske, 1997; Konrad et al., 2001; Pearce et al., 1995; Bramaud et al., 1997; Lucena et al., 2007; Maubois et al., 2001).

Die NPN-Anreicherung mittels Ultrafiltration von Magermilch führte zu einer NPN-angereicherten Fraktion, die große Mengen an Lactose enthält (>66% der Trockenmasse). Das hier angewendete Verfahren der Ultrafiltration von Magermilch ist prinzipiell geeignet zur Anreicherung von NPN-Substanzen. Über die Fraktionierung mit dem Ziel der NPN-Substanzen-Gewinnung ist keine Literatur vorhanden.

Die **Hydrolyse von Milchproteinprodukten** wurde an Molkenproteinisolat mit den Enzymen Trypsin und α -Chymotrypsin im Technikummaßstab durchgeführt, die Hydrolysate wurden mittels Ultrafiltration mit nominalen Trenngrenzen von 10.000 und 5.000 g/mol fraktioniert und getrocknet. Die Fraktionen der tryptischen Hydrolysate bestanden alle aus Peptiden mit Molmassen <14.000 g/mol (Standard α -Lactalbumin), die FPLC-Chromatogramme zeigen zwar Unterschiede in der Konzentration, jedoch nicht in der Zusammensetzung der Fraktio-

nen. Mittels RP-HPLC konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Peptidzusammensetzung der Fraktionen erkannt werden. Die chymotryptischen Hydrolysate aus Molkenproteinisolat konnten mittels Membranfiltration fraktioniert werden, die Fraktionen bestehen aus unterschiedlichen Peptiden, die mit abnehmender Trenngrenze der Membran geringere Molmassen besitzen. α -Lactalbumin wurde durch Chymotrypsin weitgehend nicht hydrolysiert. Im Gegensatz zu den tryptischen Hydrolysaten zeigen die chymotryptischen Hydrolysate auf den RP-HPLC-Diagrammen einen hydrophoben Charakter. Vergleichbare Untersuchungen zu Molkenproteinisolat-Hydrolysaten sind in der Literatur nicht zu finden.

Die angereicherten β -Casein- und β -LG-Fraktionen wurden mit Trypsin, Pepsin und Alcalase mit Hydrolysezeiten von 5-60 Minuten hydrolysiert. Die Hydrolyse von β -Casein mit Trypsin führte bereits nach 5 Minuten zu einem vollständigen Abbau von β -Casein, es war nicht mehr detektierbar. Die Peptide der Trypsin-Hydrolysate haben einen eher hydrophilen Charakter, während die Hydrolyse von β -Casein mit Pepsin zu einem schrittweisen Abbau von β -Casein und eher hydrophoben Peptiden führte, was mit der Literatur übereinstimmt (Dalgarrondo et al., 1995). Die Hydrolyse von β -Casein mit Alcalase führte ebenfalls zu hydrophoben Peptiden.

Die Hydrolyse der β -LG-Fraktion mit Trypsin führte zu Aggregatbildung, was auf Plasteinbildung hindeutet, die Ergebnisse anderer Autoren werden damit bestätigt (Creusot et al., 2006). Das Hydrolysat hat keinen besonders hydrophoben oder hydrophilen Charakter. Die Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Pepsin zeigt, dass natives β -Lactoglobulin weitgehend unempfindlich gegenüber Pepsin ist, es ist auch nach längster Hydrolysedauer (60 Minuten) noch β -Lactoglobulin zu detektieren. Nur hitzegeschädigtes β -Lactoglobulin unterliegt der Hydrolyse. Die dabei entstandenen Peptide zeigen einen eher hydrophoben Charakter. Die Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Alcalase führte ebenfalls zu Aggregatbildung, die auch in der Literatur auf Plasteinbildung zurückgeführt wird (Doucet et al., 2003). Mit zunehmender Hydrolysezeit entstehen weniger Aggregate und mehr Peptide, die einen eher hydrophoben Charakter besitzen.

Das Ergebnis der sensorischen Prüfung der Proteinfractionen und der –hydrolysate zeigt, dass bis auf das Retentat der Ultrafiltration von chymotryptischem Hydrolysat (NMWCO = 10.000 g/mol) keine Fraktion negative Geschmackseindrücke hervorrief. Das genannte Retentat rief bei den Prüfern bittere und umami-Geschmackseindrücke hervor, die bei dem Einsatz des Hydrolysates ins Lebensmittel negativ hervortreten könnten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur **Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften fraktionierter und enzymatisch modifizierter Milchproteine** sind in Tabelle 60 zusammengefasst. Die Charakterisierung wurde anhand der Aufschlagfähigkeit der Lösungen (Parameter Overrun) und Stabilität der Schäume (Parameter Drainage, Blasendurchmesser) vorgenommen. Der Zusammenhang der Oberflächenspannung der Lösungen mit den Schaumbildungseigenschaften wurde untersucht.

Die Aufschlagfähigkeit des nativen Caseinkonzentrats aus der Mikrofiltration wurde in den vorliegenden Versuchen als deutlich erhöht gegenüber rekonstituierter Magermilch gemessen. Natives Caseinkonzentrat enthält micellares Casein wie Magermilchpulver und es enthält auch Reste an Molkenproteinen (ca. 5%). Die Oberflächenspannung und die

Schaumstabilität sind im Vergleich zu rekonstituierter Magermilch gleich. Im Vergleich zu Natriumcaseinat besitzt das native Caseinkonzentrat höhere Aufschlagfähigkeit und höhere Stabilität. Obwohl freie, nicht an Micellen gebundene Caseinmoleküle als flexibler und grenzflächenaktiver gelten (Borcherding, 2004), ist die Aufschlagfähigkeit des micellaren Casein vorhanden. Da nur wenige mg Protein pro m² Grenzfläche (2-37 mg Milchprotein/m², Dickinson, 2003; Borcherding, 2004) benötigt werden, könnten auch einzelne Casein- und Molkenprotein-Moleküle an der Grenzflächenbildung und der Stabilisierung beteiligt sein.

Die α_s - β - κ -Caseinfraktion aus Labcasein zeigt eine geringere Aufschlagfähigkeit als rekonstituierte Magermilch, die Oberflächenspannung und Schaumstabilität waren vergleichbar (vgl. Tab. 60). Die β -Caseinfraktion aus Labcasein zeigt eine verringerte Oberflächenspannung, gar keine Aufschlagfähigkeit und Schaumstabilität. Durch Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit β -Casein aus Labcasein wird die Aufschlagfähigkeit mit zunehmender β -Casein-Anreicherung geringer, die Stabilität nimmt ab. β -Casein gilt als das grenzflächenaktivste Casein, da es eine höhere Flexibilität durch die lineare Struktur besitzt (Graham und Phillips, 1976, Darewicz et al., 2000). Die Stabilität der Schäume aus β -Casein wird als niedriger als anderer Caseine eingeschätzt (Kinsella, 1981). Das β -Casein aus der Anreicherung durch Mikrofiltration entspricht in den Schaumbildungseigenschaften den Ergebnissen der Literatur, es zeigt erhöhte Aufschlagfähigkeit mit deutlich verringerter Stabilität gegenüber rekonstituierter Magermilch. Während das β -Casein aus der Mikrofiltration seine native Form und damit die Flexibilität und Grenzflächenaktivität behalten hat, wurde das β -Casein aus Labcasein möglicherweise durch die Prozessführung (Auflösen von Labcasein bei pH 9,0, 60°C, 2h) geschädigt. Die Verringerung der Alanin- und Lysin-Konzentration gibt einen Hinweis auf die Schädigung.

Das Molkenproteinkonzentrat aus der Mikrofiltration von Magermilch zeigte gegenüber Molkenproteinisolat eine deutlich verringerte Oberflächenspannung, die Aufschlagfähigkeit war leicht erhöht ebenso wie die Stabilität (vgl. Tab. 60). Die in annähernd nativer Form verbliebenen Molkenproteine sind keiner thermischen Behandlung mit hohen Temperaturen während der Prozessführung unterlegen gewesen. Generell wirkt sich bei Molkenproteinen eine Erhitzung positiv auf die Schaumbildungseigenschaften aus (Shon und Haque, 2007), die nur durch Mikro- und Ultrafiltration aufkonzentrierten Molkenproteine scheinen bei dem hier verwendeten Aufschäumverfahren die Schäume jedoch auch ohne Hitzebehandlung besser stabilisieren zu können.

Die Molkenproteinfraktionen aus Molkenproteinisolat unterschieden sich in Ihren Eigenschaften kaum vom Ausgangsmaterial (vgl. Tab. 60). Zurückzuführen ist die geringe Veränderung der Schaumbildungseigenschaften darauf, dass sowohl im Ausgangsmaterial als auch in den Fraktionen (β -Lactoglobulin-Fraktion einerseits und α -LA-/BSA-/IG-Fraktion andererseits) β -Lactoglobulin das Hauptprotein ist. Durch die Anreicherung wurde in der α -LA-/BSA-/IG-Fraktion zwar der Anteil verringert, es hat jedoch nach wie vor den größten Anteil.

NPN-Fractionen sollen aufgrund der Peptide und Aminosäuren, die dieser Fraktion zugeordnet werden, die Oberflächenspannung herabsetzen (Haque, 1993; Caessens, 1999) und somit zu einer Veränderung der Schaumbildungseigenschaften beitragen. Die Oberflächenspannung der NPN-Fraktion aus der Anreicherung mittels Ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol) ist sehr gering im Vergleich zu rekonstituierter Magermilch. Die Fraktion lässt sich

jedoch nicht aufschlagen, sie bildet keinen Schaum aus, dieses Ergebnis wird in der Literatur bestätigt (Haque, 1993; Damodaran und Paraf, 1997; Dale und Young, 1992). Die Zugabe von Harnstoff in zunehmender Konzentration zu rekonstituierter Magermilch führte zu verringerter Aufschlagfähigkeit und leicht verringerter Stabilität, die Oberflächenspannung blieb unbeeinflusst. Ein Zusammenhang zwischen geringerer Oberflächenspannung und verbesserten Schaumbildungseigenschaften war nicht nachweisbar.

Die Vernetzung durch Transglutaminase führte bei allen Milchproteinen (Magermilchpulver, Natriumcaseinat, Molkenproteinkonzentrat) zu verringerter Aufschlagfähigkeit. Die Oberflächenspannung wurde durch vernetztes Natriumcaseinat und Molkenprotein leicht abgesenkt, die Schaumstabilitätsveränderung war bei allen vernetzten Proteinen verschieden. Eine Erhöhung gegenüber dem Ausgangsmaterial wurde nur durch vernetztes Natriumcaseinat erreicht, dessen Ausgangsmaterial kaum Stabilität besaß. Eine generelle Stabilitätszunahme durch die höhere Molmasse und die Eliminierung von Aminosäureresten durch die Quervernetzung, wie von Yildirim et al. (1996) beschrieben, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Die Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate aus Molkenproteinisolat sind im Vergleich zum Ausgangsmaterial unverändert (Stabilität) oder verringert (Aufschlagfähigkeit). Die Anreicherung der Hydrolysate in rekonstituierter Magermilch und in Vollmilch führte zu verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit. Durch die tryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat wurden vornehmlich Peptide mit Molmassen <14.000 g/mol erzeugt, die in allen vier Fraktionen (Permeate und Retentate der Ultrafiltrationen mit NMWCO 10.000 und 5.000 g/mol) detektierbar sind, sie haben keinen besonders hydrophoben oder hydrophilen Charakter. Durch das gleichzeitige Vorkommen von Peptiden und Proteinen kommt es zu einer erhöhten Aufschlagfähigkeit gegenüber den Ausgangsmaterialien, die auf die schnellere Grenzflächenstabilisierung durch Peptide in Zusammenspiel mit den Proteinen zurückzuführen ist (Caessens, 1999a).

Die chymotryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat führte zu einer verbesserten Aufschlagfähigkeit der Hydrolysate im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Der Einsatz der Retentat- und Permeatfraktion nach Ultrafiltration mit einer Trenngrenze von 10.000 g/mol in rekonstituierter Magermilch führte zu stabileren Schäumen bei gleichbleibendem oder geringfügig verbessertem Overrun. In Vollmilch führte der Zusatz der Permeatfraktion der UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol oder einer der beiden Fraktionen der UF mit einem NMWCO von 5.000 g/mol zu verbesserter Stabilität der Schäume, d.h. alle Fraktionen mit Peptiden mit Molmassen <14.000 g/mol. Offensichtlich wurden die Milchproteine an der Grenzfläche durch die Peptide mit Molmassen von <14.000 g/mol in besonderem Masse stabilisiert. Vergleichbare Studien sind in der Literatur nicht beschrieben.

Tab. 60: Zusammenfassung der Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und –hydrolysaten; Veränderung der Parameter Aufschlagfähigkeit, Oberflächenspannung und Stabilität gegenüber dem Standard (↑↑ = starke Zunahme, ↑ = leichte Zunahme, → = keine Veränderung, ↓ = leichte Abnahme, ↓↓ = starke Abnahme)

Betrachtetes System	Aufschlagfähigkeit (Overrun)	Oberflächenspannung	Stabilität (Drainage)
Zunehmende Proteinkonzentration von rek. MM	↓	→	↑
Caseinkonzentrat aus MF	↑↑	→	→
α _s -/ p-κ-Casein	↓	→	→
β-Casein-Fraktion	↓↓	↓	↓↓
Anreicherung von β-CF in rek. MM	↓↓	→	↓
β-CF aus MF	↑	↓	↓↓
Molkenproteinkonzentrat aus MF	↑	↓	↑
α-LA, BSA und IG-Fraktion	↓	→	→
β-LG-Fraktion	↓	↓	→
BSA	↓	↑	→
NPN-Substanzen	↓↓	↓↓	↓↓
Harnstoff in rek. MM	↓	→	↓
Magermilchpulver TG-vernetzt	↓	→	↓↓
Natriumcaseinat TG-vernetzt	↓	↓	↑
Molkenproteinkonz. TG-vernetzt	↓	↓	→
Trypt. Hydrolysat von MPI	↓	→↓	→
Anreicherung von rek. MM	↑	↓	↓
Anreicherung von Vollmilch	↑	↑	→
Chymotr. Hydrolyse von MPI	↑	↓	→
Anreicherung von rek. MM:			
• Perm. Sprüh + Permeat u. Retentat NMWCO 5.000 g/mol	→	→	→
• Permeat + Retentat NMWCO 10.000 g/mol	→	→	↑
Anreicherung von Vollmilch	→	→/↑	→
• Permeat sprüh	→	↑	↑
Trypt. Hydrolysat β-CF	→	↓↓/↓	→
Pept. Hydrolysat β-CF			
• 5 bis 15 Minuten Hydrolyse	↑	↓	↓
• 30 bis 60 Minuten Hydrolyse	→	↓	→
Hydrolysat β-CF Alcalase	→	↓	→
Trypt. Hydrolysat β-LGF			
• 5-30 Minuten Hydrolyse	↑↑/↑	→	↑
• 60 Minuten Hydrolyse	↑	→	↓
Pept. Hydrolysat β-LGF			
• 5 Minuten Hydrolyse	↑↑	→	→
• 15 bis 60 Minuten Hydrolyse	↑↑	→	↑↑
Hydrolysat β-LGF Alcalase	↑/↑↑	↓	↑
MO-Hydrolysat der rek. Magermilch	↑	↓↓	↓

Peptische Hydrolysate von β -Casein bilden, im Gegensatz zum Ausgangsmaterial, nach limitierter Hydrolyse (5-15 Minuten) Schäume aus. Die beiden peptischen Hydrolysate zeigten sogar erhöhte Aufschlagfähigkeit gegenüber rekonstituierter Magermilch. Durch die Prozessführung der Auflösung des β -Casein aus Labcasein scheinen die Proteine besonders im Bereich der hydrophoben Gruppen beschädigt, so dass die Schaumbildungseigenschaften auch nach der Hydrolyse unverändert schlecht sind. Die Oberflächenspannung fast aller Hydrolysate war gegenüber der des Ausgangsmaterials abgesenkt. Die Verringerung der Oberflächenspannung kann auch bei den β -Casein-Hydrolysaten nicht mit einer Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften in Zusammenhang gebracht werden. Die beiden peptischen Hydrolysate, die Schaum ausbildeten, zeigten geringfügig herabgesetzte Oberflächenspannungen (Δ 4-5 mN/m). Die Schaumbildungseigenschaften von tryptischen, peptischen und Alcalase-Hydrolysaten von β -Casein sind in der Literatur nicht beschrieben.

Die Hydrolysate aus β -Lactoglobulin zeigten gegenüber dem Ausgangsmaterial eine deutlich erhöhte Aufschlagfähigkeit. Die Verbesserung der Aufschlagfähigkeit wird auf die Verknüpfung von Disulfid-Brücken zwischen Peptiden und Proteinen zurückgeführt (Caessens, 1999a), da β -Lactoglobulin in allen Fraktionen noch vorhanden ist, was auf die weitgehende Resistenz von β -Lactoglobulin gegenüber Pepsin zurückzuführen ist. Eine limitierte Hydrolyse (5 Minuten) der β -Lactoglobulin-Fraktion mit Pepsin führt zu einer Erhöhung der Aufschlagfähigkeit und Stabilisierung des Schaums. Die Drainage nimmt um mehr als 50% ab. Das peptische Hydrolysat aus der β -Lactoglobulin-Fraktion mit einer Hydrolysedauer von 5 Minuten scheint sowohl schaumbildende als auch schaumstabilisierende Eigenschaften zu besitzen, die weiter untersucht werden sollten. Erhöhte Aufschlagfähigkeit wurde von Konrad et al. (2005a und 2005b) bei peptischen Hydrolysaten von hitzegeschädigtem reinem β -Lactoglobulin ebenfalls festgestellt, die Stabilität war in den hier beschriebenen Versuchen jedoch höher.

Die Inkubation von rekonstituierter Magermilch mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* führte zu verbesserter Aufschlagfähigkeit und verringerter Stabilität. Die Oberflächenspannung der Suspension, in der sich auch die Milchsäureproduzierenden Organismen befanden, wurde deutlich abgesenkt. Vergleichbare Ergebnisse sind in der Literatur nicht beschrieben.

Die Auswirkungen der Hydrolyse von Milchproteinen auf deren Schaumbildungseigenschaften sind abhängig von den Eigenschaften des Ausgangsmaterials, vom Enzym und dem Anteil unbeschädigten Proteinmaterials. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich durch das Zusammenspiel von Peptiden und Proteinen an der Grenzfläche die Schaumbildungseigenschaften sowohl hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit als auch hinsichtlich der Stabilität verbessern lassen. Ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Absenkung der Oberflächenspannung und der Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Der Einsatz von Hydrolysaten in Milch zeigt, dass eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften durch den Einsatz von Hydrolysaten möglich ist und dass das Zusammenspiel von intakten Milchproteinen und Peptiden aus Milchproteinen weiter untersucht werden sollte, um Produkte zu entwickeln, deren Schaumbildungseigenschaften denen von Milch überlegen sind.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung von Proteinfractionen mit Lebensmittelqualität im Technikummaßstab, die enzymatische Modifizierung von Proteinen durch Hydrolyse und Quervernetzung sowie die Charakterisierung der so gewonnenen Milchproteinfractionen und -hydrolysate.

Die **Fraktionierung von Milchproteinen** in Lebensmittelqualität erfolgte im Technikummaßstab. Aus Magermilch wurde mittels Mikrofiltration (nominale Trenngrenze 0,1 μm) micellares Caseinkonzentrat im Retentatstrom gewonnen, das nur geringe Reste Molkenprotein enthält (ca. 5 %). Die im Permeatstrom gewonnene Molkenproteinfraction wurde mittels Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol) aufkonzentriert, sie enthielt bis zu 93% Molkenprotein. Aus Labcasein wurde im Technikummaßstab durch Säure-Lauge-Behandlung und Temperatur-Veränderungen einerseits eine angereicherte β -Casein-Fraction mit einer Reinheit von 78% und andererseits eine α_s - β - κ -Casein-Fraction gewonnen. Durch die Prozessführung lag das β -Casein nicht mehr in nativer Form vor. In nativer Form lag β -Casein nach der Fraktionierung mittels Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol) bei 0-4°C vor, die Ausbeute war jedoch zu gering, um technologisch nutzbare Mengen herzustellen (Ausbeute β -Casein 14%). Zur Fraktionierung von Molkenproteinen wurde im Technikummaßstab aus Molkenproteinisolat einerseits eine β -Lactoglobulin-angereicherte Fraction (ca. 98% β -Lactoglobulin) und andererseits eine β -Lactoglobulin abgereicherte Fraction gewonnen, die an α -Lactalbumin, BSA und IG angereichert war. Aus Magermilch wurde mittels Ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol) eine NPN-angereicherte Fraction hergestellt.

Die **Hydrolyse von Milchproteinen** wurde an Molkenproteinisolat mit Trypsin und Chymotrypsin im Technikummaßstab durchgeführt, die Hydrolysate wurden mittels Ultrafiltration (NMWCO 10.000 und 5.000 g/mol) in Fractionen getrennt und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie und HPLC charakterisiert. Die Charakterisierung mittels FPLC ergab, dass durch die Hydrolyse von Molkenproteinisolat mittels Trypsin Peptide entstanden sind, die sich durch die Ultrafiltration mit Trenngrenzen von 10.000 und 5.000 g/mol nicht in Fractionen mit Peptiden unterschiedlicher Größen unterteilen lassen. Alle Fractionen (Retentate und Permeate der UF mit NMWCO von 10.000 und 5.000 g/mol) zeigen auf dem FPLC-Chromatogramm ähnliche Peptidmuster, da die entstandenen Peptide geringe Molmassen haben. Im Gegensatz dazu konnten die Hydrolysate aus Molkenproteinisolat mittels Chymotrypsin durch Ultrafiltration (NMWCO 10.000 und 5.000 g/mol) in Fractionen mit unterschiedlichen Molmassenverteilungen getrennt werden.

Die angereicherten β -Casein- und β -Lactoglobulin-Fractionen wurden mit Trypsin, Pepsin und Alcalase im Labormaßstab hydrolysiert und anschließend charakterisiert. Die Hydrolyse von β -Casein mit Trypsin führte zu eher hydrophilen Peptiden während die Hydrolyse von β -Casein mit Pepsin und Alcalase zu Hydrolysaten mit eher hydrophobem Charakter führten. Die Hydrolyse von β -Lactoglobulin mit Trypsin und Alcalase führte zu Aggregaten, die mit zunehmender Hydrolysezeit abgebaut werden. Die Hydrolysate aus β -Lactoglobulin mit Alcalase hatten einen eher hydrophoben Charakter, die tryptischen Hydrolysate zeigten weder besonders hydrophile noch besonders hydrophobe Eigenschaften. β -Lactoglobulin ist gegenüber Pepsin weitgehend hydrolyseresistent, nur durch die Prozessführung geschädigte Proteine wurden hydrolysiert, das Hydrolysat hatte eher hydrophoben Charakter.

Die **Schaumbildungseigenschaften der Milchproteinfraktionen und –hydrolysate** wurden an einem Messplatz zur Charakterisierung von Milchsäumen mittels der Aerationmethode, der sich durch die geringe mechanische Energie, die eingebracht wird, auszeichnet, geprüft. Es wurden gute Schaumbildungseigenschaften beim micellaren Casein, die sowohl durch das micellare Casein wie auch die verbliebenen Molkenproteine (ca. 5%) verursacht werden, festgestellt.

Die α_S - β - κ -Caseinfraktion aus Labcasein zeigte eine geringere Aufschlagfähigkeit als rekonstituierte Magermilch, die Oberflächenspannung und Schaumstabilität waren vergleichbar. Die β -Caseinfraktion aus Labcasein zeigt eine verringerte Oberflächenspannung, gar keine Aufschlagfähigkeit und Schaumstabilität. Durch Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit β -Casein aus Labcasein wird die Aufschlagfähigkeit mit zunehmender β -Casein-Anreicherung geringer, die Stabilität nimmt ab. Das β -Casein aus der Anreicherung durch Mikrofiltration entspricht in den Schaumbildungseigenschaften den Ergebnissen der Literatur, es zeigt erhöhte Aufschlagfähigkeit mit deutlich verringerter Stabilität gegenüber rekonstituierter Magermilch. Die Verringerung der Alanin- und Lysinkonzentration gibt einen Hinweis auf die Schädigung.

Das Molkenproteinkonzentrat aus der Mikrofiltration von Magermilch zeigte gegenüber Molkenproteinisolat eine deutlich verringerte Oberflächenspannung, die Aufschlagfähigkeit war leicht erhöht ebenso wie die Stabilität.

Die Molkenproteinfraktionen aus Molkenproteinisolat unterschieden sich in Ihren Eigenschaften kaum vom Ausgangsmaterial. Zurückzuführen ist die geringe Veränderung der Schaumbildungseigenschaften darauf, dass sowohl im Ausgangsmaterial als auch in den Fraktionen (β -Lactoglobulin-Fraktion einerseits und α -LA-/BSA-/IG-Fraktion andererseits) β -Lactoglobulin das Hauptprotein ist. Durch die Anreicherung wurde in der α -LA-/BSA-/IG-Fraktion zwar der Anteil verringert, es hat jedoch nach wie vor den größten Anteil.

Die Oberflächenspannung der NPN-Fraktion aus der Anreicherung mittels Ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol) ist sehr gering im Vergleich zu rekonstituierter Magermilch. Die Fraktion lässt sich jedoch nicht aufschlagen, sie bildet keinen Schaum aus. Die Zugabe von Harnstoff in zunehmender Konzentration zu rekonstituierter Magermilch führte zu verringerter Aufschlagfähigkeit und leicht verringerter Stabilität, die Oberflächenspannung blieb unbeeinflusst.

Die Vernetzung durch Transglutaminase führte bei allen Milchproteinen (Magermilchpulver, Natriumcaseinat, Molkenproteinkonzentrat) zu verringerter Aufschlagfähigkeit. Die Oberflächenspannung wurde durch vernetztes Natriumcaseinat und Molkenprotein leicht abgesenkt, die Schaumstabilitätsveränderung war bei allen vernetzten Proteinen verschieden. Eine Erhöhung gegenüber dem Ausgangsmaterial wurde nur durch vernetztes Natriumcaseinat erreicht, dessen Ausgangsmaterial kaum Stabilität besaß.

Die Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate aus Molkenproteinisolat sind im Vergleich zum Ausgangsmaterial unverändert (Stabilität) oder verringert (Aufschlagfähigkeit). Die Anreicherung der Hydrolysate in rekonstituierter Magermilch und in Vollmilch führte zu verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit. Durch die tryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat wurden vornehmlich Peptide mit Molmassen <14.000 g/mol

erzeugt, die in allen vier Fraktionen (Permeate und Retentate der Ultrafiltrationen mit NMWCO 10.000 und 5.000 g/mol) detektierbar sind, sie haben keinen besonders hydrophoben oder hydrophilen Charakter.

Die chymotryptische Hydrolyse von Molkenproteinisolat führte zu einer verbesserten Aufschlagfähigkeit der Hydrolysate im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Der Einsatz der Retentat- und Permeatfraktion nach Ultrafiltration mit einer Trenngrenze von 10.000 g/mol in rekonstituierter Magermilch führte zu stabileren Schäumen bei gleichbleibenden oder geringfügig verbessertem Overrun. In Vollmilch führte der Zusatz der Permeatfraktion der UF mit einem NMWCO von 10.000 g/mol oder einer der beiden Fraktionen der UF mit einem NMWCO von 5.000 g/mol zu verbesserter Stabilität der Schäume, d.h. alle Fraktionen mit Peptiden mit Molmassen <14.000 g/mol verbesserten die Schaumstabilität.

Peptische Hydrolysate von β -Casein bilden nach limitierter Hydrolyse (5-15 Minuten) im Gegensatz zu allen anderen β -Casein-Hydrolysaten (30-60 Minuten Hydrolyse mit Pepsin, 5-60 Minuten mit Trypsin oder Alclase) Schäume aus. Die beiden peptischen Hydrolysate zeigten erhöhte Aufschlagfähigkeit gegenüber rekonstituierter Magermilch. Die Oberflächenspannung fast aller Hydrolysate war gegenüber der des Ausgangsmaterials abgesenkt. Für die beiden peptischen Hydrolysate, die Schaum ausbildeten, wurden geringfügig herabgesetzte Oberflächenspannungen (um 4-5 mN/m) ermittelt.

Die Hydrolysate aus β -Lactoglobulin zeigten gegenüber dem Ausgangsmaterial eine deutlich erhöhte Aufschlagfähigkeit. Eine limitierte Hydrolyse (5 Minuten) der β -Lactoglobulin-Fraktion mit Pepsin führt zu einer Erhöhung der Aufschlagfähigkeit und Stabilisierung des Schaums. Die Drainage nimmt um mehr als 50% ab.

Die Inkubation von rekonstituierter Magermilch mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* führte zu verbesserter Aufschlagfähigkeit und verringerter Stabilität. Die Oberflächenspannung der Suspension, in der sich auch die Milchsäureproduzierenden Organismen befanden, wurde deutlich abgesenkt.

Die Auswirkungen der Hydrolyse von Milchproteinen auf deren Schaumbildungseigenschaften sind abhängig von den Eigenschaften des Ausgangsmaterials, vom Enzym und dem Anteil unbeschädigten Proteinmaterials. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich durch das Zusammenspiel von Peptiden und Proteinen an der Grenzfläche die Schaumbildungseigenschaften sowohl hinsichtlich der Aufschlagfähigkeit als auch hinsichtlich der Stabilität verbessern lassen. Ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Absenkung der Oberflächenspannung und der Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Der Einsatz von Hydrolysaten in Milch zeigt, dass eine Verbesserung der Schaumbildungseigenschaften durch den Einsatz von Hydrolysaten möglich ist und dass das Zusammenspiel von intakten Milchproteinen und Peptiden aus Milchproteinen weiter untersucht werden sollte, um Produkte zu entwickeln, deren Schaumbildungseigenschaften denen von Milch überlegen sind.

7. Summary

The aim of this work was the production of food-grade protein fractions in pilot plant scale, the enzymatic modification of proteins by hydrolysis and crosslinking and the characterisation of the resulting milk protein fractions and hydrolysates.

The **fractionation of food grade milk proteins** was conducted in pilot plant scale. With microfiltration (nominal cut-off 0,1 μm) of skim milk a micellar casein concentrate was extracted in the retentate containing only small amounts of whey proteins (about 5%). In the permeate a whey protein concentrate was purified and concentrated via ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol), it consisted of about 93% whey proteins. From renneted casein an enriched β -casein-fraction (78% β -casein) on the one hand and an enriched α_s -/ ρ - κ -casein-fraction on the other hand was isolated using acid-base-treatment and temperature changes. The process led to a β -casein, that was not in the native form anymore. The β -casein isolated by ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol) at cold temperatures (0-4°C) was in its native form but the yield was too small for technological use (yield of β -casein 14%). The fractionation of whey proteins in pilot plant scale was carried out using whey protein isolate. On the one hand a β -lactoglobulin rich fraction containing 98% β -lactoglobulin and on the other hand an enriched fraction of α -lactalbumin, BSA and IG was isolated. An NPN-enriched fraction was extracted via ultrafiltration of skim milk with an NMWCO of 5.000 g/mol.

The **hydrolysis of milk proteins** was examined incubating whey protein isolate in pilot plant scale with the enzymes trypsin and α -chymotrypsin. The hydrolysates were fractionated by means of ultrafiltration (NMWCO 10.000 and 5.000 g/mol) and characterised using size exclusion chromatography (FPLC) and HPLC. FPLC analysis characterised the resulting peptides of the hydrolysis of whey protein isolate with trypsin by molar masses below 14.000 g/mol. The fractions of the ultrafiltrations (NMWCO 10.000 and 5.000 g/mol) showed similar peptide patterns in the FPLC-chromatograms. In contrast, the hydrolysate of whey protein isolate with chymotrypsin was separated into fractions with different peptide patterns by ultrafiltration (NMWCO 10.000 and 5.000 g/mol).

The enriched β -casein and β -lactoglobulin-fractions were hydrolysed with trypsin, pepsin and alcalase and subsequently characterised. The hydrolysis of β -casein with trypsin led to more hydrophilic peptides while the hydrolysis of β -casein with pepsin and alcalase resulted in hydrolysates with more hydrophobic character. The hydrolysis of β -casein with alcalase and trypsin led to aggregates that were degraded with increasing time of hydrolysis. The hydrolysates of β -lactoglobulin with alcalase had a more hydrophobic character, the tryptic hydrolysates showed neither hydrophilic nor hydrophobic attributes. β -lactoglobulin is widely resistant to peptic hydrolysis, only heat-damaged proteins were hydrolysed to more hydrophobic hydrolysates.

The **foaming characteristics of milk protein fractions and hydrolysates** were assessed with a measuring station via an aeration method, that is outstanding for the minor mechanical energy that is inserted. The characterisation of the foaming abilities showed good results for micellar casein, that could be caused by micellar casein as well as by remaining whey proteins (about 5%).

The α_s - β - κ -casein-fraction from renneted casein showed smaller foam forming ability than that from reconstituted skim milk, surface tension and foam stability were similar. The β -casein-fraction from renneted casein showed decreased surface tension and no foam forming ability and foam stability. The enrichment of β -casein from renneted casein in reconstituted skim milk showed decreasing foam forming ability and foam stability with increasing β -casein content. The β -casein from the enrichment via microfiltration correlated in the foaming abilities those in the literature. It showed increased foam forming ability while the foam stability was less than that of reconstituted skim milk. Whilst the β -casein from microfiltration maintained its native conformation, flexibility and surface activity, β -casein from renneted casein was possibly changed during processing (dissolving parameters: pH 9,0, temperature 60°C, for two hours). The decrease in the amounts of alanin and lysin are indicators of the damage of β -casein from renneted casein.

Whey protein concentrate from microfiltration of skim milk showed a considerably decreased surface tension, foam forming ability was slightly increased as well as foam stability.

Whey protein fractions from whey protein isolate showed only small differences in the foam forming abilities in relation to the raw material. This due to the aspect, that in the raw material and the fraction (β -lactoglobulin-fraction on the one hand and α -LA-/BSA-/IG-fraction on the other hand) the main protein is β -lactoglobulin. The enrichment of β -lactoglobulin in the β -LG-fraction lowered the amount of β -lactoglobulin in the α -LA-/BSA-/IG-fraction but it is still the dominant fraction.

The surface tension of the NPN-fraction from the enrichment via ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol) is very small in comparison to reconstituted skim milk. The fraction could not be whipped at all, it did not form foam. The addition of increasing amounts of urea led to decreased foam forming ability and slightly lowered foam stability, not influencing the surface tension.

Crosslinking proteins by transglutaminase led to decreased foam forming ability of all milk proteins (skim milk powder, sodium caseinate, whey protein concentrate). The surface tension was slightly lowered in crosslinked sodium caseinate and whey protein concentrate, the foam stability of the three proteins was different. An increase compared to the raw material was achieved with sodium caseinate, whose raw material showed very little foam stability.

Foam forming abilities tryptic hydrolysates from whey protein isolate were unchanged (foam stability) or decreased (foam forming ability). The enrichment of the tryptic hydrolysates in skim milk and whole milk led to increased foam forming ability. The tryptic hydrolysis of whey protein isolate resulted in peptides with molar masses below 14.000 g/mol that were detectable in all four fractions (permeates and retentates of ultrafiltration with NMWCO 10.000 and 5.000 g/mol). The fractions had no special hydrophobic or hydrophilic character.

Chymotryptic hydrolysis of whey protein isolate led to increased foam forming abilities compared to the raw material. Adding the retentate and permeate fraction after ultrafiltration with a NMWCO of 10.000 g/mol to reconstituted milk led to stronger foams while the overrun was similar or slightly better. The enrichment of whole milk with the permeate fraction of ultrafiltration with an NMWCO of 10.000 g/mol or one of the fractions of the ultrafiltration with an

NMWCO of 5.000 g/mol led to increased foam stability. That means all fractions with molar masses below 14.000 g/mol increased the foam stability.

Peptic hydrolysates of β -casein with limited hydrolysis (5-15 minutes) formed foams in contrast to all other hydrolysates of β -casein with pepsin, trypsin or alcalase. The surface tension of almost all hydrolysates was lowered in relation to the raw material. Foam forming peptic hydrolysates had only slightly lowered surface tensions.

In comparison to the raw material the hydrolysates of β -lactoglobulin showed increased foam forming abilities. A limited peptic hydrolysis (5 min) of the β -lactoglobulin-fraction led to an increase in the foam forming ability and the foam stability. The drainage decreased by more than 50%.

The incubation of reconstituted skim milk with *Lactococcus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* led to increased foam forming abilities and decreased foam stability. The surface tension of the suspension containing the microorganisms as well was lowered.

The effects of the hydrolysis of milk proteins on the foaming abilities depend on the characteristics of the raw material, the enzymatic treatment and the amount of unchanged protein material. The results of this work show, that interactions of proteins and peptides at the air/water interface are able to increase foam forming abilities and foam stability. A correlation between the ability to decrease the surface tension and the foaming characteristics could not be observed. The application of hydrolysates to milk showed that increased foaming characteristics of milk can be achieved adding hydrolysates. The interaction of intact proteins and peptides of milk proteins should be further investigated to develop products with foaming characteristics superior to milk.

8. Literaturverzeichnis

- Adamson, N.J., Reynolds, E.C.:** Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 202-207 (1996).
- Alexander, L.J., Hayes, G. Pearse, M.J., Beattie, M.J., Stewart, A.F., Willis, I.M., Mackinlay, A.G.:** Complete sequence of the β -Lactoglobulin cDNA. *Nucleic Acids Research* **17** (16), 6739 (1989).
- Althouse, P.J., Dinakar, P. , Kilara, A.:** Screening of proteolytic enzymes to enhance foaming of whey protein isolates. *Journal of Food Science* **60** (5), 1110-1112 (1995).
- Ansbacher, S., Flanigan, G.E., Supplee, G.C.:** Certain foam producing substances of milk. *Journal of Dairy Science* **17**, 723-731 (1934).
- Bacher, T., Konigsfeldt, P.:** WPI by microfiltration of skim milk. *European Dairy Magazine* **5**, 14-16 (2000).
- Bals, A., Kulozik, U.:** Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus. *International Dairy Journal* **13**, 903-908 (2003).
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P.:** Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2001).
- Black, S.D., Mould, D. R.:** Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Analytical Biochemistry* **193**, 72-82 (1991).
- Borcherding, K.:** Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen. Dissertationsschrift. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2004).
- Bramaud, C., Aimar, P., Daufin, G.:** Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering* **56** (4), 391-397 (1997a).
- Bramaud, C., Aimar, P., Daufin, G.:** Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -Lactalbumin. *Lait* **77**, 411-423 (1997b).
- Britten, M., Lavoie, L.:** Foaming properties of proteins as affected by concentration. *Journal of Food Science* **57** (5): 1219-1222, 1241 (1992).
- Brody, E.P.:** Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* **84** (Suppl. 1), S39-S49 (2000).
- Bumberger, E., Belitz, H.-D.:** Bitter taste of enzymatic hydrolysates of casein. *Zeitschrift für Lebensmittelforschung und –untersuchung A* **197**, 14-19 (1993).

- Caessens, P.W.J.R., Gruppen, H., Visser, S., van Aken, G.A., Voragen, A.G.J.:** Plasmin hydrolysis of β -casein: foaming and emulsifying properties of the fractionated hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2935-2941 (1997).
- Caessens, P.W.J.R., Visser, S., Gruppen, H., Voragen, A.G.J.:** β -Lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin and *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2973-2979 (1999).
- Caessens, P.W.J.R.:** Enzymatic hydrolysis of β -casein and β -lactoglobulin. Foam and emulsion properties of peptides in relation to their molecular structure. *Dissertationschrift. Wageningen Agricultural University* (1999a).
- Campbell, G.M., Mougeot, E.:** Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 283-296 (1999).
- Cano-Ruiz, M.E., Richter, L.:** Effect of homogenation pressure on the milk fat globule membrane proteins. *Journal of Dairy Science* **80**, 2732-2739 (1997).
- Cheison, S.C., Wang, Z., Xu, S.-Y.:** Multivariate strategy in screening of enzymes to be used for whey protein hydrolysis in an enzymatic membrane reactor. *International Dairy Journal* **17**, 393-402 (2007).
- Chobert, J.-M., Bertrand-Harb, C., Dalgalarondo, M., Nicolas, M.-G.:** Solubility and emulsifying properties of β -Casein modified enzymatically by Trypsin. *Journal of Food Biochemistry* **13**, 335-352 (1989).
- Chobert, J.-M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M.-G.:** Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 883-892 (1988).
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F., Darton, R.C.:** Protein denaturation in foam. II. Surface activity and conformational change. *Journal of Colloid and Interface Science* **215**, 333-338 (1999).
- Corredig, M., Dalgleish, D.G.:** Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International* **29** (1), 49-55 (1996).
- Crawford, J.L., Lipscomb, W.N., Schellman, C.G.:** The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70** (2), 538-542 (1973).
- Creusot, N., Gruppen, H., van Koningsveld, G. A., De Kruif, C. G., Voragen, A. G. J.:** Peptide-peptide and protein-peptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate Hydrolysats. *International Dairy Journal* **16**, 840-849 (2006).

- Dale, C.J., Young, T.W.:** Low-molecular weight nitrogenous components and their influence on the stability of beer foam. *Journal of the institute of brewing* **98** (2), 123-127 (1992).
- Dalgalarrondo, M., Chobert, J.-M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C., Dumont, J.-P., Haertle, T.:** Characterization of bovine β -lactoglobulin B tryptic peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft* **45** (4), 212-216 (1990).
- Dalgalarrondo, M., Dufour, E., Chobert, J.-M., Bertrand-Harb, C., Haertlé, T.:** Proteolysis of β -lactoglobulin and β -casein by pepsin in ethynolic media. *International Dairy Journal* **5**, 1-14 (1995).
- Damodaran, S.:** Protein Stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science* **70** (3), 54-66 (2005).
- Darewicz, M., Dziuba, J., Caessens, P.W.J.R.:** Effect of enzymatic hydrolysis on emulsifying and foaming properties of milk proteins - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **9/50** (1), 3-8 (2000).
- Davies, D.T., Law, A.J.R.:** Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperatures. *Journal of Dairy Research* **50** (1), 67-75 (1983).
- Davis, J.P., Doucet, D., Foegeding, E.A.:** Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science* **288**, 412-422 (2005).
- De Koning, P.J., van Rooijen, P.J.:** Aspects of the formation of lysinoalanine in milk and milk products. *Journal of Dairy Research* **49**, 725-736 (1982).
- DeKruif, C.G., Holt, C.:** Casein micelle structure, functions and interactions. In: *Advanced dairy chemistry: 1. Proteins.* (Eds. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H.) pp. 233-276, Dritte Auflage, Kluwer Academic/Plenum, New York (2003).
- Dickinson, E.:** Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering* **22**, 59-74 (1994).
- Dickinson, E.:** Adsorbed protein layers at fluid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **15**, 161-176 (1999).
- Dickinson, E.:** Interfacial, emulsifying and foaming properties of milk proteins. In: *Advanced dairy chemistry: 1. Proteins.* (Eds. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H.) pp. 1229-1260 Dritte Auflage, Kluwer Academic/Plenum, New York (2003).
- DIN 10967-1:** Sensorische Prüfverfahren – Profilprüfung – Teil 1: Konventionelles Profil. Deutsches Institut für Normung e.v., Berlin (1999).
- Doucet, D., Otter, D.E., Gauthier, S.F., Foegeding, E.A.:** Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Peptide identification and determina-

- tion of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6300-6308 (2003).
- Downey, W.K., Murphy R.F.:** The temperature-dependent dissociation of β -casein from bovine casein micelles and complexes. *Journal of Dairy Research* **37**, 361-372 (1970).
- El-Rafey, M.S., Richardson, G.A.:** The role of surface-active constituents involved in the foaming of milk and certain milk products. II. Whey, skimmed milk, and their counterparts. *Journal of Dairy Science* **27** (1),19-31 (1944).
- Ezzat, N., El Soda, M., Bouillane, C., Zevaco, C., Blanchard, P.:** Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. *Milchwissenschaft* **40** (3) 140-143 (1985).
- Faist, V., Drusch, S., Kiesner, C., Elmadfa, I., Erbersdobler, H.F.:** Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl-chloride. *International Dairy Journal* **10**, 339-346 (2000).
- Flanagan, J., Gunning, Y., FitzGerald, R.J.:** Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat-stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Research International* **36**, 267-274 (2003).
- Foegeding, E.A., Luck, P.J., Davis, J.P.:** Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids* **20**, 284-292 (2006).
- Giardina, C., Pelizzola, V., Avalli, A., Iametti, S., Cattaneo, T.M.P.:** Functional properties of milk protein hydrolysate obtained by controlled enzymatic hydrolysis. *Milchwissenschaft* **59** (9/10), 476-479 (2004).
- Gottschalk, M.; Nilsson, H., Roos, H.; Halle, B.:** Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science* **12**, 2404-2411 (2003).
- Graham, D.E., Phillips, M.C.:** The conformation of proteins at the air-water interface and their role in stabilizing. In: *Foams* (Ed.: Akers, R.J.) pp. 237-253 in *Foams*. Academic Press, London (1976).
- Graham, D.E., Phillips, M.C.:** Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science* **70** (3),427-439 (1979).
- Groleau, P.E., Jimenez-Flores, R., Gauthier, S.F., Pouliot, Y.:** Fractionation of β -Lactoglobulin Tryptic Peptides by Ampholyte-Free Isoelectric Focusing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 578-583 (2002).
- Groleau, P. E., Morin, P., Gauthier, S. F., and Pouliot, Y.:** Effect of the physicochemical conditions on peptide-peptide Interactions in a tryptic hydrolysate of β -Lactoglobulin and identification of aggregating peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4370-4375 (2003).

- Guo, M.R., Fox, P.F., Flynn, A., Kindstedt, P.S.:** Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. *International Dairy Journal* **6**, 473-483 (1996).
- Haque, Z.H.:** Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: A Review. *Journal of Dairy Science* **76**, 311-320 (1993).
- Harwalker, V.R., Cholette, H., McKellar, R.C., Emmons, D.B.:** Relation between proteolysis and astringent off-flavor in milk. *Journal of Dairy Science* **76**, 2521-2527 (1993).
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L.:** Preparation of antioxidant hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 588-593 (2005).
- Hirs, C.H.W., Moore, S., Stein, W.H.:** Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry* **219**, 623-642 (1956).
- Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.:** Anreicherung von Milcheiweißfraktionen durch Mikrofiltration. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **58**, 41-51 (2006).
- Horne, D.S.:** Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 148-153 (2006).
- Huang, X.L., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E.:** Comparison of the size and rate of formation of peptides released by limited proteolysis of β -lactoglobulins A and B with immobilized trypsin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **42**, 1281-1284 (1994).
- Huang, X.L., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E.:** Improved emulsifying properties of β -barrel domain peptides obtained by membrane fractionation of a limited tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3437-3443 (1996).
- Huppertz, T., Hennebel, J.-B., Considine, T., Shakeel-ur-Rehman, Kelly, A.L., Fox, P. F.:** A method for the large-scale isolation of β -Casein. *Food Chemistry* **99** (1), 45-50 (2006).
- Jost, W., Boos, K.S.:** Phasensysteme. In: *Handbuch der HPLC. Teil 1 – Leitfaden für Anfänger und Praktiker* (Ed.: Unger, K.K.) pp. 60-76, GIT Verlag GMBH Darmstadt (1989).
- Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N., Kobayashi, K.:** Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry* **47** (1), 33-37 (1983).
- Kawai, Y., Tadokora, K., Monomi, R., Itoh, K., Saito, T., Kitazawa, H., Itoh, T.:** A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* **82**, 481-485 (1999).

- Kersten, M., Henrichs, J.:** "Native" Caseinkonzentrate durch Mikrofiltration. Deutsche Milchwirtschaft **51** (7), 312-315 (2000).
- Kilara, A., Panyam, D.:** Peptides from milk proteins and their properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **43** (6), 607-633 (2003).
- Kinsella, J.E.:** Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. Food Chemistry **4**, 273-288 (1981).
- Kinsella, J.E.:** Milk Proteins: physicochemical and functional properties. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition **21** (3), 197-262 (1984).
- Konrad, G., Kleinschmidt, Th., Rohenkohl, H., Reimerdes, E.H.:** Peptic partial hydrolysis of whey protein concentrate for modifying the surface properties of whey protein. I. Optimization of hydrolysis conditions. Milchwissenschaft **60** (1), 59-62 (2005a).
- Konrad, G., Kleinschmidt, Th., Rohenkohl, H., Reimerdes, E.H.:** Peptic partial hydrolysis of whey protein concentrate for modifying the surface properties of whey protein. II. Effects on the emulsifying and foaming properties. Milchwissenschaft **60** (2), 195-198 (2005b).
- Konrad, G., Lieske, B.:** Neues Verfahren zur technischen Isolierung von nativem β -Lactoglobulin aus Molke durch enzymatische Hydrolyse und Ultrafiltration. Deutsche Milchwirtschaft **13**, 479-480 (1997).
- Konrad, G., Lieske, B., Faber, W., Gorzki, D.:** Isolierung von nativem β -Lactoglobulin aus Molke. Deutsche Milchwirtschaft **52** (5), 200-204 (2001).
- Korhonen, H.:** Technology options for new nutritional concepts. International Journal of Dairy Technology **55** (2), 79-88 (2002).
- Korhonen, H., Pihlanto, A.:** Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins. Applied Biotechnology, Food Science and Policy **1** (3), 133-144 (2003).
- Laloi, P., Atlan, D., Blanc, B., Gilbert, C., Portalier, R.:** Cell-wall-Associated Proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. Applied Microbiology and Biotechnology **36**, 196-204 (1991).
- Le Magnen, C., and Maugas, J.-J.:** Method for obtaining beta casein. Assignee: Eurial - Parc Club du Parrey, France/ USA Patentnummern: FR2,663,637-A1; US5,397,577 (1991/1995).
- Leman J., Dolgan, T.:** Effects of heating and pressurization on foaming properties of β -lactoglobulin. Electronical Journal of Polish Agricultural Universities **7**, (2004).

- Lieske, B., Konrad, G.:** Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *International Dairy Journal* **6**, 13-31 (1996).
- Lindberg, T., Engberg, S., Sjöberg, L.B., Lönnerdal, B.:** In vitro digestion of proteins in human milk fortifiers and in preterm formula. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **27** (1), 30-36 (1998).
- Lönnerdal, B.:** Lactoferrin. In: *Advanced dairy chemistry: 1. Proteins.* (Eds. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H.) pp. 449-466. Dritte Auflage, Kluwer Academic/Plenum, New York (2003).
- Lorenzen, P.C.:** Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwissenschaft* **55** (12), 667-670 (2000a).
- Lorenzen, P.C.:** Verfahren zur Modifizierung von Milcheiweiß. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsbereiche* **52** (1), 47-59 (2000b).
- Lorenzen, P.C.:** Milchproteine als Hydrokolloide. Proceedings zum GDL-Symposium "Hydrokolloide V" vom 28.02.-01.03.03 in Bonn (2003).
- Lorenzen, P.C.:** Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. *Food Research International* **40**, 700-708 (2007).
- Lorenzen, P.C., Schlimme, E.:** Experimentelle Untersuchungen zum Vergleich der Enzym-induzierten Proteinaggregation (EIPA) und der Plastein-Reaktion an Natrium-Caseinat-proteolysaten. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **43** (1), 45-51 (1991).
- Lorenzen, P. C., Schlimme, E.:** Funktionelle und strukturelle Eigenschaft von Proteolysaten und Plasteinen aus UF-Magermilchkonzentrat. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **44**, 217-222 (1992a).
- Lorenzen, P. C., Schlimme, E.:** The plastein reaction: properties in comparison with simple proteolysis. *Milchwissenschaft* **47** (8), 499-504 (1992b).
- Lorient, D., Closs, B., Courthaudon, J.L.:** Surface properties of the bovine casein components: relationship between structure and foaming properties. *Journal of Dairy Research* **56**, 495-502 (1989).
- Lucena, M.E., Alvarez, S., Menéndez, C., Riera, F.A., Alvarez, R.:** α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. *Separation and Purification Technology* **52**, 446-453 (2007).
- Luck, P.J., Bray, N., Foegeding, E.A.:** Factors determining yield stress and overrun of whey protein foams. *Journal of Food Science* **67** (5), 1677-1681 (2001).

- Martin-Diana, A.B., Frías, J., Fontecha, J.:** Comparison of foaming capacity of caseinomacropeptide from different species with whey protein concentrate. *Milchwissenschaft* **61** (2), 134-138 (2006).
- Maubois, J.L., Fauquant, J., Famelart, M. H., Caussin, F.:** Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives. In: *The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition. Proceedings of the 3rd International Whey Conference Munich 2001.* pp. 59-71. B. Behr's Verlag, Hamburg (2001).
- Miao, W., Chongdong, F., Rongrong, X.:** The effects of transglutaminase on functional properties of casein in milk. *Journal of the Wuxi University of Light Industry* **21** (5), 499-502 (2002).
- Morato, A.F., Carreira, R.L., Junqueira, R.G., Silvestre, M.P.C.:** Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: Use of subtilisin and trypsin. *Journal of Food Composition and Analysis* **13**, 843-857 (2000).
- Moret, S., Cherunbin, S., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G.:** Determination of lysinoalanine by high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **17**, 827-830 (1994).
- Mota, M.V.T., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P., Rocha, C., Teixeira, J.A., Torres, D., Gonçalves, M.P.:** Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrates: Peptides HPLC profiles. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **27**, 2625-2639 (2004).
- Murphy, J.M., Fox, P.F.:** Fractionation of sodium caseinate by ultrafiltration. *Food Chemistry* **39** (1), 27-38 (1991).
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., Kilara, A.:** Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science* **61** (2), 270-274 (1996).
- Nielsen, P.M.:** Functionality of protein hydrolysates. In: *Food Proteins and their Applications* (Eds.: Damodaran, S. und Paraf, A.) pp. 443-472. Marcel Dekker Inc. New York (1997).
- Outinen, M., Tossavainen, O., Tupasela, T., Koskela, P., Koskinen, H., Rantamäki, P., Syväoja, E.-L., Antila, P., Kankare, V.:** Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.* **29** (8), 411-418 (1996).
- Patel, P.D., Stripp, A.M., Fry, J.F.:** Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. *International Journal of Food Science and Technology* **23**, 57-63 (1988).

- Pernell, C.W., Foegeding, E.A., Luck, P.J., Davis, J.P.:** Properties of whey and egg white protein foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **204**, 9-11 (2002).
- Pearce, R.J.:** Thermal separation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Australian Journal of Dairy Technology* **38**, 144-149 (1983).
- Pearce, R.J.:** Enriches whey protein fractions and method for the production thereof. Assignee: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia. Patentnummer: US5,455,331 (1995).
- Pélissier, J.P., Manchon, P.:** Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal of Food Science* **41** (2), 231-233 (1976).
- Phillips, M.C.:** 1981. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology* **35**, 50-57 (1981).
- Pierre, A., Brule, G.:** Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. *Journal of Dairy Research* **48**, 417-428 (1981).
- Pouliot, M., Pouliot, Y., Britten, M.:** On the conventional cross-flow microfiltration of skim milk for the production of native phosphocaseinate. *International Dairy Journal* **6**, 105-111 (1996).
- Pouliot, M., Pouliot, Y., Britten, M., Maubois, J.L., Fauquant, J.:** Study of the dissociation of β -Casein from native phosphocaseinate. *Lait* **74** (5), 325-332 (1994).
- Prins, A.:** Some physical aspects of aerated milk products. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40**, 203-215 (1986).
- Prins, A.:** Foam stabilizing by milk proteins. *Food Ingredients Europe: Conference proceedings*. Expoconsult Publishers, Maarssen, Niederlande, 82-85 (1991).
- Punidades, P., Rizvi, S.S.H.:** Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. *Food Research International* **31** (4), 265-272 (1998).
- Rantamäki, P., Tossavainen, O., Outinen, M., Tupasela, T., Koskela, P., Kaunismäki, M.:** Functional properties of the whey protein fractions produced in pilot scale processes. Foaming, water-holding capacity and gelation. *Milchwissenschaft* **55** (10), 569-572 (2000).
- Reddy, I.M., Kella, N.K.D., Kinsella, J.E.:** Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 737-741 (1988).
- Renner, S., Ömeroglu, S.:** Zur Methodik der Erfassung des Eiweißgehaltes und der Eiweißfraktionen in Milch. I. Wahrer Eiweißgehalt nach Kjeldahl, Kofrany, Formoltitration und

- refraktometrische Methode. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung **149** (5), 267-275 (1972).
- Roman, J.A., Sgarbieri, V.C.:** The hydrophilic, foaming and emulsifying properties of casein concentrates produced by various methods. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 609-617 (2006).
- Roos, N., Schrezenmeir, J.:** Fraktionierung und ernährungsphysiologische Bedeutung von Milchproteinen. *dmz - Deutsche Molkereizeitung* **14**, 26-29 (2006).
- Schlimme, E., Buchheim, W.:** Milch und ihre Inhaltsstoffe. Zweite überarbeitete Auflage. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen (1999).
- Schmelzer, C.E.H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R.H.H., Raith, K.:** Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *Journal of Chromatography A* **1055**, 87-92 (2004).
- Schmidt, D.G., Poll, J.K.:** Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **45**, 225-240 (1991).
- Sciancalepore, V., Longone, V.:** Plastein synthesis by the action of α -chymotrypsin on a peptic hydrolysate of whey protein. *Journal of Dairy Research* **55**, 547-550 (1988).
- Severin, S., Weshui, X.:** Enzymatic hydrolysis of caseins by two different proteases and their effect on functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Science, China* **27** (2), 64-71 (2006).
- Shon, J., Haque, Z.U.:** Functional attributes of native and thermized sour and sweet whey. *International Journal of Dairy Technology* **60** (2), 135-142 (2007).
- Silva, S.V., Malcata, F.X.:** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* **15**, 1-15 (2005).
- Singh, J., Sharma, D.K.:** Proteolytic breakdown of casein and its fraction by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **38** (3), 148-149 (1983).
- Singh, T.K., Young, N.D., Drake, M., Cadwallander, K.R.:** Produktion and sensory characterization of a bitter peptide from β -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1185-1189 (2005).
- Slattery, H., FitzGerald, R. J.:** Functional properties and bitterness of Sodium Caseinate hydrolysats prepared with a bacillus proteinase. *Journal of Food Science* **63** (3), 418-422 (1998).
- Spackmann, D.H., Stein, W.H., Moore, S.:** Automatic recording for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* **30**, 1190-1206 (1958).

- Sukan, G., Andrews, A.T.:** Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder. I. Protein hydrolysis and plastein formation. *Journal of Dairy Research* **49**, 265-278 (1982).
- Svendsen, I., Breddam, K.:** Isolation of amino acid sequence of a glutamic acid specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis*. *European Journal of Biochemistry* **204**, 165-171 (1992).
- Syvöja E.-L.:** Quantitative determination of the main casein components and purification of α_{S2} - and κ -casein from bovine milk. *Milchwissenschaft* **47** (9), 563-566 (1992).
- Tossavainen, O., Rantamäki, P., Outinen, M., Tupasela, T., Koskela, P.:** Functional properties of the whey protein fractions produced in pilot scale processes. *Milchwissenschaft* **53** (8), 453-458 (1998).
- Townsend, A.-A., Nakai, S.:** Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science* **48**, 588-594 (1983).
- Töpel, A.:** *Chemie und Physik der Milch*. 3. neubearbeitet Auflage. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg (2004).
- Trziszka, T.:** Einige Aspekte der Verschäumung des Eiklars mit Hilfe der Aerationmethode. *Lebensmittel-Technologie* **19** (6), 169-172 (1986).
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., Mollé, D., Léonil, J.:** Interfacial properties of tryptic peptides of β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 669-675 (1992).
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., Paquin, P.:** Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 673-676 (1991).
- Turhan, K.N., Barbano, D.M., and Etzel, M.R.:** Fractionation of caseins by anion-exchange chromatography using food-grade buffers. *Journal of Food Science* **68** (5), 1578-1583 (2003).
- van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J.:** Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *International Dairy Journal* **11**, 83-92 (2001).
- van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J.:** Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2938-2946 (2002).
- VDLUFA:** *Methodenbuch*, Band III, VDLUFA-Verlag, Bonn (1997).
- VDLUFA:** *Methodenbuch*, Band VI, VDLUFA-Verlag, Bonn (2000).

- Vivekanand, V., Kentish, S.E., O'Connor, A.J., Barber, A.R., Stevens, G. W.:** Microfiltration offers environmentally friendly fractionation of milk proteins. *Australian Journal of Dairy Technology* **59** (2), 186-188 (2004).
- Waniska, R.D., Kinsella, J.E.:** Foaming properties of proteins: Evaluation of a column aeration apparatus using Ovalbumin. *Journal of Food Science* **44** (5), 1398-1402 (1979).
- Walstra, P.:** Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* **9**, 189-192 (1999).
- Walstra, P., de Roos, A.L.:** Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Reviews International* **9** (4), 503-525 (1993).
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J.:** *Dairy Science and Technology*. Second Edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York (2006).
- Ward, L.S., Bastian E.D.:** A method for isolating β -casein. *Journal of Dairy Science* **79**, 1332-1339 (1996).
- Wong, D.W.S., Camirand, W.M., Pavlath, A.E.:** Structures and functionalities of milk proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36** (8), 807-844 (1996).
- Yankov, S., Panchev, I.:** Foaming properties of sugar-egg mixtures with milk protein concentrates. *Food Research International* **29** (5-6), 521-525 (1996).
- Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S., Kalapathy, U.:** Properties of the biopolymers from crosslinking whey protein isolate and soybean 11S Globulin. *Journal of Food Science* **61** (6), 1129-1131, 1164 (1996).
- Yu, M.-A., Damodaran, S.:** Kinetics of protein foam destabilization: Evaluation of a method using bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 1555-1562 (1991).
- Zbikowska, A., Szerszunowicz, I.:** Effect of heating on the molecular state of proteins in water solutions of spray-dried milk retentate. *Milchwissenschaft* **58** (11/12), 589-592 (2003).

Anhang

Gesamtübersicht der Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und – hydrolysaten, Ergebnisübersicht

Tabelle A1: Gesamtübersicht der Messwerte zur Beurteilung der Schaumbildungseigenschaften

Messparameter	Schaumdichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Standards						
Rekonstituierte Magermilch (0,5%)	0,12	770	50,1	0,23	0,27	84,9
Rekonstituierte Magermilch (1,0%)	0,14	641	49,7	0,23	0,25	85,4
Rekonstituierte Magermilch (1,5%)	0,15	588	49,9	0,23	0,24	83,4
Rekonstituierte Magermilch (2,0%)	0,15	591	49,4	0,25	0,24	84,7
Rekonstituierte Magermilch (2,5%)	0,17	496	48,7	0,23	0,27	81,8
Rekonstituierte Magermilch (3,0%)	0,18	475	49,1	0,22	0,25	82,6
Rekonstituierte Magermilch (3,4%)	0,13	693	48,3	0,16	0,18	76,6
Vollmilch 3,5% Fett	0,13	737	48,1	0,12	0,17	88,2
Labcasein pH 9,0 3,4%	n.m.	n.m.	48,1	n.m.	n.m.	n.m.
Labcasein pH 7,0 3,4%	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Labmolkenprotein- konzentrat (3,4%)	0,16	534	49,6	0,26	0,35	77,8
Molkenproteinkonzentrat (3,4%)	0,14	651	48,1	0,16	0,23	89,2
Molkenproteinisolat (3,4%)	0,11	853	49,5	0,13	0,14	90,1
Natriumcaseinat (3,4%)	0,11	849	46,1	0,14	n.m.	97,1
Fraktionen						
Casein, micellar (3,4%)	0,09	1113	49,6	0,12	0,16	81,0
Molkenprotein, nativ (3,4%)	0,13	712	43,4	0,12	0,15	83,6
Molkenprotein, nativ (6,8%)			47,1			
Molkenprotein, nativ (10,2%)	0,13	668	46,3	0,13	0,15	87,2
α_S -Casein (3,4%)	0,14	630	48,6	0,19	n.m.	83,6
β -Casein (3,4%)	n.m.	n.m.	47,7	n.m.	n.m.	n.m.
β -Casein aus Mikrofiltration (3,4%)	0,10	975	45,3	0,18	n.m.	95,7
κ -Casein			Keine Lösung des κ -Casein möglich			

B

Messparameter	Schaum- dichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
α-Lactalbumin (3,4%)	0,12	748	48,9	0,29	0,28	90,8
β-Lactoglobulin (3,4%)	0,13	703	47,9	0,28	n.m.	88,3
Albumin Standard (3,4%)	0,13	723	53,2	0,27	0,32	92,5
GMP Morinaga (0,5%)	n.m.	n.m.	49,6	n.m.	n.m.	n.m.
NPN Konzentrat UF 10.000 g/mol	0,15	586	36,9	0,22	n.m.	91,6
NPN Permeat UF 10.000 g/mol	0,14	646	47,4	0,23	n.m.	96,9
NPN UF 5.000 g/mol, lac- tosereduziert	n.m.	n.m.	34,7	n.m.	n.m.	n.m.
Molkenprotein mit GMP (3,4%)	0,16	534	49,6	0,26	0,35	77,8
Magermilch angereichert						
3,37% MMP + 0,03%HS	0,19	451	49,2	0,26	0,34	81,8
3,1% MMP + 0,3%HS	0,17	498	49,1	0,32	0,31	80,0
2,7% MMP + 0,6%HS	0,18	480	49,5	0,31	0,31	81,5
3,37% MMP + 0,03% β- Casein	0,15	601	47,7	0,19	0,23	86,7
3,3% MMP + 0,3% β- Casein	0,15	607	48,1	0,18	0,21	85,3
2,8% MMP + 0,6% β- Casein	0,16	528	47,7	0,18	0,22	80,6
1,9% MMP + 1,5% β- Casein	0,18	484	47,1	0,17	0,17	86,1
Handelsproben						
Cino Breisgaumilch	0,14	643	48,2	0,17	0,23	83,4
Cappuccino-Milch frischli	0,15	620	48,2	0,16	0,20	78,4
Naarmann Milch für feinen Milchschaum	0,17	510	45,2	0,15	0,21	81,2
TG-behandelte Pulver						
MMP TG 3,4%	0,14	618	47,5	0,20	n.m.	95,5
Natriumcaseinat TG 3,4%	0,13	729	44,0	0,12	0,22	89,3
Molkenprotein-hydrolysat TG 3,4%	0,15	603	44,1	0,20	0,30	87,6
Hydrolysate Technikummaßstab						
MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,12	755	40,8	0,17	n.m.	89,9
MPI Tr Hydr Perm 10.000 gefr	0,15	603	48,5	0,16	n.m.	90,1
MPI Tr Hyd Ret 10.000 gefr	0,12	782	44,2	0,18	n.m.	100
MPI Tr Hydr Perm 5.000 gefr	0,16	557	47,8	0,13	n.m.	85,9
MPI Tr Hydr Ret 5.000 gefr	0,18	486	49,3	0,18	0,22	85,6

C

Messparameter	Schaum- dichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
MPI CT Hyd Perm 10.000 sprüh	0,11	872	44,8	0,11	n.m.	86,0
MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,10	966	46,9	0,24	n.m.	87,7
MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,09	1044	46,0	0,09	n.m.	84,0
MPI CT Hyd Perm 5.000 gefr	0,09	1133	46,0	0,1	n.m.	91,0
MPI CT Hyd Ret 5.000 gefr	0,10	924	46,4	0,24	n.m.	88,5
MMP + MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,11	874	45,1	0,13	n.m.	93,5
MMP + MPI Tr Hydr Perm 10.000 gefr.	0,11	829	43,7	0,15	n.m.	93,2
MMP + MPI Tr Hyd Ret 10.000 gefr	0,11	834	47,2	0,11	0,21	91,0
MMP + MPI Tr Hydr Perm 5.000 gefr	0,11	854	43,7	0,16	n.m.	92,0
MMP + MPI Tr Hydr Ret 5.000 gefr	0,11	866	44,2	0,17	n.m.	92,0
MMP + MPI CT Hyd Perm 10.000 sprüh	0,13	720	48,1	0,15	0,18	86,3
MMP + MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,12	752	46,7	0,17	0,22	73,9
MMP + MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,14	629	46,4	0,14	0,16	72,0
MMP + MPI CT Hyd Perm 5.000 gefr	0,12	776	47,0	0,16	0,20	86,5
MMP + MPI CT Hyd Ret 5.000 gefr	0,13	696	47,1	0,16	0,22	85,2
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 10.000 sprüh	0,09	1037	51,6	0,17	0,22	82,5
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 10.000 gefr	0,10	979	47,4	0,12	n.m.	90,0
Vollmilch + MPI Tr Hyd Re- tentat 10.000 gefr	0,09	1007	51,8	0,20	0,20	90,4
Vollmilch + MPI Tr Hyd Perm 5.000 gefr	0,09	1048	51,7	0,11	n.m.	88,4
Vollmilch + MPI Tr Hyd Ret 5.000 gefr	0,10	924	57,7	0,10	n.m.	95,6
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 10.000 sprüh	0,14	652	52,5	0,17	0,16	85,3
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 10.000 gefr	0,12	738	48,3	0,17	0,21	80,6

D

Messparameter	Schaum- dichte [g/cm ³]	Overrun [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	Blasendurch- messer [mm]		Drainage- Endwert [%]
				60 s	1200 s	
Vollmilch + MPI CT Hyd Ret 10.000 gefr	0,15	591	50,9	0,14	0,22	88,1
Vollmilch + MPI CT Hyd Perm 5.000 gefr	0,12	744	49,8	0,14	0,30	83,2
Vollmilch + MPI CT Hyd Ret 5.000 gefr	0,13	674	51,7	0,19	0,24	76,0
Hydrolysate Labormaßstab						
β-CF, Tr, 5 min	n.m.	n.m.	46,0	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Tr, 15 min	n.m.	n.m.	40,8	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Tr, 30 min	n.m.	n.m.	30,7	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Tr, 60 min	n.m.	n.m.	43,9	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, P, 5 min	0,12	794	42,8	0,15	n.m.	91,5
β-CF, P, 15 min	0,11	844	43,9	0,19	0,20	84,4
β-CF, P, 30 min	n.m.	n.m.	43,1	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, P, 60 min	n.m.	n.m.	42,9	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Alc, 5 min	n.m.	n.m.	47,1	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Alc, 15 min	n.m.	n.m.	45,1	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Alc, 30 min	n.m.	n.m.	44,4	n.m.	n.m.	n.m.
β-CF, Alc, 60 min	n.m.	n.m.	41,1	n.m.	n.m.	n.m.
β-LGF, Tr, 5 min	0,08	1216	49,9	0,38	0,41	83,3
β-LGF, Tr, 15 min	0,09	1017	48,9	0,34	0,43	84,3
β-LGF, Tr, 30 min	0,10	919	49,5	0,32	0,24	79,9
β-LGF, Tr, 60 min	0,11	812	46,9	0,24	n.m.	94,0
β-LGF, P, 5 min	0,09	1039	47,1	0,17	0,24	41,8
β-LGF, P, 15 min	0,08	1120	45,7	0,15	0,20	88,2
β-LGF, P, 30 min	0,08	1221	46,9	0,16	0,19	89,9
β-LGF, P, 60 min	0,07	1318	46,8	0,16	0,21	90,1
β-LGF, Alc, 5 min	0,09	1098	45,5	0,18	0,18	97,7
β-LGF, Alc, 15 min	0,10	933	44,7	0,17	n.m.	91,1
β-LGF, Alc, 30 min	0,11	866	44,6	0,20	n.m.	95,6
β-LGF, Alc, 60 min	0,11	887	44,9	n.m.	n.m.	92,5
Hydrolysat aus MO	0,12	783	31,8	n.m.	n.m.	92,3

n.m.: nicht messbar da Schaum zerfallen; Tr: Trypsin; CT: Chymotrypsin; Alc: Alcalase; P: Pepsin; Hyd: Hydrolysat; Perm: Permeat; Ret: Retentat; gefr: gefriergetrocknet; sprüh: sprühgetrocknet; MO: Mikroorganismen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Micellen-Modell nach Holt. Nanocluster-Partikel (•) und Polypeptidketten bilden eine Micelle (DeKruif und Holt, 2003)	7
Abb. 2: Micellen-Modell nach Walstra (2006).....	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der Strukturänderungen von β -Lactoglobulin in Abhängigkeit vom pH-Wert (Wong et al., 1996; Gottschalk 2003).....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Schaumarten Kugelschaum (links) und Polyederschaum (rechts) mit Honig-Waben-Struktur (Prins 1991)	13
Abb. 5: Schaumarten: Kugelschaum aus Milch (links, frisch aufgeschlagen) und zum Polyederschaum tendierender Schaum (rechts, nach 20 Minuten). Eigene Aufnahmen.....	13
Abb. 6: Hydrophobizität der Aminosäuren nach Black und Mould (1991). Von links nach rechts mit absteigender Hydrophobizität dargestellt.	26
Abb. 7: Primärstruktur von Rinder – β – Casein A ² -5P. Eigene Zeichnung nach (Schlimme und Buchheim, 1999), Spaltstellen von Trypsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.	28
Abb. 8: Primärstruktur von β -LG B (Rind). Eigene Zeichnung nach (Schlimme und Buchheim, 1999), Spaltstellen von Trypsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.....	30
Abb. 9: Primärstruktur von Rinder – β – Casein A ² -5P. Eigene Zeichnung nach (Schlimme und Buchheim, 1999), Spaltstellen von Pepsin durch schwarze Balken gekennzeichnet; Hydrophobizitätskennzahlen kursiv.	33
Abb. 10: Verfahrensablauf der Anreicherung von NPN-Substanzen aus Rohmilch.....	39
Abb. 11: Schaumbildungsanlage (links) und Messplatz (rechts) nach Borcharding (2004) ..	44
Abb. 12: Größenausschlusschromatogramme (FPLC) hochmolekularer Referenzsubstanzen	49
Abb. 13: <i>Größenausschlusschromatogramme (FPLC) von Serumalbumin (Peak B), β-Lactoglobulin (Peak C) und α-Lactalbumin (Peak D)</i>	50
Abb. 14: Elektropherogramme der Fraktionen der Labcasein-Herstellung. a): Ausgangsmilch; b): Labcasein, aufgelöst mit NaOH; c): Labmolke; d): Retentat der Ultrafiltration der Labmolke; e): Permeat der Ultrafiltration der Molke	56
Abb. 15: Anteil an ungelöstem Labcasein in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur.....	57

- Abb. 16: Elektropherogramme der fraktionierten Caseine (Säuerung mit Milchsäure). a): α_S -Casein-Standard; b): β -Casein-Standard; c): Labcasein mit 1mol/l NaOH aufgelöst; d): Präzipitat aus Säurefällung (α_S -/ p - κ -Casein-Fraktion); e): Überstand aus Säurefällung; f): Präzipitat aus der 2. Siebung (β -Casein); g): Filtrat aus der 2. Fällung.58
- Abb. 17: Elektropherogramme der Proteine aus der Fraktionierung von Caseinen mit Salzsäure. a): α_S -Casein Standard; b): β -Casein-Standard; c): Labcasein mit 1mol/l NaOH aufgelöst; d): Präzipitat aus Fällung mit Salzsäure; e): Überstand aus Fällung mit Salzsäure; f): Präzipitat aus der 2. Siebung; g): Überstand aus der 2. Siebung.59
- Abb. 18: Verfahrensablauf zur Gewinnung von β -Casein einerseits und α_S - und p - κ -Casein andererseits im Technikummaßstab.....62
- Abb. 19: Elektropherogramme der Molkenproteine aus der Molkenproteinfraktionierung mit 20, 25 und 30% Ausgangsproteingehalt. Elektropherogramm a): Molkenproteinstandard mit von unten nach oben α -LA, β -LG und BSA; b): 20% Molkenprotein (MP), Präzipitat (P); c): 20% MP, Überstand (ÜS); d): 25% MP, P; e): 25% MP, ÜS; f): 30% MP, P; g) 30% MP, ÜS.....66
- Abb. 20: Verfahrensablauf zur partiellen Fraktionierung von Molkenproteinisolat in β -LG einerseits sowie α -LA, BSA und IG andererseits73
- Abb. 21: Vergleich der Verfahrensschritte des Verfahrens nach Maubois et al. (2001, links) und des entwickelten Verfahrens (rechts)76
- Abb. 22 Größenausschlusschromatogramme der Ausgangsmagermilch sowie des Retentats und Permeats nach Ultrafiltration (NMWCO 10.000 g/mol). A: Molmassen bis 2.000.000 g/mol, B: Caseine, C: β -Lactoglobulin, D: α -Lactalbumin, E: NPN-Substanzen.78
- Abb. 23: Größenausschlusschromatogramme von Magermilchretentat und -permeat nach Ultrafiltration (NMWCO 5.000 g/mol). A: Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B: Caseinmonomere (in etwa 20.000 g/mol), C: β -Lactoglobulin, D: α -Lactalbumin, E: NPN-Substanzen79
- Abb. 24: Größenausschlusschromatogramme von Molkenproteinisolat vor und nach Hydrolyse mit Trypsin. A: β -Lactoglobulin-Dimer, B: β -Lactoglobulin-Monomer, C: α -Lactalbumin, D: Molmassen <14.000 g/mol82
- Abb. 25: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des tryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat nach Ultrafiltration (NMWCO=10.000 g/mol). A: Substanzen mit einer Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B und C: Substanzen mit Molmassen <14.000 g/mol.....83

Abb. 26: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des tryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat nach Ultrafiltration (NMWCO=5.000 g/mol).....	84
Abb. 27: Größenausschlusschromatogramme von Molkenproteinisolat vor und nach Hydrolyse mit Chymotrypsin. A: β -Lactoglobulin-Dimer, B: β -Lactoglobulin-Monomer, C: α -Lactalbumin, D: Molmassen < 14.000 g/mol.....	85
Abb. 28: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des chymotryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat (NMWCO: 10.000 g/mol). A: Substanzen mit einer Molmasse bis 2.000.000 g/mol, B: α -Lactalbumin; C: Substanzen mit Molmassen <14.000 g/mol.....	86
Abb. 29: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme der chymotryptischen Permeat- und Retentatfraktionen nach Ultrafiltration mit einer Trenngrenze von 10.000 g/mol (gefriergetrocknet).....	87
Abb. 30: Größenausschlusschromatogramme der Permeat- und Retentatfraktion des chymotryptischen Hydrolysats aus Molkenproteinisolat (NMWCO: 5.000 g/mol).....	88
Abb. 31: Hydrolyse mit Chymotrypsin: RP-HPLC-Chromatogramme der Permeat- und Retentat-Fractionen aus der UF mit einer mittleren Trenngrenze von 5.000 g/mol.....	89
Abb. 32: Größenausschlusschromatogramme der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = β -Casein, B, C und D <14.000 g/mol).....	90
Abb. 33: RP-HPLC-Chromatogramme der tryptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten.....	91
Abb. 34: Größenausschlusschromatogramme der peptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = β -Casein, B = ca. 20.000 g/mol, C und D <14.000 g/mol).....	92
Abb. 35 RP-HPLC-Chromatogramme der peptischen β -Casein-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten.....	93
Abb. 36: Größenausschlusschromatogramme der β -Casein-Hydrolysate durch Alcalase mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial.....	95
Abb. 37: RP-HPLC-Chromatogramme der β -Casein-Hydrolysate nach Hydrolyse mit Alcalase und Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten.....	96
Abb. 38: Größenausschlusschromatogramme der tryptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Peak A = >200.000 g/mol, B = β -Lactoglobulin-Dimer, C = β -Lactoglobulin, D = Peptide <14.000 g/mol).....	97

Abb. 39: RP-HPLC-Chromatogramme der tryptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten	99
Abb. 40: Ergebnisse der Charakterisierung des peptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysats mittels FPLC (Peak A = β -Lactoglobulin-Dimer, B = β -Lactoglobulin, C = Peptide)	100
Abb. 41: RP-HPLC-Chromatogramme der peptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysate mit Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten	101
Abb. 42: Ergebnisse der Charakterisierung des β -Lactoglobulin-Hydrolysats durch Alcalase mittels FPLC (Peak A = Molmassen ca. 200.000 g/mol, B = β -LG-Monomer, C und D = Peptide < 14.000 g/mol)	102
Abb. 43: RP-HPLC-Chromatogramme der β -Lactoglobulin-Hydrolysate nach Hydrolyse mit Alcalase und Hydrolysezeiten von 5 bis 60 Minuten	103
Abb. 44: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen der Casein-Fractionen (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = α_S - ρ - κ -Casein-Fraktion, Fraktion 2 = β -Casein-Fraktion).....	105
Abb. 45: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen der Molkenprotein-Fractionen (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = α -LA-/ BSA-/ IG-Fraktion; Fraktion 2 = β -LG-Fraktion)	106
Abb. 46: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen des Permeats und des Retentats der UF (NMWCO = 10.000 g/mol) nach tryptischer Hydrolyse von Molkenproteinisolat (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = Permeat; Fraktion 2= Retentat)	107
Abb. 47: Ergebnisse der sensorischen Prüfung wässriger Lösungen des Permeats und des Retentats (Konzentrats) nach chymotryptischer Hydrolyse von Molkenproteinisolat (1 = sehr schwach erkennbar, 2 = schwach erkennbar, 3 = deutlich erkennbar; Fraktion 1 = Permeat; Fraktion 2 = Retentat)	108
Abb. 48: Drainageverlauf der Schäume aus rekonstituierter Magermilch mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 3,4% Protein.	113
Abb. 49: Blasengrößenverteilung der Schäume aus Vollmilch im Vergleich mit den Schäumen aus rekonsituierter Magermilch	115
Abb. 50: Drainageverlauf der Schäume aus Vollmilch im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch	116
Abb. 51: Größenverteilung der Blasendurchmesser [mm] von Schäumen aus Lösungen mit micellarem Casein nach einer Minute und 20 Minuten Standzeit	119

Abb. 52: Digitale Aufnahmen von Schäumen aus micellarem Casein in wässriger Lösung in nach einer Minute (links) sowie 20 Minuten Standzeit (rechts)	119
Abb. 53: Vergleich des Drainageverlaufs der Schäume aus rekonstituiertem micellarem Casein, rekonstituierter Magermilch und Natriumcaseinat in Abhängigkeit von der Zeit	120
Abb. 54: Blasengrößenverteilung in Schäumen aus α_s - β - κ -Casein-Fractionen in wässriger Lösung (3,4% Protein)	123
Abb. 55: Drainageverlauf der Schäume aus α_s - β - κ -Casein-Fractionen in wässriger Lösung im Vergleich mit der Drainage von micellarem Casein und Magermilchpulver	124
Abb. 56: Drainageverlauf von rekonstituierter Magermilch angereichert mit β -Casein aus der Fraktionierung von Labcasein (Ersatz von Magermilchprotein: 0,03-1,5%) im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch	126
Abb. 57: Drainageverlauf von β -Casein aus der Mikrofiltration im Vergleich mit Magermilchstandard (rekonstituiert)	128
Abb. 58: Mittlerer Drainageverlauf der Schäume aus Molkenproteinkonzentrat (Mikrofiltration) Molkenproteinisolat und konventionellem Molkenproteinkonzentrat in wässriger Lösung	131
Abb. 59: Vergleich des Drainageverlaufs der α -LA/ BSA-/ IG-Fraktion und β -LG-Fraktion mit der Drainage des Ausgangsmaterials Molkenproteinisolat und BSA	134
Abb. 60: Blasengrößenverteilung von Schäumen aus NPN-angereichertem UF-Permeat (NMWCO: 10.000 g/mol) und daraus gewonnenem lactosereduzierten NPN-Konzentrat im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch (60 s Standzeit)	137
Abb. 61: Drainageverlauf der Schäume aus NPN-angereichertem UF-Permeat (NMWCO: 10.000 g/mol) und daraus gewonnenem lactosereduzierten Konzentrat im Vergleich mit Schäumen aus rekonstituierter Magermilch	138
Abb. 62: Drainageverlauf der Harnstoff-angereicherten Magermilchsäume aus rekonstituierter Magermilch im Vergleich mit der Drainage des Schaums aus rekonstituierter Magermilch. MMP= Magermilchpulver; HS = Harnstoff.	141
Abb. 63: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituierter Magermilch unbehandelt mit Transglutaminase-behandelter rekonstituierter Magermilch	143
Abb. 64: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituiertem Natriumcaseinat unbehandelt mit Schäumen aus Transglutaminase-behandeltem rekonstituiertem Natriumcaseinat	144

Abb. 65: Vergleich des Verlaufs der Drainage von Schäumen aus rekonstituiertem Molkenproteinkonzentrat unbehandelt mit Schäumen aus Transglutaminase-behandeltem rekonstituiertem Molkenproteinkonzentrat	145
Abb. 66: Ergebnisse der Drainagemessung an Schäumen aus den Permeaten tryptischer und chymotryptischer Hydrolysate	152
Abb. 67: Blasengrößenverteilung der Schäume aus den Permeaten der Molkenproteinhydrolysate nach Ultrafiltration nach 60 Sekunden	153
Abb. 68: Blasengrößenverteilung der Schäume aus Retentaten der Molkenproteinhydrolyse nach 60 Sekunden	154
Abb. 69: Drainageverlauf der Schäume aus UF-Retentaten tryptischer und chymotryptischer Proteolysate	155
Abb. 70: Blasengrößenverteilung der Schäume aus tryptischen Hydrolysaten von β -LG mit Hydrolysezeiten von 5-60 Minuten nach 60 Sekunden Standzeit	166
Abb. 71: Blasengrößenverteilung der Schäume aus tryptischen Hydrolysaten von β -LG mit Hydrolysezeiten von 5-60 Minuten nach 20 Minuten Standzeit	167
Abb. 72: Drainageverlauf der Handelsproben im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch.....	174
Abb. 73: Drainageverlauf der Handelsproben im Vergleich mit Vollmilch	175
Abb. 74: Vergleich des Drainageverlaufs von mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> hydrolysierter Magermilch und rekonstituierter Magermilch	179

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung von Kuhmilch, Mittelwerte in % (Schlimme und Buchheim, 1999).....	3
Tab. 2: Proteine in der Kuhmilch (Walstra et al., 2006).....	4
Tab. 3: Isoelektrische Punkte der Caseinfraktionen	6
Tab. 4: Relative Größe und Molmasse verschiedener Partikel in Milch (verändert nach (Vivekanand et al., 2004)).....	18
Tab. 5: Literaturüberblick: Proteolyse von Milchproteinen mit Versuchen zur Prüfung der Schaumbildungseigenschaften.	23

Tab. 6: Einteilung der Aminosäuren in Hydrophobizitätsstufen. Eigene Tabelle nach Black und Mould (1991)	26
Tab. 7: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der tryptischen Hydrolyse von β -Casein (eigene Einschätzung).....	29
Tab. 8: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der tryptischen Hydrolyse von β -Lactoglobulin (Eigene Einschätzung).	31
Tab. 9: Theoretische Kettenlänge, Molmasse und Eigenschaften von Peptiden aus der peptischen Hydrolyse von β -Casein nach Schmelzer et al (Schmelzer et al., 2004). Eigene Einschätzung der Eigenschaften.	34
Tab. 10: Versuchsplan der Versuchsreihe zur enzymatischen Hydrolyse von Milchproteinfraktionen	41
Tab. 11: Zusammensetzung, Bearbeitung und Zutatenlisten der kommerziellen Produkte für Milchschaum	42
Tab. 12: Einteilung der Retentionszeiten der FLPC-Chromatogramme nach eluierenden Molmassen.....	50
Tab. 13: Vokabular der Geruchs- und Geschmackseigenschaften	52
Tab. 14: Ergebnisse der Fraktionierung von Magermilchproteinen in Casein- und Molkenprotein mittels Mikrofiltration: Proteingehalt und Verhältnis der Fraktionen Casein und Molkenprotein (Mittelwerte) (Hoffmann W., Johannsen, N., Ströbel, D., 2006, siehe Anlage)	54
Tab. 15: Zusammensetzung der im Technikummaßstab gewonnenen α -/p- κ -Casein- und der β -Casein-Fraktionen (n=8).....	60
Tab. 16: Anteil von α -/p- κ -Casein bzw. β -Casein an den Fraktionen nach densitometrischer Auswertung der Elektropherogramme aus der SDS-PAGE	60
Tab. 17: Vergleich von Ausbeute und Reinheit des entwickelten Verfahrens mit Daten aus der Literatur	63
Tab. 18: Bestimmung des Gehalts an den Aminosäuren Lysin und Alanin in Natriumcaseinat und den Fraktionen der Fraktionierung aus Labcasein.....	64
Tab. 19: α _S - und β -Casein-Gehalt der durch Mikrofiltration gewonnenen β -Casein-Fraktion im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (n=2, SDS-PAGE).....	65
Tab. 20: Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Elektropherogramme der Versuche zur Molkenproteinfraktionierung mit 20%, 25% und 30% Ausgangsproteingehalt.	67

Tab. 21: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Versuche zur Molkenproteinfraktionierung mit UF-Permeat von Molke. β -LG-Fraktion = Überstand, α -LA-Fraktion = Bodensatz.....	68
Tab. 22: Anteile der Molkenproteine im Überstand der Zentrifugation bei 5000 und 7000 x g mit pH-Werten von 3,8 bis 4,6.....	69
Tab. 23: Anteile der Molkenproteine im Bodensatz der Zentrifugation bei 5000 und 7000 x g mit pH-Werten von 3,8 bis 4,6.....	70
Tab. 24: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Proteine im Überstand bei pH 3,8 und 4,0 und bei Zentrifugalbeschleunigungen von 5000 und 7000 x g (n=2).....	71
Tab. 25: Molkenproteinfraktionierung: Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme der Proteine im Niederschlag bei verschiedenen pH-Werten und Zentrifugalbeschleunigungen (n=2).....	72
Tab. 26: Ergebnisse der Hauptversuche zur Molkenproteinfraktionierung (SDS-PAGE, n= 2).....	73
Tab. 27: Ausbeute (n=2) der Molkenproteinfraktionierung (Anteil der Proteine in den Fraktionen am Ausgangsmaterial; SDS-Page)	74
Tab. 28: Auswertung der Densitometrie der Elektropherogramme der NPN-Fraktionierung.....	77
Tab. 29: Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und Abtrennung der kristallisierten Lactose.....	78
Tab. 30: Zusammensetzung des Permeats nach Eindampfung und partieller Abtrennung der kristallisierten Lactose.....	80
Tab. 31: Zusammensetzung der Proteolysate nach enzymatischer Hydrolyse und Fraktionierung mit Hilfe der Ultrafiltration (NMWCO=10.000 g/mol)); Permeate nach Sprühtrocknung, Retentate nach Gefriertrocknung.....	81
Tab. 32: Ergebnisse der Versuchsreihe zur Prüfung der Präzision der Aufschäummethodik mit rekonstituierter Magermilch (n=10).....	111
Tab. 33: Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter Magermilch in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	112
Tab. 34: Schaumbildungseigenschaften von Vollmilch (3,5% Fett) im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch.....	114

Tab. 35: Schaumbildungseigenschaften von Natriumcaseinat im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch.....	118
Tab. 36: Messwerte der Charakterisierung der Schaumbildungseigenschaften der angereicherten α_s -/p- κ -Casein- und β -Casein-Fraktion im Vergleich mit micellarem Casein und rekonstituierter Magermilch.....	122
Tab. 37: Schaumbildungseigenschaften von rekonstituierter, mit β -Casein angereicherter Magermilch im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch.....	125
Tab. 38: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten β -Casein-Fractionen aus der Fraktionierung von Labcasein und Mikrofiltration im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch.....	127
Tab. 39: Schaumbildungseigenschaften von Molkenproteinisolat, Molkenproteinkonzentrat und Molkenproteinkonzentrat aus Mikrofiltration (0,1 μ m)...	130
Tab. 40: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten Fraktionen aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit Molkenproteinisolat und Rinderserumalbumin (BSA)	132
Tab. 41: Proteinverteilung der angereicherten Molkenproteinfraktionen und des Molkenproteinisolats (SDS-PAGE).	135
Tab. 42: Schaumbildungseigenschaften der angereicherten NPN-Fractionen im Vergleich mit rekonstituierter Magermilch	136
Tab. 43: Schaumbildungseigenschaften von Harnstoff-angereicherter rekonstituierter Magermilch und von rekonstituierter Magermilch	140
Tab. 44: Schaumbildungseigenschaften von Transglutaminase-vernetzten Milchproteinen und den Ausgangsmaterialien	142
Tab. 45: Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysate (Hydr) aus der tryptischen Hydrolyse (Tr) und den anschließenden Ultrafiltrationen von Molkenproteinisolat (MPI) (NMWCO = 10.000 und 5.000 g/mol, Perm = Permeat, Ret = Retentat, gefr = lyophilisiert, sprüh = sprühgetrocknet)	147
Tab. 46: Vergleich der Schaumbildungseigenschaften zur tryptischen Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Althouse et al. (1995)	148
Tab. 47: Schaumbildungseigenschaften der Hydrolysate aus der chymotryptischen (CT) Hydrolyse von Molkenproteinisolat und anschließender Ultrafiltrationen (NMWCO = 10.000 und 5.000 g/mol, Abkürzungen wie Tab. 45)	150
Tab. 48: Vergleich der Schaumbildungseigenschaften zur chymotryptischen Hydrolyse von Molkenproteinisolat mit Althouse et al. (1995)	151

Tab. 49: Auswirkung der Anreicherung von rekonstituierter Magermilch mit tryptischen und chymotryptischen Hydrolysatfraktionen auf die Schaumbildungseigenschaften von Magermilchpulver (Abkürzungen vgl. Tab. 45 und Tab. 47)	156
Tab. 50: Auswirkung der Anreicherung von Vollmilch (3,5% Fett) mit tryptischen und chymotryptischen Hydrolysatfraktionen auf die Schaumbildungseigenschaften (Abkürzungen siehe Tab. 45 und Tab. 47).....	158
Tab. 51: Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate der β -Caseinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion; Tr: Trypsin).....	160
Tab. 52: Schaumbildungseigenschaften der peptischen Hydrolysate der β -Caseinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion, P: Pepsin)	162
Tab. 53: Schaumbildungseigenschaften der Alcalase-Hydrolysate der β -Caseinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Labcasein im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -CF: β -Caseinfraktion, Alc: Alcalase)	163
Tab. 54: Schaumbildungseigenschaften der tryptischen Hydrolysate der β -Lactoglobulinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, Tr: Trypsin) .	165
Tab. 55: Schaumbildungseigenschaften der peptischen Hydrolysate der β -Lactoglobulinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, P: Pepsin) ...	169
Tab. 56: Schaumbildungseigenschaften der Alcalase-Hydrolysate der β -Lactoglobulinangereicherten Fraktion aus der Fraktionierung von Molkenproteinisolat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (β -LGF: β -Lactoglobulin-Fraktion, Alc: Alcalase)	171
Tab. 57: Vergleich der Messwerte der Handelsproben für Milchschaum mit rekonstituiertem Magermilchpulver und Vollmilch.....	173
Tab. 58: Vergleich der Messwerte der Handelsproben für Milchschaum mit eigenen Proben.....	177
Tab. 59: Schaumbildungseigenschaften der mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> inkubierten Magermilch	178
Tab. 60: Zusammenfassung der Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und -hydrolysaten; Veränderung der Parameter Aufschlagfähigkeit, Oberflächenspannung und Stabilität gegenüber dem Standard ($\uparrow\uparrow$ = starke Zunahme, \uparrow = leichte Zunahme, \rightarrow = keine Veränderung, \downarrow = leichte Abnahme, $\downarrow\downarrow$ = starke Abnahme).....	186

KIELER MILCHWIRTSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBERICHTE

Veröffentlichung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel,
Standort Kiel

Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.

**Anreicherung von Milcheiweißfraktionen durch Mikro-
filtration**

Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 58, 41-51 (2006)

ISSN 0023-1347

Anreicherung von Milcheiweißfraktionen durch Mikrofiltration

Von W. Hoffmann, N. Johannsen und D. Ströbel

Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, Postfach 6069, D-24121 Kiel

1. Einleitung

Der Einsatz der Mikrofiltration in der Milchindustrie hatte sich zunächst auf die Abtrennung von Mikroorganismen beschränkt. Membranen mit der mittleren Porengröße 1,4 μm wurden vor mehr als 20 Jahren für die Entkeimung von Käseemilch eingeführt, später dann auch für die Behandlung von Konsummilch vorgeschlagen. Den Einsatz solcher Membranen bei der Herstellung von Konsummilch mit verlängerter Haltbarkeit haben Kiesner et al. (1) ausführlich beschrieben.

Auch die Mikrofiltration mit deutlich feineren Poren gewann schnell an Interesse. Während bei einer Ultrafiltration das Verhältnis von Casein zu Molkenprotein nicht oder nur wenig verändert wird, kann mit Mikrofiltrationsmembranen der mittleren Porengröße 0,1 μm eine gezielte Trennung aufgrund der unterschiedlichen Größe und Struktur der beiden Haupteiweißgruppen erreicht werden. Dabei wird im Crossflow-Verfahren eine gleichmäßig niedrige transmembrane Druckdifferenz über die Membranlänge sowie eine hohe Wandschubspannung angestrebt, um eine schnelle Deckschichtbildung auf der Membran zu verhindern und den Abfall im Permeatflux zu verzögern. Die hierbei meist gewählte Temperatur von ca. 50 °C begünstigt die Filtration, ohne dass es schon zu einer Denaturierung der thermolabilen Molkenproteine kommt. Bei optimaler Prozessführung bleiben die nativen Caseinmicellen weitgehend im Retentat, während die nativen, molekular-dispers gelösten Molkenproteine die Membran passieren können. Das nahezu caseinfreie Permeat wird auch als „ideale Molke“ bezeichnet (2-8).

Für die Abtrennung des β -Caseins von der Caseinmicelle ist ein deutlich anderer Temperaturbereich Voraussetzung. Nach einer vorangehenden längeren Kaltlagerung bei 0-4 °C kommt es in der Micelle zur Abnahme hydrophober Wechselwirkungen und zur Dissoziation monomeren β -Caseins in die wässrige Phase. Das β -Casein könnte dann bei einer geeigneten Membranfiltration, mit gleichbleibend niedriger Temperatur, ins Permeat gelangen, während die Micellen im Retentat zurückbleiben. In der Vergangenheit wurden erste Ultrafiltrationsversuche bei Trenngrenzen zwischen 100 und 300 kD durchgeführt, alternativ Versuche mit Mikrofiltrationsmembranen der mittleren Porengröße 0,1 und 0,2 μm (9-11), oder auch mit Ultrazentrifugen bei 70.000 g (12).

Für die spätere Untersuchung der Schaumbildungseigenschaften von Milch und insbesondere von daraus fraktionierten und enzymatisch modifizierten Milchproteinen wurden im Rahmen eines Forschungsvorhabens (AiF-FV 14040 N) natives Caseinkonzentrat und zwei native Molkenproteinkonzentrate gewonnen. Anschließend erfolgten orientierende Versuche zur Anreicherung von β -Casein.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Für die Anreicherung von nativem Casein und Molkenprotein wurde frische, rohe Sammelmilch vom Versuchsgut Schädtkbek der BFEL, Standort Kiel, auf ca. 45 °C angewärmt und dann entrahmt.

Für die Gewinnung von β -Casein diente Na-Caseinat-Pulver (Alanate 180, Fonterra (Europe) GmbH, Hamburg) als Ausgangsmaterial. Es enthielt 93 % Protein und 1,2 % Natrium.

2.2 Methoden

2.2.1 Anreicherung von nativem Casein und nativem Molkenprotein durch Mikrofiltration

Die Mikrofiltration erfolgte auf einer Pilotanlage (MFS-1, TetraPak, Reinbek) mit internen Kreisläufen auf der Permeat- und Retentatseite. Die Anlage enthielt ein einschichtiges ZrO_2 -Keramikmodul mit einer Austauschfläche von 0,2 m² und einer mittleren Porenweite von 0,1 μ m (Membralox P19-40, SCT, Frankreich). Hierin wurde die separierte Magermilch bei 50 oder 55 °C so lange im Kreislauf mikrofiltriert, bis drei Viertel ihrer eingesetzten Menge ins Permeat übergegangen waren (Konzentrationsgrad 4). Dabei wurde eine Permeatdurchflussrate von 12,5 kg/h eingestellt. Während dieser Filtration blieben die Drücke am Einlauf (p_4) und Auslauf (p_2) des Retentatkanals mit 3,8 bzw. 2,0 bar konstant. Daraus ließ sich die Wandschubspannung (τ_w) im Retentatkanal als Maß für die Scherung über die Membranlänge und der darüber befindlichen, sich bildenden Deckschicht mit $\tau_w = d(p_4 - p_2) / 4l$; d = Durchmesser der 19 einzelnen Kanäle je 4 mm, l = jeweilige Länge der Kanäle 850 mm). Der Druck p_3 am Ausgang des Permeatkanals sank von 1,9 auf 1,3 bar, während der Druck an seinem Eingang p_1 mit 2,8 bar konstant blieb. Dadurch erhöhte sich die transmembrane Druckdifferenz $((p_4 + p_2) / 2 - (p_1 + p_3) / 2)$ von 0,65 auf 0,85 bar. Das Retentat wurde durch Diafiltrationen noch dreimal gewaschen, bevor es in flachen Schalen bei -20 °C eingefroren und anschließend bei 0,65 mbar und 30 °C für 46 h gefriergetrocknet wurde (Lyovac GT2, Thyracont GmbH, Passau). Der Verfahrensweg zur Herstellung des nativen Caseinkonzentrats ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Während die Caseingewinnung über das Retentat der Mikrofiltration erfolgte, diente bei der Gewinnung von nativem Molkenprotein das Permeat als Zwischenprodukt. Die Permeatmenge wurde auf einer weiteren Pilotanlage (UFS-1, TetraPak, Reinbek) bei 50 °C durch Crossflow-Ultrafiltration über ein Hohlfasermodule mit einer Trenngrenze von 10 kD (CTG, 3" HF 25-43-PM10-PB, Koch-Glitsch GmbH, Aachen) auf ein Zehntel der Ausgangsmenge reduziert (UF-Retentat), anschließend diafiltriert und wieder gefriergetrocknet. Den Verfahrensweg gibt ebenfalls Abb. 1 wieder.

Ein zweites natives Molkenproteinkonzentrat wurde nach einer Labfällung von Magermilch bei 40 °C gewonnen. Zur Gerinnung diente eine reine Chymosinlösung (0,25 ml/kg CHY-MAX Plus, Stärke 200 IMCU/ml, Chr. Hansen, Nienburg). Die Molke wurde über einen Quarksack abgetrennt und noch zweimal in der Entrahmungs-zentrifuge gereinigt. Anschließend erfolgte wieder die Ultrafiltration mit einer Einengung im Retentat, das Waschen und Gefrier-trocknen (s. Abb. 2). Zu berücksichtigen ist, dass das Retentat neben dem Molkenprotein verfahrensbedingt auch noch das vom κ -Casein abgespaltene Glycomakropeptid enthält.

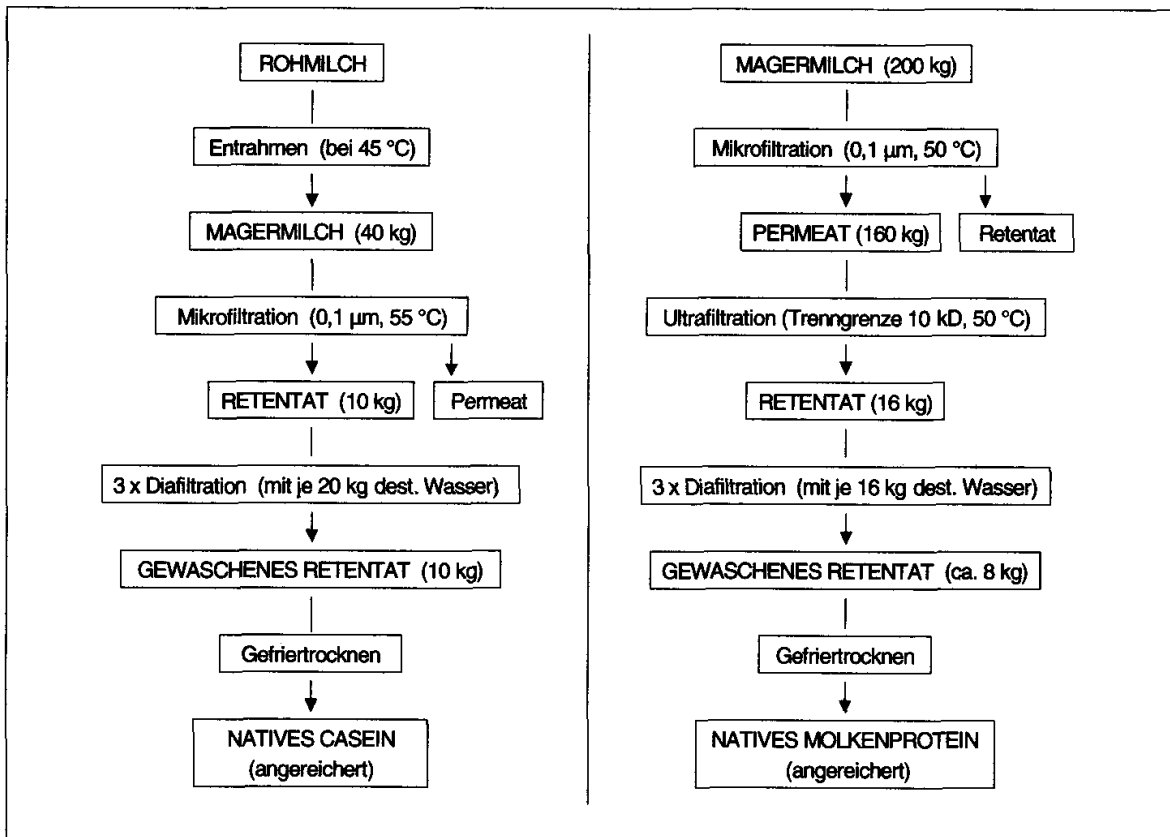


Abb. 1: Fließdiagramme zur Anreicherung von nativem Casein (links) und von nativem Molkenprotein (rechts)

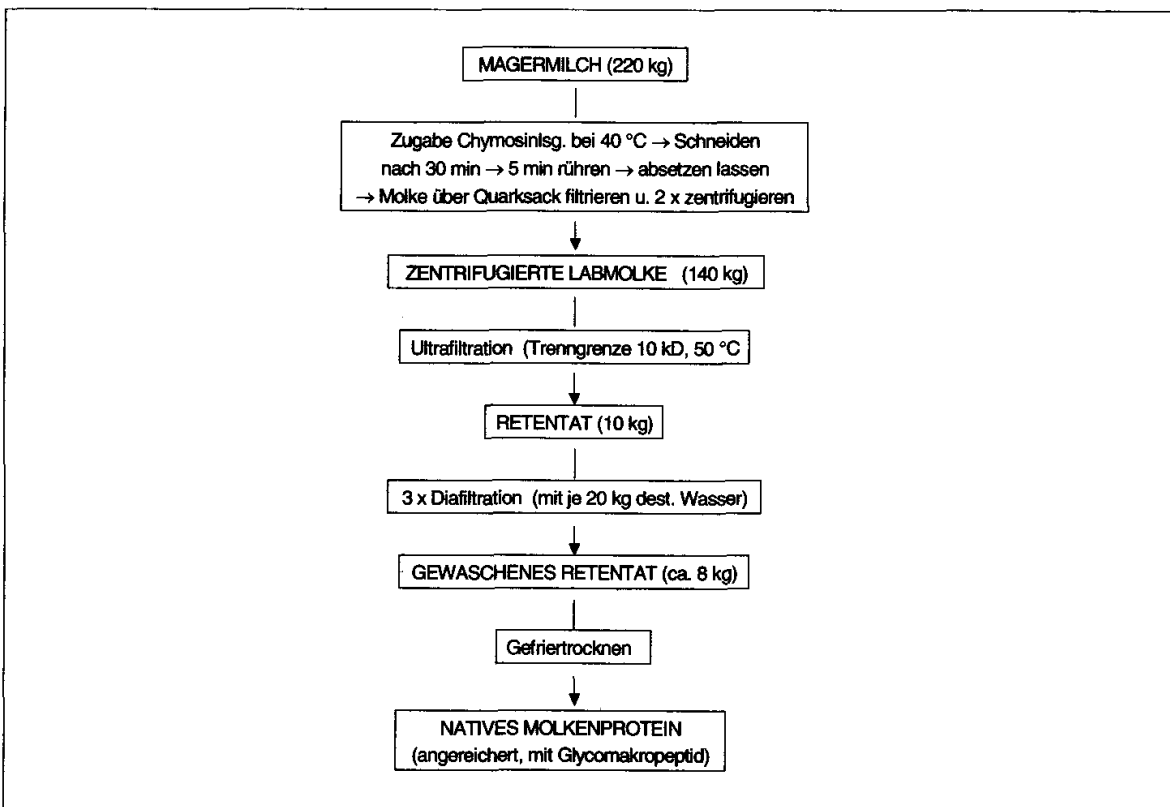


Abb. 2: Fließdiagramm zur Anreicherung von nativem Molkenprotein, mit Glycomakropeptid

2.2.2 Anreicherung von β -Casein durch Mikrofiltration

Aus dem Na-Caseinat-Pulver wurden in zwei Versuchen je 80 kg einer 2 %igen wässrigen Lösung hergestellt, die 20 Stunden bei 2 °C gelagert wurde. Vor der Mikrofiltration wurde der pH-Wert mit 1n NaOH von ca. 6,5 auf 7,0 erhöht und die Lösung mit einem Spiralaustauscher weiter auf ca. 0,5 °C gekühlt. Das zum Anfahren der Anlage benötigte entionisierte Wasser war ebenfalls auf ca. 0,5 °C heruntergekühlt worden. Um während der Mikrofiltration eine Maximaltemperatur von 3 °C im Retentatkreislauf zu gewährleisten, war die Mikrofiltrationsanlage gemäß Abb. 3 umgebaut worden. Das Vorlaufgefäß fasste nur ca. 40 l, so dass die Caseinatlösung mehrfach nachgefüllt wurde, sobald eine entsprechende Permeatmenge abgeflossen war. Zu Beginn der Filtration mit einer Permeatdurchflussmenge von 12,5 kg/h wurden im Retentatkanal Drücke von 3,65 bzw. 2,05 bar gemessen, im Permeatkanal 2,6 und 1,65 bar. Nach 4,5 h war die Durchflussmenge auf etwa 6,0 kg/h gesunken und die Drücke im Permeatkanal erreichten nur noch 0,35 bzw. 0 bar. Um die Filtrationsleistung nicht weiter absinken zu lassen, wurde das Retentat dann mit entionisiertem Wasser von 0,5 °C regelmäßig wieder auf ca. 40 l aufgefüllt, so dass das Vorlaufgefäß ständig gefüllt war. Innerhalb der folgenden 2 Stunden blieben nun Durchflussmenge und Druckverhältnisse annähernd konstant. Das in den 6,5 Stunden gewonnene Permeat wurde bei 50 °C in der schon beschriebenen Ultrafiltrationsanlage auf ca. 5 kg UF-Retentat eingengt und gefriergetrocknet.

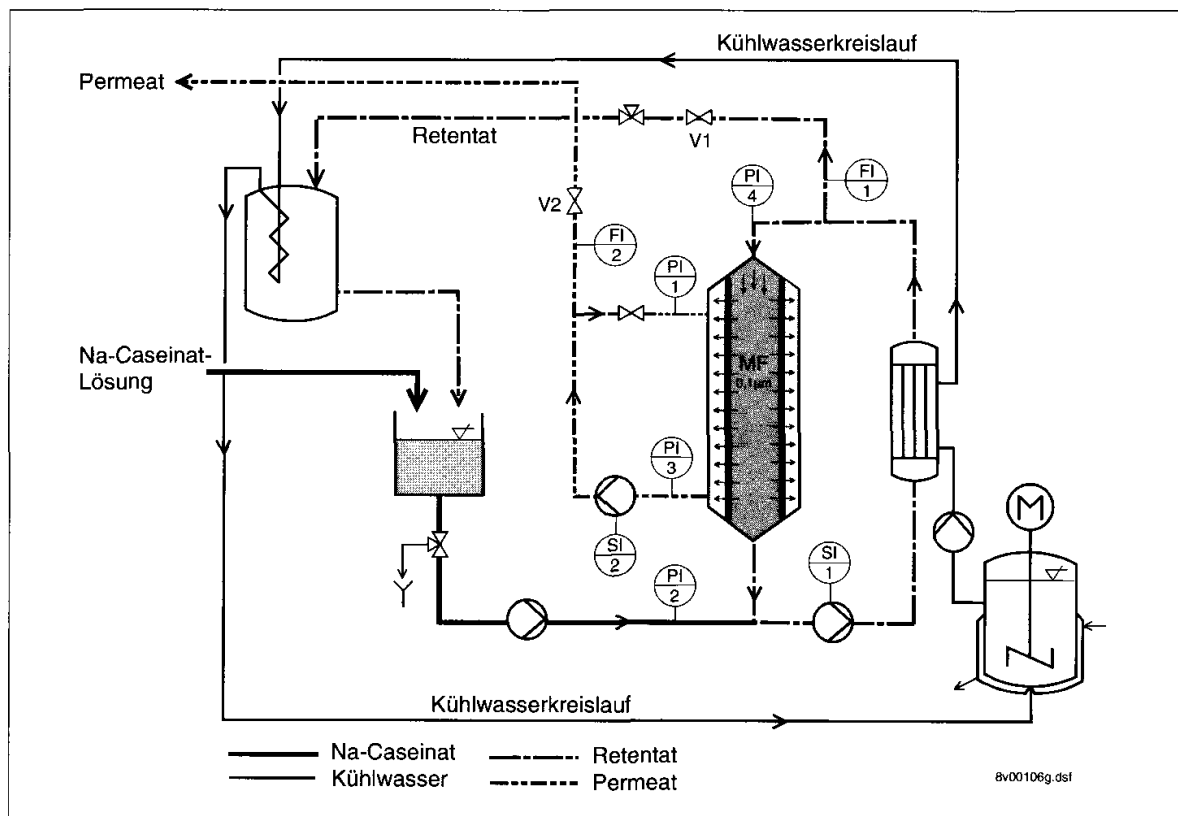


Abb. 3: Verfahrensweg zur Anreicherung von β -Casein durch „kalte“ Mikrofiltration

2.2.3 Analysen

Die Bestimmung der Trockenmasse bei 102 °C, die butyrometrische Fettbestimmung nach Gerber und die komplexometrische Bestimmung von Calcium wurde gemäß dem VDLUFA-Methodenbuch, Band VI, jeweils dreifach durchgeführt (13).

Gleiches galt für die Untersuchungen der N-Verbindungen nach Kjeldahl. Außer dem Gesamteiweißgehalt ($N \times 6,38$) wurde durch Subtraktion des Nicht-Casein-N (NCN) vom Gesamt-N der Caseingehalt ($\text{Casein-N} \times 6,38$) ermittelt. Der Molkenprotein-N ergab sich nach Subtraktion der Nicht-Protein-N-Menge von der NCN-Menge. Durch Multiplikation mit wiederum 6,38 resultierte der Molkenproteingehalt.

Auch die Bestimmung der Caseinfraktionen durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte gemäß VDLUFA-Methodenbuch.

3. Ergebnisse

3.1 Anreicherung von nativem Casein und nativem Molkenprotein

Die Caseinkonzentrate aus 7 Versuchen wiesen nach der Gefriertrocknung eine mittlere Trockenmasse von über 99 % auf. Diese enthielt durchschnittlich 87,5 % Gesamteiweiß, außerdem etwa 9 % Asche (Mineralstoffe), davon fast 3 % Calcium (s. Tab. 1). Als Verhältnis von Casein zu Molkenprotein, analysiert nach Kjeldahl, ergab sich 95,2/4,8, was einem Quotienten von 19,8 entspricht. Damit konnte natives Casein über die Mikrofiltration mit anschließender dreimaliger Diafiltration ausreichend für die anschließend geplanten Versuche zur Schaumfähigkeit konzentriert werden. Ohne Diafiltration ist selbst unter optimalen Bedingungen ein Quotient vom maximal 15 erreichbar (6), während weitere Diafiltrationen zu noch deutlich größeren Quotienten führen können, aber einen entsprechend höheren zeitlichen Aufwand erfordern. Nach Ablauf der Versuchsserie wurde geprüft, ob die nativen Micellen aus der eingesetzten Magermilch durch die gewählten Verfahrensbedingungen in ihrer Größenverteilung verändert wurden. Dazu wurde eine als Rückstellprobe bei -20 °C eingefrorene Magermilch ebenso wie das zugehörige diafiltrierte Retentat aufgetaut und auch das entsprechende Caseinpulver rekonstituiert. Von den drei nun flüssigen Proben, die auf einen Caseingehalt von etwa 3 % eingestellt wurden, wurden elektronenmikroskopische Fotos angefertigt, die in Abb. 4 wiedergegeben sind. Sie zeigen keine sofort erkennbaren Unterschiede in bezug auf die Micellgröße. Um zu quantitativen Aussagen zu gelangen, wurde die jeweilige Partikelgrößenverteilung in den drei Lösungen durch Laserbeugung ermittelt. Wie Abb. 5 zeigt, lagen die volumenbezogenen Verteilungskurven der frischen Magermilch (Daten gespeichert) sowie die der wieder aufgetauten Magermilch- und Retentatproben übereinander. Die Verteilung im rekonstituierten Caseinkonzentrat war nur wenig nach rechts verschoben, möglicherweise bedingt durch das nicht ganz problemlose Wiederauflösen des Pulvers. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass durch die Mikrofiltration und die Diafiltration mit entionisiertem Wasser keine, durch das Gefriertrocknen und Rekonstituieren allenfalls minimale Veränderungen in der Micellgröße auftraten.

Bei der viermal durchgeführten Konzentrierung von nativem Molkenprotein aus Magermilch wurde bei der Mikrofiltration eine Maximaltemperatur von 50 °C eingehalten, um eine thermisch bedingte Teildenaturierung zu verhindern. Das gefriergetrocknete Pulver mit wieder über 99 % Trockenmasse wies im Mittel einen Proteingehalt von fast 96 % i. Tr. auf (Tab. 1), wobei das Verhältnis von Molkenprotein zu Casein bei 93,0/7,0 lag. Offensichtlich war eine sehr geringe Menge an Casein (ca. 0,03 %) in Form kleiner Micellen oder Submicellen ins Permeat gelangt, die durch die nachfolgende Ultrafiltration und den Wasserentzug entsprechend aufkonzentriert wurde.

Im zweiten Molkenproteinkonzentrat, das dreimal aus Labmolke durch Ultra- und Diafiltrationen gewonnen wurde, lag der durchschnittliche Gesamteiweißanteil i. Tr. bei 88 %. Nach Kjeldahl-Analysen ergab sich dann ein Molkenprotein/Casein-Verhältnis von 89,3/10,7. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass auch das Glycomakropeptid (GMP), das durch das Chymosin aus dem κ -Casein der Micellen abgespalten wurde, in die Labmolke überging. Dessen Anteil wurde nicht analysiert.

Tab.1: Analysenergebnisse der nativen Casein- und Molkenproteinkonzentrate

	natives Caseinkonzentrat		natives Molkenproteinkonzentrat		natives Molkenproteinkonzentrat (mit GMP)	
	Retentat nach DF		Retentat nach DF		Retentat nach DF	
	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
Trockenmasse	11,28	0,67	9,24	0,68	12,00	0,53
Asche 550 °C	1,02	0,09	0,23	0,03	0,30	0,05
Ca komplexometrisch	0,330	0,021	0,038	0,005	n.u.	n.u.
Fett Gerber	0,21	0,04	n.u.	n.u.	0,38	0,03
Gesamt-N	1,548	0,094	1,388	0,091	1,655	0,071
Gesamt-Eiweiß	9,87	0,60	8,86	0,58	10,56	0,46
Nichtcasein-N	0,081	0,008	1,291	0,080	1,485	0,063
Casein-N	1,467	0,089	0,097	0,030	0,170	0,024
Casein	9,36	0,57	0,62	0,19	1,08	0,16
Nichtprotein-N	0,007	<0,001	0,007	0,001	0,069	0,009
Molkenprotein-N	0,074	0,008	1,284	0,080	1,416	0,057
Molkenprotein	0,47	0,05	8,19	0,51	9,03	0,37
Gesamt-Eiweiß i.Tr.	87,5	1,0	95,9	1,2	88,0	0,1
Casein/Molkenprotein	95,2/4,8	0,4	7,0/93,0	1,9	10,7/89,3	1,3

n.u.: nicht untersucht

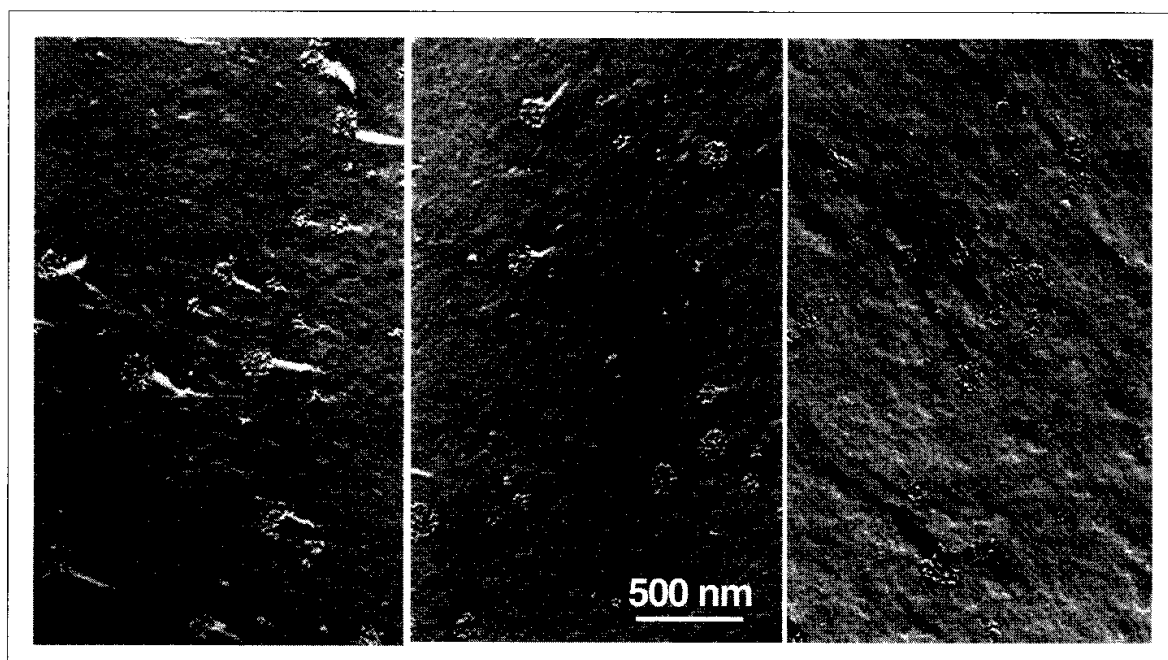


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Caseinlösungen; links: wieder aufgetaute Magermilch, Mitte: wieder aufgetautes Retentat nach Diafiltration (DF), rechts: rekonstituiertes Pulver

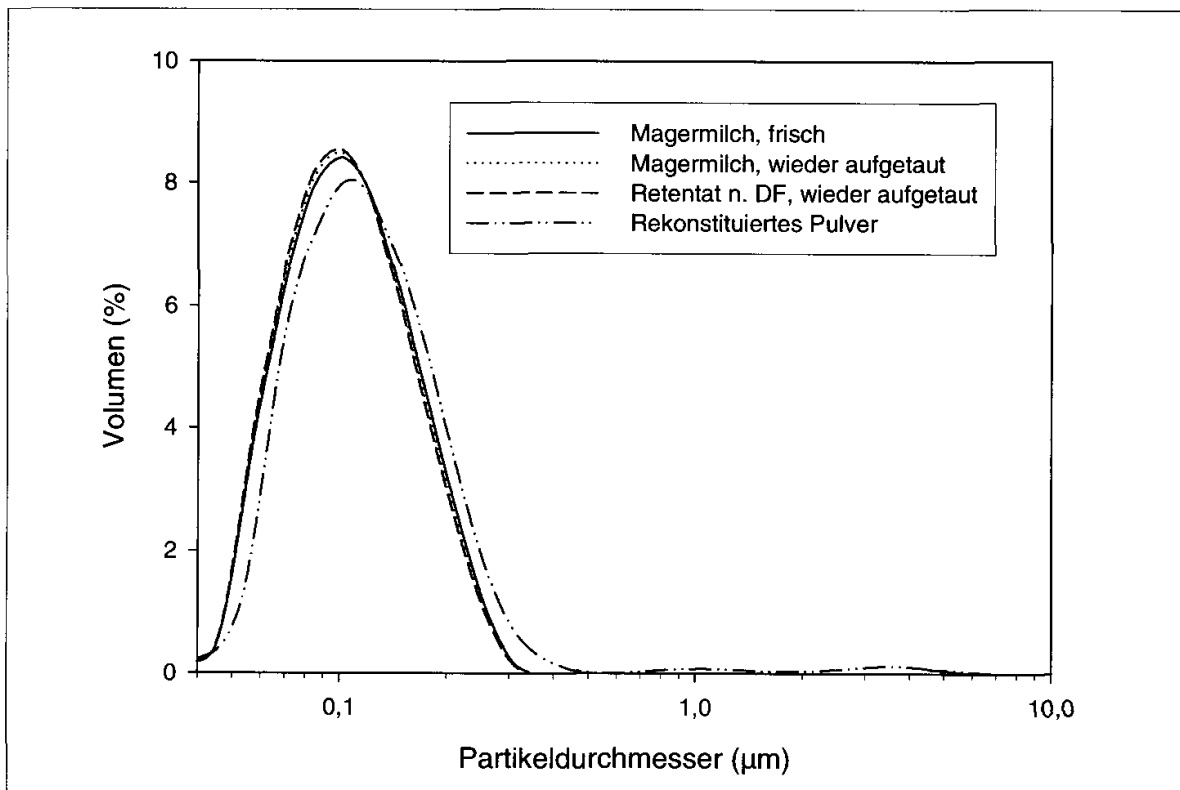


Abb. 5: Partikelgrößenverteilung zur Anreicherung von nativem Casein; ermittelt mit Coulter LS 230, Fa. Beckman-Coulter, Krefeld

3.2 Anreicherung von β -Casein

Nach der Gefriertrocknung in flachen, runden Schalen (Durchmesser 30 cm) mit ebenem Boden resultierten zusammenhängende, leichte, schaumartige Gebilde in der vorgegebenen Form. Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich unterschiedliche, geordnete oder ungeordnete Strukturen mit teilweise sehr dünnen Schichten, die im Durchlicht vollkommen transparent erschienen. Zwei Beispiele sind in Abb. 6 wiedergegeben.

Im eingesetzten Caseinat (1,6 kg) bestand das Protein, nach SDS-Page, zu 43,3 % aus α_s -Casein, zu 34,3 % aus β -Casein und zu 22,4 % aus κ -Casein. Das gefriergetrocknete Produkt enthielt 14,7 bzw. 14,0 % α_s -Casein und 85,3 bzw. 86,0 % β -Casein. Damit konnte eine deutliche Anreicherung von β -Casein über die Mikrofiltration erzielt werden. Bei einem Einsatz von ca. 500 g β -Casein konnten ca. 70 g wiedergewonnen werden, was einer Ausbeute von ca. 14 % entspricht. Wie aber schon die Beschreibung des Verfahrensablaufs deutlich gemacht hat (s. 2.2.2), war das Herstellungsverfahren insbesondere nicht für größere Mengen an konzentriertem β -Casein geeignet. Na-Caseinat stellte aber offensichtlich ein geeignetes Ausgangsprodukt dar. Nachteilig war, dass nur wässrige Lösungen von maximal 2 % eingesetzt werden konnten, ohne die Standzeit der Mikrofiltrationsanlage zu verkürzen. Mit einer indirekten Kühlung durch Wasser-Ethylen-Glykol von -10 °C und eine sogenannte „Backflush-defouling“-Einheit, die einmal pro Minute eine definierte Permeatmenge in den Retentatkanal zurückdrückt, kann aber nach Famelart und Surel (10) einerseits einer pumpenbedingten Erwärmung gegengesteuert und andererseits das Aufbauen von Belägen auf der Mikrofiltrationsmembran (fouling) verzögert werden. Bei orientierenden Versuchen von Murphy und Fox (9) wurde eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Trenngrenze von 300 kD gegenüber einer Mikrofiltrationsmembran mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,1 µm bevorzugt, da sie zu einer besseren Konzentrierung von β -Casein führte. Das Permeat wurde anschlie-

Bend auf pH 4,9 gesäuert, um das dann ausfallende β -Casein abzuzentrifugieren und vor dem Gefriertrocknen bei pH 7,0 zu resuspendieren. Bei dem hier vorgestellten Verfahrensweg wurde auf das Säuern und spätere Neutralisieren verzichtet und sofort eine Gefriertrocknung durchgeführt. Inwieweit sich dies positiv auf die technofunktionellen Eigenschaften des Produkts auswirkt, müsste noch geprüft werden. Zu prüfen wäre außerdem noch, inwieweit micellares Casein als Ausgangsprodukt zu präferieren wäre. Dies hatten Pouliot et al. (11) eingesetzt, die Abtrennung des β -Caseins aber durch Ultrazentrifugieren mit 70.000 g vorgenommen.

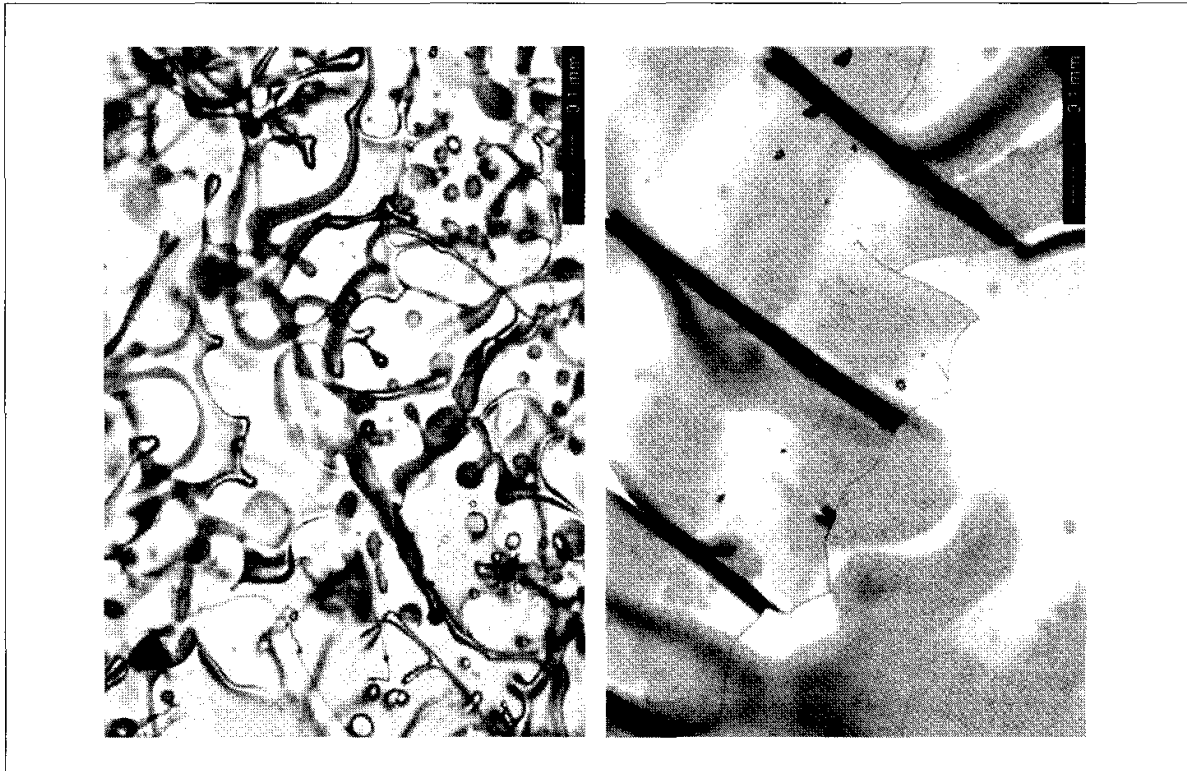


Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von gefriergetrocknetem β -Casein-Konzentrat

Danksagung

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. AiF-Projekt Nr. 14040 N.

Die Autoren danken Frau J. Gonschorek für die umfangreichen, sehr sorgfältig durchgeführten Kjeldahl-Analysen. Herrn Dr.-Ing. C. Kiesner sei für die Berechnungen und Herrn G. Schubert für die technische Umsetzung beim Umbau der Mikrofiltrationsanlage für die Abtrennung von β -Casein gedankt. Frau Dr.-Ing. K. Schrader gebührt unser Dank für die Anfertigung der aufschlussreichen elektronenmikroskopischen Fotos. Wir danken außerdem Frau Dr. G. Suhren und Herrn H.-H. Braun, dass wir die Gefriertrocknungsanlage im Institut für Hygiene und Produktsicherheit so häufig nutzen durften.

4. Literatur

- (1) Kiesner, Ch., Hoffmann, W., Lorenzen, P.C., Clawin-Rädecker, I., Martin, D., Meisel, H., Einhoff, K., Hammer, P., Teufel, P., Suhren, G. : Anwendung der Mikrofiltration bei der Herstellung von Konsummilch mit verlängerter Haltbarkeit. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 57 (3) 139-190 (2005)

- (2) Sachdeva, S., Buchheim, W.: Separation of native casein and whey proteins during crossflow microfiltration of skim milk. *Austral. J. Dairy Technol.* **52** 92-97 (1997)
- (3) Fauquant, J., Maubois, J.L., Pierre, A.: Microfiltration du lait sur membrane minérale. *Technique Laitière* **1028** 21-23 (1988)
- (4) Pierre, A., Fauquant, J., Le Graet, Y., Piot, M., Maubois, J.L.: Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. *Lait* **72** 461-474 (1992)
- (5) Pouliot, M., Pouliot, Y., Britten, M.: On the conventional crossflow microfiltration of skim milk for the production of native phosphocaseinate. *Int. Dairy J.* **6** 105-111 (1996)
- (6) Kersten, M., Hinrichs, J.: „Native“ Caseinkonzentrate durch Mikrofiltration. *Dt. Milchwirtschaft* **51** 312-315 (2000)
- (7) Punidadas, P., Rizvi, S.S.H.: Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. *Food Res. Int.* **31** 265-272 (1998)
- (8) Le Berre, O., Daufin, G.: Microfiltration (0.1 µm) of milk: effect of protein size and charge. *J. Dairy Res.* **65** 443-455 (1998)
- (9) Murphy, J.M., Fox, P.F.: Fractionation of sodium caseinate by ultrafiltration. *Food Chemistry* **39** 27-38 (1991)
- (10) Famelart, M.H., Surel, O.: Caseinate at low temperature: calcium use in β-casein extraction by microfiltration. *J. Food Sci.* **59** 548-553 (1994)
- (11) Pouliot, M., Pouliot, Y., Britten, M., Maubois, J.L., Fauquant, J.: Study of the dissociation of β-casein from native phosphocaseinate. *Lait* **74** 325-332 (1994)
- (12) Hekken, D.L. van, Holsinger, V.H.: Use of cold microfiltration to produce unique β-casein enriched milk gels. *Lait* **80** 69-76 (2000)
- (13) VDLUFA-Methodenbuch, Band VI, VDLUFA-Verlag, Bonn (2003)

5. Zusammenfassung

Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.: **Anreicherung von Milcheiweißfraktionen durch Mikrofiltration.** *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **58** (1) 41-51 (2006)

21 Milchwirtschaftliche Technologie (Mikrofiltration, Caseinkonzentrat, Molkenprotein-konzentrat)

Für die spätere Untersuchung der Schaumbildungseigenschaften von Milch und insbesondere von daraus fraktionierten und enzymatisch modifizierten Milchproteinen wurden im Rahmen eines Forschungsvorhabens zunächst natives Caseinkonzentrat und zwei native Molkenproteinkonzentrate gewonnen, außerdem orientierende Versuche zur Anreicherung von β-Casein durchgeführt.

Die Caseingewinnung aus Magermilch erfolgte über das Retentat einer Mikrofiltration mit einem mittleren Porendurchmesser der Membran von 0,1 µm. Das gefriergetrocknete Caseinkonzentrat enthielt in der Trockenmasse durchschnittlich 87,5 % Gesamteiweiß, außerdem etwa 9 % Asche (Mineralstoffe), davon fast 3 % Calcium. Als Verhältnis von Casein zu Molkenprotein, analysiert nach Kjeldahl, ergab sich 95,2/4,8, was einem Quotienten von 19,8 entspricht. Durch elektronenmikroskopische Fotos und Laserbeugung konnte gezeigt werden, dass durch die Mikro- und Diafiltration keine, durch das Gefrier-trocknen und Rekonstituieren des Pulvers allenfalls minimale Veränderungen in der Größenverteilung der Caseinmicellen auftraten. Das Permeat der gleichen Mikrofiltration diente als Zwischenprodukt bei der Gewinnung von nativem Molkenprotein durch nachfolgende Ultrafiltration. Das zweite Molkenproteinkonzentrat wurde aus Labmolke durch Ultrafiltration gewonnen.

Zur Abtrennung von β -Casein wurde eine 2 %ige Na-Caseinat-Lösung, 20 Std. bei 2 °C gelagert, einer Mikrofiltration mit wiederum 0,1 μm bei < 3 °C unterzogen und das erhaltene Permeat durch nachfolgende Ultrafiltration eingeengt und gefriergetrocknet. Das Pulver enthielt etwa 86 % β -Casein und 14 % α_s -Casein. Der Verfahrensweg war aber, trotz der erzielten Konzentrierung, nicht für die Herstellung größerer Mengen an β -Casein geeignet.

Summary

Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.: **Enrichment of milk protein fractions by microfiltration**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (1) 41-51 (2006)

21 Dairy technology (microfiltration, casein concentration, whey protein concentration)

A research project deals with the foaming properties of milk and, particularly, of fractionated and enzymatically modified milk proteins. It requires the production of native casein concentrate, two native whey protein concentrates and experiments for the enrichment of β -casein.

Casein was produced by microfiltration (0.1 μm) of skimmed milk. The freeze-dried casein concentrate contained 87.5 % total protein in dry matter and 9 % ash (minerals) with nearly 3 % calcium. The ratio of casein to whey protein, analyzed according to Kjeldahl, came to 95.2/4.8, resulting in a quotient of 19.8. It was demonstrated by electron microscopy and laser diffraction that the particle size distribution of the casein micelles was not at all influenced by micro- and diafiltration, and at the most slightly by freeze-drying and reconstitution of the powder. The permeate of microfiltration served as an intermediate product at the concentration of native whey protein via subsequent ultrafiltration. The second whey protein concentrate was obtained from rennet whey by ultrafiltration.

To separate β -casein a 2 % sodium caseinate solution stored for 20 h at 2 °C was microfiltered with 0.1 μm at < 3 °C. The resulting permeate was concentrated by subsequent ultrafiltration and freeze-dried. The powder contained approx. 86 % β -casein and 14 % α_s -casein. In spite of the achieved concentration the procedure was not suitable for the production of larger quantities of β -casein.

Résumé

Hoffmann, W., Johannsen, N., Ströbel, D.: **Enrichissement de fractions de protéines lactiques par microfiltration**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (1) 41-51 (2006)

21 Technologie laitière (microfiltration, concentration de caséine, concentration de protéines de lactosérum)

Dans le cadre d'un projet de recherche scientifique un concentré natif de caséine et deux concentrés natifs de protéines de lactosérum ont été obtenus afin d'analyser les

propriétés de moussage du lait et en particulier les protéines lactiques fractionnées et enzymatiquement modifiées. En plus des essais d'orientation pour enrichir la beta-caséine ont été réalisés.

La caséine était produite par microfiltration (0.1 μm) du lait écrémé. Le concentré de caséine lyophilisé contenait 87,5 % de protéine totale en matière sèche, en plus 9 % de cendre (minéraux) dont env. 3 % de calcium. La relation entre la caséine et la protéine du lactosérum, analysé selon Kjeldahl, comportait 95.2/4.8, avec un quotient de 19,8. Des photographies électromicroscopiques et la diffraction laser ont pu démontrer que la microfiltration et la diafiltration ne causent pas de modifications tandis que la lyophilisation et la reconstitution de la poudre causent des modifications minimales dans la distribution de taille des caséines micellaires. Le perméat de microfiltration servait comme produit intermédiaire lors de la concentration de la protéine native de lactosérum suite à une ultrafiltration ultérieure. Le deuxième concentré de protéine du lactosérum était obtenu de la présure de lactosérum par ultrafiltration.

Pour séparer la beta-caséine une solution de caseinate de sodium de 2 % stockée pour 20 h à 2 °C était microfiltrée de nouveau avec 0,1 μm à < 3 °C. Le perméat obtenu était rétréci et lyophilisé par ultrafiltration ultérieure. La poudre contenait env. 86 % de β -caséine et 14 % de α_s caséine. Malgré la concentration obtenue, la procédure n'était pas appropriée pour produire des quantités plus grandes de β -caséine.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Herausheben möchte ich besonders:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. P. Chr. Lorenzen für die Themenstellung, seine fortwährende Diskussionsbereitschaft, seine intensive Betreuung und seine motivierende mentale Unterstützung.
- Meine Kollegen in der Arbeitsgruppe, Peter Balkowski, Kurt Einhoff, Gerda Köpke, Inge Spreckels, Sabine Splitzer und besonders Ernst Johannsen für die Hilfe bei den Versuchen, der Herstellung von Milch, der Lactosebestimmung, beim Fotografieren und Zeichnen, der technischen Unterstützung, der moralischen Unterstützung u.v.m..
- Aus der Arbeitsgruppe in der Verfahrenstechnik, Dr. Wolfgang Hoffmann, Johanna Gonschorek, Norbert Johannsen, Nadine Pelka, Dr.-Ing. Kathrin Schrader und Herrn Schubert für Analysen, Mikro- und Ultrafiltration, Gespräche, Diskussionen u.v.m..
- Aus anderen Arbeitsgruppen, Prof. Dr. Meisel, Enken Jacobsen, Björn Neumann, Dr. Clawin-Rädecker und Dr. Martin für RP-HPLC-Untersuchungen, Aminosäure-analysen u.v.m..
- Dr. Wilhelm Bockelmann und aus seiner Arbeitsgruppe Vera Meiners und Kathrin Schumann für die Hilfe und Unterstützung bei Versuchen im Institut für Mikrobiologie.
- M Sc Beate Hiller für viele intensive Diskussionen, mentale Unterstützung und Freundschaft.
- Meine Eltern für Hilfsbereitschaft in jeder Hinsicht.
- Meinen Freund und meine Schwestern für Motivation und Korrekturen.

Ein Teil der Versuche wurde im Rahmen des AIF-Forschungsvorhabens Nr. 14040 N durchgeführt.

DOROTEA ANNA BARBARA STRÖBEL

PERSÖNLICHE INFORMATION

Geburtsdatum 21.02.1979
Geburtsort Osnabrück (Niedersachsen)
Familienstand Ledig
Staatsangehörigkeit Deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

07/1985 – 07/1992 Freie Waldorfschule Evinghausen
07/1992 – 07/1998 Gymnasium Bad Essen und Ratsgymnasium Osnabrück: Abschluss mit Abitur

STUDIUM

10/1998 – 03/2002 Studium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Fachrichtung Ernährungswissenschaften, Abschluss mit Bachelor of Science
03/2002 – 11/2003 Studium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Fachrichtung Ernährungswissenschaften, Abschluss mit Master of Science
09/2002 – 02/2003 Studium an der School of Biosciences der Nottingham University (GB) im Rahmen des Erasmus/Sokrates-Austauschprogramms

BERUFLICHER WERDEGANG

10/2003 – 04/2004 Praktikum im Qualitätswesen der H. & J. Brüggel KG Lübeck
04/2004 – 12/2004 Assistentin des Technischen Leiters bei der H. & J. Brüggel KG Lübeck
01/2005 – 09/2006 Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Chemie und Technologie der Milch an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), Standort Kiel im Forschungsvorhaben „Schaumbildungseigenschaften von Milch sowie daraus fraktionierten und enzymatisch modifizierten Milchproteinen“
Anfertigung der Dissertation „Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und –hydrolysaten“
Seit 09/2006 Volontärin im Institut für Chemie und Technologie der Milch an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL), Standort Kiel