

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Alternative Caseinpräparate und deren Wirkung in säureinduzierten Milchgelen

Alternative casein preparations and their effects in acid-induced milk gels

von: Penke, Yvonne

zur

Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M. Sc.)

vorgelegte Masterarbeit

URN:	urn:nbn:de:gbv:519-thesis2016-0094-9
Tag der Einreichung:	15.02.2017
Gutachter:	Prof. Dr. Siegfried Bolenz Dr. Doris Jaros

Referat

Alternative Caseinpräparate und deren Wirkung in säureinduzierten Milchgelen

Penke, Y. – Dresden: Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen, Masterarbeit, 2016, 101 Seiten, 46 Abbildungen, 23 Tabellen.

Casein bietet durch seine Schaum- und Emulgiereigenschaften vielfältige Anwendungsgebiete in der Lebensmittelindustrie. Dabei werden vor allem β - und κ -Casein eingesetzt, während zurückbleibendes α -Casein aufgrund der schwierigen Fraktionierung kaum Anwendung findet. Ziel der Arbeit war es, diese drei Fraktionen zu isolieren und den Einfluss der Fraktionen auf die Bildung säureinduzierter Gele zu untersuchen.

Rekonstituierte Magermilch wurde zur Isolierung von β -Casein bei 3,5 °C mikrofiltriert. Das Retentat wurde zur Isolierung von α - und κ -Casein einer Calciumchlorid-Fällung bei basischem pH unterzogen. Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Aus den einzelnen Caseinfraktionen wurden verschiedene fraktionierte Natriumcaseinatlösungen (fNCL) hergestellt. Als Referenz diente eine kommerzielle Natriumcaseinatlösung (kNCL) aus kommerziellem Säurecasein. Durch Säuerung mit Glucono- δ -Lacton konnte die Gelbildung der NCL sowie damit angereicherter Magermilch untersucht werden. Zusätzlich wurde die Synärese der angereicherten Magermilch bestimmt.

Durch Mikrofiltration wurde β -Casein mit einer Ausbeute von 15 %, einer Wiederfindung von 41 % und einer Reinheit von 88 % gewonnen. Mittels Calciumchlorid-Fällung wurden α - und κ -Casein mit einer Ausbeute von 20 % und 6 %, einer Wiederfindung von 36 % und 52 % und einer Reinheit von 40 % und 52 % isoliert. Die Quervernetzung durch mTGase führte in den hergestellten säureinduzierten α -, α - κ - und α - β - κ -fNCL zu steiferen Gelen, allerdings waren diese weniger steif als die Gele der Referenzprobe kNCL. Da jede fNCL α -Casein enthielt, ist die verminderte Gelbildung auf diese Fraktion zurückzuführen. Die Anreicherung von Magermilch mit unbehandelten sowie enzymbehandelten fNCL bedingte steifere Gele, wobei lediglich die Enzymbehandlung der α -fNCL zu steiferen Gelen führte. In zukünftigen Arbeiten sollte die Isolierung der α -Caseinfraktion optimiert werden.

Abstract

Alternative casein preparations and their effects in acid-induced milk gels

Penke, Y. – Dresden: Technische Universität Dresden, Faculty Mechanical Engineering, Master thesis, 2017, 101 pages, 46 figures, 23 tables.

Because of its foam and emulsifying properties casein offers various areas of application for the food industry. Thereby particularly β - and κ -casein are being used while α -Casein is hardly applicable because of the difficult isolation process. The aim of this thesis was to isolate these three fractions and to explore their influence on the development of the acid induced gels.

Reconstituted skim milk was microfiltrated to isolate β -casein at the temperature of 3,5 °C. The retentate was subjected to calcium chloride precipitation at basic pH to isolate α - and κ -casein. Yield, recovery and purity of the individual fractions were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Various fractionated sodium caseinate solutions (fNCL) were prepared from the individual casein fractions. A commercial sodium caseinate solution (kNCL) from commercial acid casein served as a reference. By acidification with glucono- δ -lactone the gel formation of the NCL as well as NCL-enriched skimmed milk was investigated. In addition, the syneresis of the enriched skimmed milk was determined.

By microfiltration, β -casein was recovered with a yield of 15%, a recovery of 41% and a purity of 88%. By means of calcium chloride precipitation, α - and κ -casein were isolated with a yield of 20% and 6%, a recovery rate of 36% and 52% and a purity of 40% and 52%. The cross-linking by mTGase led to stiffer gels in the acid-induced α -, α - κ -, α - β - κ -fNCL, but they were less stiff than the gels of the reference sample kNCL. Since each fNCL contained α -casein, the reduced gel formation is attributable to this fraction. The enrichment of skim milk with untreated and enzyme treated fNCL led to stiffer gels, whereby only the enzyme treatment of α -fNCL causes stiffer gels. The isolation of the α -casein fraction should be optimized in future work.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN

Fakultät Maschinenwesen

Aufgabenstellung für die Masterarbeit

<i>im Studiengang</i>	Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie
<i>in der Studienrichtung</i>	Produktion
<i>Name der Masterandin</i>	Yvonne Penke

Thema: Alternative Caseinpräparate und deren Wirkung in säureinduzierten Milchgelen

Zielsetzung:

Bei der Herstellung von Joghurt wird vor der Fermentation die Trockenmasse der Milch erhöht, um akzeptable Textureigenschaften zu erhalten können. Dafür werden Mager- milch-, Casein- oder Molkenpulver eingesetzt. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Caseinzusammensetzung und enzymatischer Caseinverknüpfung von Natriumcaseinat auf dessen Eignung für die Joghurtherstellung zu untersuchen. Dabei sollen folgende Teilaufgaben bearbeitet werden:

1. Literaturrecherche zu technofunktionellen und ernährungsphysiologischen Besonderheiten der einzelnen Caseintypen sowie zur Wirkung von mTGase in säureinduzierten Milchgelen.
2. Optimierung von Methoden zur Abreicherung von α -, β - und κ -Casein aus micellarem Casein
3. Herstellung und Charakterisierung von Natriumcaseinatpräparaten mit unterschiedlicher Caseinzusammensetzung.
4. Untersuchung der rheologischer Eigenschaften und Synäreseneigung von Modellmilchgelen mit den hergestellten Natriumcaseinatpräparaten

Die praktischen Arbeiten werden am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik durchgeführt.

Betreuer: Prof. Dr. Siegfried Bolenz, Dr. Doris Jaros, Dipl.-Ing. Norbert Raak

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung und Zielstellung	9
2 Theoretische Grundlagen.....	11
2.1 Casein	11
2.1.1 Eigenschaften und Aufbau	11
2.1.2 Caseinmicelle	11
2.1.3 Caseinfraktionen	14
2.1.3.1 Calciumsensitivität.....	14
2.1.3.2 α -Casein.....	15
2.1.3.3 β -Casein.....	16
2.1.3.4 κ -Casein.....	17
2.1.4 Stabilität des Caseins.....	18
2.2 Methoden zur Caseinfraktionierung	19
2.2.1 Entwicklung	19
2.2.2 Gewinnung von Caseinfraktionen	19
2.2.3 Gewinnung von Caseinfraktionen unter Erhalt der Lebensmittelqualität ..	20
2.2.3.1 Calciumchlorid-Fällung bei basischem pH	20
2.2.3.2 Solubilisierung bei niedrigen Temperaturen	21
2.2.3.3 Membranfiltration	22
2.3 Wirkungsweise von Transglutaminase an Caseinen	24
2.3.1 Mikrobielle Transglutaminase.....	24
2.3.2 Enzymatisch verknüpfte Caseine in säureinduzierten Gelen	25
2.3.2.1 Herstellung säureinduzierter Gele.....	25
2.3.2.2 Zugänglichkeit der Substrate.....	25
2.3.2.3 Enzymatische Verknüpfung in säureinduzierten Milchgelen	26
2.3.2.4 Enzymatische Verknüpfung in säureinduzierten Caseingelen.....	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Projektübersicht	29
3.2 Chemikalien	30
3.3 Basismilch	31
3.4 Gewinnung der einzelnen Caseinfraktionen.....	31
3.4.1 Membranfiltration	31

3.4.1.1	Durchführung	31
3.4.1.2	Variationen in der Durchführung der Membranfiltration	33
3.4.2	Calciumchlorid-Fällung bei basischem pH	34
3.4.2.1	Durchführung	34
3.4.2.2	Variationen in der Durchführung der Calciumchlorid-Fällung	36
3.5	<i>Analytische Methoden</i>	36
3.5.1	Trockenmasse und Aschegehalt	36
3.5.2	Proteingehalt nach der Kjeldahl-Methode	36
3.5.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.5.4	Gelpermeationschromatographie	39
3.6	<i>Charakterisierung der Caseinfraktionen</i>	41
3.7	<i>Herstellung der Probenlösungen</i>	41
3.7.1	Herstellung von Natriumcaseinatlösungen	41
3.7.2	Inkubation mit mikrobieller Transglutaminase	42
3.7.3	Herstellung von angereicherter rekonstituierter Magermilch	43
3.8	<i>Dynamische Messungen am Rheometer</i>	43
3.9	<i>Bestimmung der Synäreseneigung</i>	44
3.10	<i>Thromboelastometrie</i>	45
3.11	<i>Statistische Auswertung der Daten</i>	46
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	<i>Gewinnung von Caseinfraktionen</i>	47
4.1.1	Charakterisierung Magermilchpulver	47
4.1.2	Hinweise zur Auswertung	47
4.1.3	Ermittlung der maximalen β -Caseinausbeute	48
4.1.4	Variation der Calciumchlorid-Fällung	50
4.1.4.1	Filtrationsmethoden	50
4.1.4.2	Zugabe des Calciumchlorids in kristalliner oder gelöster Form	50
4.1.4.3	Einfluss der Fällungstemperatur auf die Isolierung von α - und β -Casein	52
4.1.4.4	Einfluss des pH auf die Isolierung von κ -Casein	53
4.1.4.5	Vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung	54
4.2	<i>Charakterisierung der Caseinfraktionen</i>	56
4.2.1	α -Casein	56
4.2.2	β -Casein	58
4.2.3	κ -Casein	59

4.2.4	Herstellung der fraktionierten Natriumcaseinatlösung	60
4.3	<i>Gelbildungsuntersuchungen</i>	61
4.3.1	Vergleich der Säuerungskurven	61
4.3.2	Einfluss der Hitzebehandlung von Milch auf deren Gelbildungseigen- schaften	63
4.3.3	Enzymatische Quervernetzung kommerziellen Natriumcaseinatlösung und damit angereicherter Milch	64
4.3.3.1	Enzymatische Quervernetzung kommerzieller Natriumcaseinatlösung	64
4.3.3.2	Wirkung enzymatisch quervernetzter kommerzieller Natriumcaseinat- lösung in Magermilch	66
4.3.3.3	Vergleich von dynamisch oszillierenden Messungen und Thromboelasto- metrie	68
4.3.3.4	Beginn der Gelbildung	70
4.3.4	Enzymatische Quervernetzung fraktionierter Natriumcaseinatlösung und damit angereicherter Milch	72
4.3.4.1	Enzymatische Quervernetzung fraktionierter Natriumcaseinatlösung	72
4.3.4.2	Wirkung enzymatisch quervernetzter fraktionierter Natriumcaseinatlösung in Magermilch	74
4.3.4.3	Beginn der Gelbildung	76
4.3.5	Synäreseneigung	78
5	Zusammenfassung und Ausblick	80
6	Literaturverzeichnis	82
	Verzeichnis der Abbildungen	90
	Verzeichnis der Tabellen	94
	Anhang	96

Abkürzungsverzeichnis

α -La	α -Lactalbumin
β -Lg	β -Lactoglobulin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CMP	Caseinomakropeptid
F	Filtration
G' _{max}	Maximaler Speichermodul
GDL	Glucono- δ -Lacton
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
MA	Maximale Amplitude
MM	Magermilch
MMP	Magermilchpulver
mTGase	Mikrobielle Transglutaminase
NaOH	Natriumhydroxid
NCL	Natriumcaseinatlösung
RMM	Rekonstituierte Magermilch
SCL	Säurecaseinlösung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
V	Versuch

1 Einleitung und Zielstellung

Milchproteine haben in der Lebensmittelindustrie wichtige ernährungsphysiologische sowie technologische Funktionen. Wegen ihrer besonderen biologischen Wertigkeit werden sie als Nahrungsergänzungsmittel für Menschen mit erhöhtem Proteinbedarf (z. B. Sportler) eingesetzt. Die biologische Wertigkeit sagt aus, wie viel g Körpereiwweiß aus 100 g Nahrungsprotein gebildet werden können. Molkenprotein hat mit 124 eine höhere biologische Wertigkeit als Casein mit 73 und wird deswegen in den meisten Eiweißpulvern eingesetzt. Molkenproteine enthalten jedoch Phenylalanin und sollten daher von Menschen mit Phenylketonurie nicht verzehrt werden. Diese Menschen können die Aminosäure Phenylalanin nicht abbauen, was zur Bildung gefährlicher Stoffwechselprodukte und daraus folgend geistiger Störungen führt (Spreer, 2011). Eine phenylalaninarme Eiweißquelle ist z. B. das Caseinomakropeptid (CMP), ein Hydrolyseprodukt des κ -Caseins. CMP wird auch prebiotisch zur Wachstumsförderung von Bifidobakterien eingesetzt (Janer et al., 2004). Casein wird außerdem zur Herstellung von Säuglingsanfangsnahrung, essbaren Überzügen und biologisch abbaubaren Kunststoffen genutzt (Law & Leaver, 2003).

Die technologischen Funktionen von Casein sind vielfältig. Die Herstellung von Käse beruht auf der Gerinnung des Caseins. Des Weiteren ist Casein verantwortlich für die Gelbildung in der Joghurtherstellung (Spreer, 2011). Die einzelnen Fraktionen des Caseins besitzen individuelle technologisch interessante Eigenschaften und bringen neue Möglichkeiten in der Lebensmittelindustrie. Aus den Fraktionen können durch proteolytische Spaltung verschiedene bioaktive Peptide mit vielfältigen Eigenschaften isoliert werden (Law & Leaver, 2003). So besitzt das CMP gute Schaum- und Emulgiereigenschaften sowie die Fähigkeit zur kälteinduzierten Gelbildung (Farías, et al., 2010). Aus β -Casein isolierte Peptide besitzen gute Emulgier- und Schaumbildungseigenschaften. So können sie als natürlicher Emulgator und Stabilisator in Clean-Labeling-Produkten eingesetzt werden (Atamer et al, 2016).

Vor allem der Zusatz von Casein in der Joghurtherstellung hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Zahlreiche Studien befassten sich mit den Gelbildungseigenschaften des Caseins in Milch, allerdings nicht mit einzelnen Caseinfraktionen (α -, β - und κ -Casein). β - und κ -Casein finden bereits reichlich Anwendung in der Industrie (Atamer et al., 2016; Farías et al., 2010), wohingegen

über α -Casein in der Literatur keine Anwendungsgebiete zu finden sind. Vor allem die Isolierung von α -Casein stellt noch ein großes Problem dar. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Isolierung und rheologischen Charakterisierung dieser einzelnen Caseinfraktionen. Dazu wurden die Fraktionen α -, β - und κ -Casein aus rekonstituierter Magermilch (RMM) isoliert. Zur Isolierung von β -Casein wurde die kalte Mikrofiltration und zur Isolierung von α - und κ -Casein die selektive Fällung mit Calciumchlorid (CaCl_2) eingesetzt. Die Fraktionen sollten mit einem deformationsgesteuerten Rheometer untersucht werden, um Erkenntnisse über die Quervernetzung in säureinduzierten Milchgelen zu gewinnen. Als Referenz wurde kommerzielles Säurecasein herangezogen. Die Fraktionen wurden mit Natriumhydroxid versetzt, um Natriumcaseinatlösung (NCL) herzustellen. Es wurden die Gelbildungseigenschaften der NCL und mit NCL angereicherter Milch nach Säuerung mit Glucono- δ -lacton gemessen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Casein

2.1.1 Eigenschaften und Aufbau

Kuhmilch enthält durchschnittlich 3,4 % Protein, welches sich aus einem Verhältnis von ca. 4:1 aus Casein und Molkenprotein zusammensetzt (Spreer, 2011). Casein ist eine Gruppe von Phosphoproteinen, die aus α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein besteht (Graham et al., 1984). Es gibt außerdem γ - und λ -Casein, welche in vielen Publikationen nicht erwähnt werden, da es sich um Abbauprodukte von β - bzw. α -Casein handelt. Abgebaut werden sie durch das in der Milch enthaltene Enzym Plasmin (Grieve & Kitchen, 1985; Meisel, 1990; Schmidt, 1982). Die Caseinfractionen liegen in der Milch assoziiert zu Caseinmicellen vor. Der isoelektrische Punkt der Caseinmicelle liegt bei 4,6. Das bedeutet es herrscht ein Gleichgewicht an positiven und negativen Ladungen, die elektrostatischen Kräfte sowie das Wasserbindevermögen nehmen ab und es kommt zur Aggregation der Caseine (Baltes, 2000; Pelegriane & Gasparetto, 2005). Die Gewinnung der einzelnen Fraktionen beruht auf deren verschiedenen Eigenschaften (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Ausgewählte Eigenschaften der einzelnen Caseinfractionen (Schmidt, 1982; Kersten, 2001).

Caseinfraction	Anteil an der Trockenmasse der Caseinmicellen [g/100g]	Isoelektrischer Punkt [pH]	Molekulargewicht [Da]	Calciumsensitivität*
Casein		4,6		
α_{s1} -Casein	35,6	4,1 – 4,8	23 600	++
α_{s2} -Casein	9,9	5,1	25 200	+++
β -Casein	33,6	5,3	24 000	+
κ -Casein	11,9	4,1 – 4,5	19 000	-
γ - und λ -Casein	2,3			

* „-“ nicht sensitiv; „+“ sensitiv; „++“ stark sensitiv; „+++“ sehr stark sensitiv

2.1.2 Caseinmicelle

In Milch liegen die vier Caseinfractionen α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein assoziiert zu kolloidalen Partikeln vor. Diese werden Caseinmicellen genannt und haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 150 nm (Fox & Brodkorb, 2008). Neben den einzelnen Caseinfractionen enthalten Caseinmicellen noch 6,7 % anorganische Substanzen, insbesondere Calcium und Phosphat (Schmidt, 1982). Aufgrund der Veresterung von Serin (und selten Threonin) mit Phosphorsäure können Calcium und Magnesium an Caseinmoleküle binden und es kommt zur Ausbildung von

Brücken zwischen und innerhalb der Moleküle (Herrmann et al., 1988; Swaisgood, 1992). Die poröse Caseinmicelle besteht aus einem hydrophoben Kern calciumsensitiver Caseine, der von einem „Hairy Layer“ aus glykosyliertem κ -Casein umgeben ist (Fox & Brodkorb, 2008; Qi, 2007).

Wie Caseinmicellen aufgebaut sind und wie sich die Micellen formen, wird seit vielen Jahren in der Wissenschaft erforscht und diskutiert. Die drei gängigsten Modelle sind das Submicell-Modell, das Nanocluster-Modell und das Dual-Binding-Modell, von denen das Nanocluster-Modell derzeit den meisten Zuspruch findet (de Kruif et al., 2012; Tuinier & de Kruif, 2002).

Nach dem Submicellen-Modell von Schmidt lagern sich Caseinmoleküle aufgrund hydrophober Interaktionen zu Untereinheiten (Submicellen) mit jeweils 15-20 Caseinmolekülen zusammen (Horne, 2006). Es gibt Submicellen, die hauptsächlich aus α - und β -Casein aufgebaut sind, und Submicellen, die hauptsächlich aus α - und κ -Casein bestehen (Walstra, 1999). Die κ -caseinarmen Submicellen konzentrieren sich im Inneren der Micelle und die κ -caseinreichen Submicellen lagern sich an der Oberfläche an (Horne, 2006). Die Submicellen sind durch kleine Calciumphosphat-Cluster miteinander verknüpft (Walstra, 1999). Der „Hairy Layer“, also die herausragenden hydrophilen κ -Casein-Elemente, verhindern durch sterische und elektrostatische Repulsion die weitere Aggregation (Horne, 2006). Das nach Schmidt (1982) von Walstra (1999) aufgearbeitete schematische Modell ist in Abbildung 2-1 zu sehen.

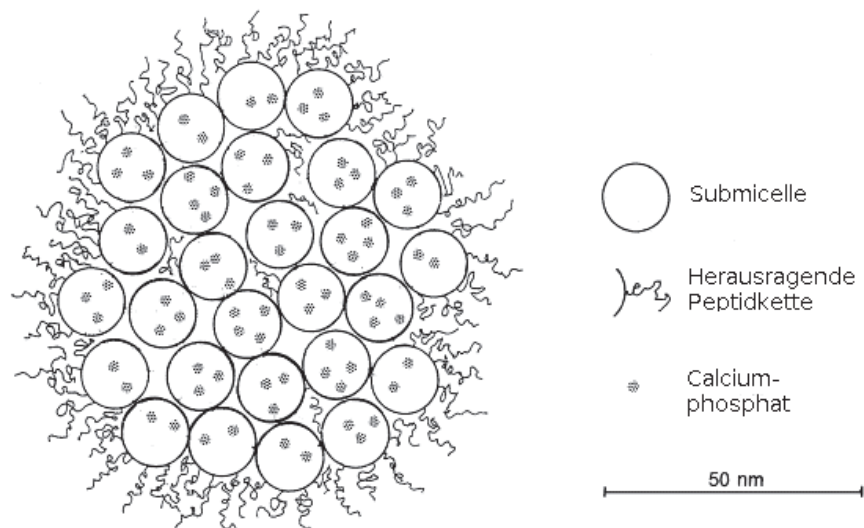


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Submicellen-Modells: Im Inneren befinden sich κ -caseinarme und an der Oberfläche κ -caseinreiche Submicellen mit vorstehenden C-Terminal-Segmenten des κ -Caseins (Walstra, 1999).

Im Nanocluster-Modell von Holt (1998) sind die Interaktionen zwischen Caseinen und Calciumphosphat die stabilisierende Kraft. Die Verbindung des

Calciumphosphates mit den Phosphoserin-Resten der calciumsensitiven Caseinmoleküle wird auch Calciumphosphat-Nanocluster genannt. Von diesen Calciumphosphat-Nanoclustern ($r = 2,3 \text{ nm}$) gibt es über 800 in der Micelle (Abbildung 2-2). α_{s1} - und α_{s2} -Caseinmoleküle besitzen mehr als zwei dieser Cluster und können diese daher in erweiterte dreidimensionale Netzwerkstrukturen querverbinden (Holt et al., 2009; Horne, 2006; Qi, 2007).

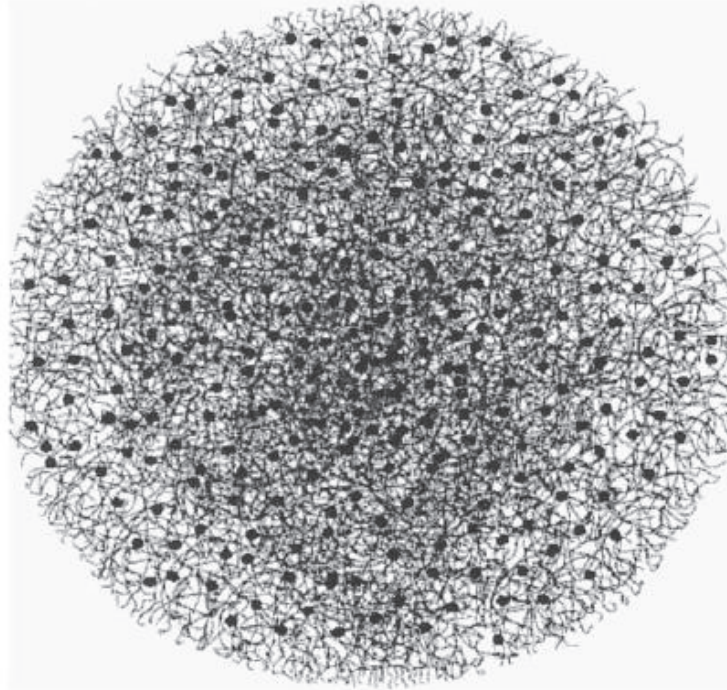


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Nanocluster-Modells. Die fadenähnlichen Gebilde stellen die einzelnen Caseinmonomere und die schwarzen Punkte die Calciumphosphat-Nanocluster dar (de Kruif & Holt, 2003).

Im Dual-Bonding-Modell nach Horne (1998) (Abbildung 2-3) bewirken die individuellen Molekülabschnitte der einzelnen Caseinfraktionen Protein-Protein-Interaktionen (Qi, 2007). Die amphiphilen Caseine bilden einerseits über ihre hydrophilen Regionen Brückenbindungen mit den Calciumphosphat-Clustern und andererseits intermolekulare Bindungen mit anderen Caseinen über ihre hydrophoben Blöcke aus (Horne, 2002b; Qi, 2007). Dabei schränken elektrostatische Abstoßungen das Wachstum der Micelle ein. α - und β -Casein aggregieren durch hydrophobe Interaktionen. Durch die Bindung des kolloidalen Calciumphosphates an die Phosphoserinreste der Caseinmoleküle werden diese neutralisiert. So wird die elektrostatische Abstoßung reduziert und Caseinmoleküle können weiterhin aggregieren. Im Gegensatz dazu verknüpft sich κ -Casein nicht mit anderen Molekülen, da es keine Phosphoserinreste im hydrophilen Molekülabschnitt zur Bindung von Calcium besitzt. So begrenzt es das Micellwachstum (Phadungath, 2005). Partschefeld (2012) vermutete, dass

β -Casein sich vorrangig im äußeren Micellbereich befindet, während α -Casein hauptsächlich im Inneren der Micelle lokalisiert ist. Die schichtartig laminar verknüpften β -Caseine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den apolaren Schwänzen in der Micelle zusammengehalten. Horne (1998) betrachtet α -Casein aufgrund seiner Hydrophobizität als kettenförmig angeordnet. Das κ -Casein befindet sich auf der Oberfläche der Micelle in Form eines „Hairy Layers“ (Partschefeld, 2012).

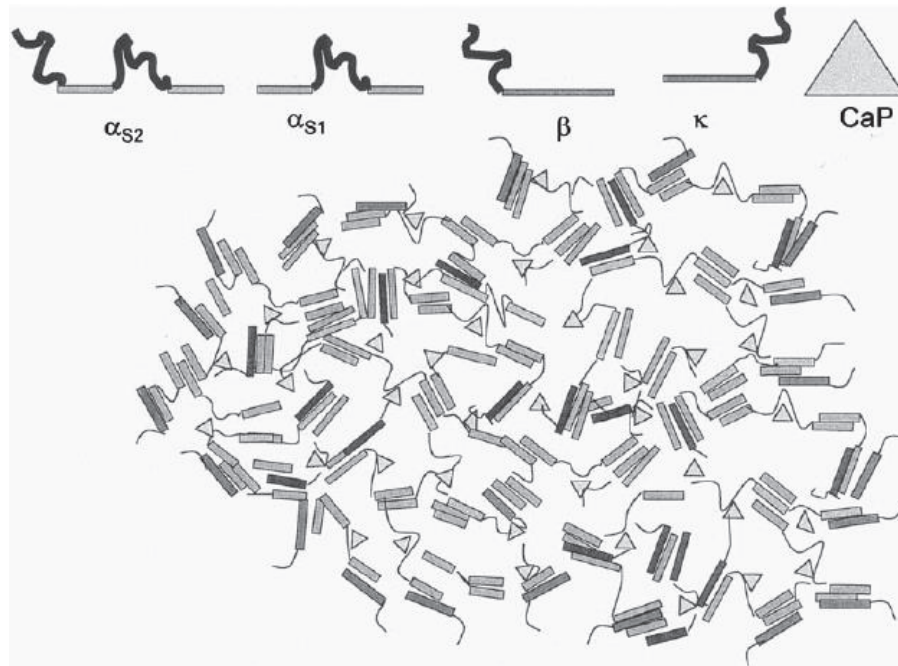


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Dual-Bonding-Modells nach Horne: Die hydrophoben Regionen (Balken) der einzelnen Caseinmoleküle bilden Protein-Protein-Bindungen, während die hydrophilen Regionen (Fäden) an die Calciumphosphat-Cluster (Dreiecke) binden. κ -Casein bindet sich nicht und ordnet sich an der Oberfläche an (Qi, 2007).

2.1.3 Caseinfraktionen

2.1.3.1 Calciumsensitivität

Die Caseinfraktionen lassen sich in calciumsensitiv und nicht-calciumsensitiv einteilen. α_{s1} -, α_{s2} - und β -Casein sind calciumsensitiv, d. h. sie binden Calcium. κ -Casein ist nicht-calciumsensitiv und somit in Gegenwart von Calciumionen löslich (McMeekin et al., 1995; Horne, 2006). Die Anzahl der Phosphoserine ist maßgeblich für die Sensitivität gegenüber Calcium. Je mehr freies Phosphoserin vorhanden ist, desto mehr Calcium kann daran binden und somit zur Ausfällung der jeweiligen Caseinfraktion führen. κ -Casein besitzt nur ein Phosphoserin am hydrophoben Teil (para- κ -Casein), also dem in der Micelle befindlichen und mit anderen Molekülen

assoziierenden Molekülabschnitt. Deswegen reagiert es nur schwach mit Calcium und verbleibt in Lösung (Qi, 2007).

α -Casein besitzt die meisten Phosphoserine, die höchste Nettonegativladung bei pH 6,7 und die höchste Affinität zu Calcium, gefolgt von β -Casein und abschließend κ -Casein mit nur einem Phosphoserin am hydrophoben Teil, der niedrigsten Nettonegativladung und der niedrigsten Affinität zu Calcium (Abbildung 2-4) (Law & Leaver, 2003; Bian, 2012).

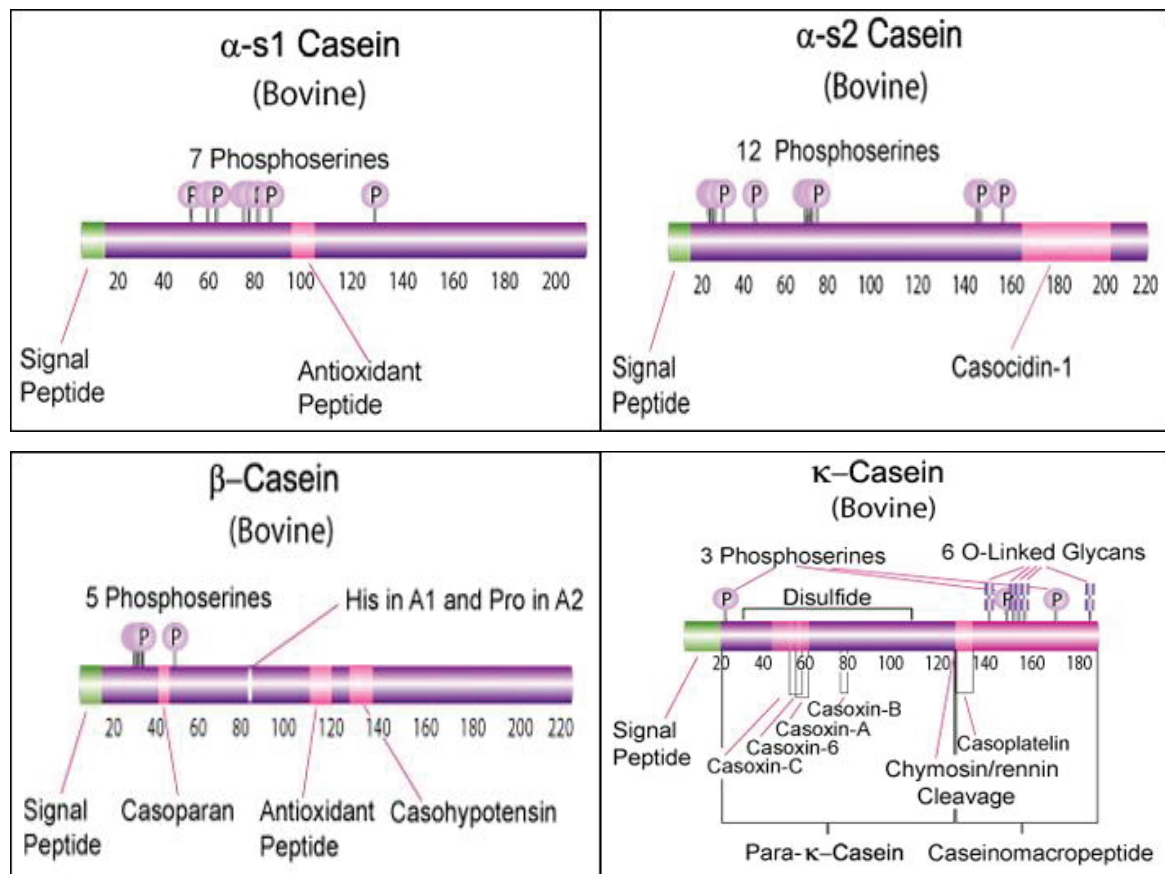


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der einzelnen Caseinfractionen (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/casein.html>; 02.10.2016)

2.1.3.2 α -Casein

Die α -Caseinfraction setzt sich aus α _{s1}- und α _{s2}-Casein zusammen.

α _{s1}-Casein macht mit 35,6 % Anteil am Gesamtcasein den Großteil der Caseinfractionen aus (Schmidt, 1982). Es ist ein aus 199 Aminosäuren aufgebautes Caseinmolekül und besitzt keine Disulfidbindungen (Goff, 2014; Qi, 2007). Es ist ein Triblockcopolymer, d. h. hydrophobe Reste befinden sich an den Enden der zentralen hydrophilen Region. Diese hydrophoben Reste beeinflussen die selbstständige Assoziation zu langen kettenförmigen Aggregaten, welche durch

elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen eingeleitet wird (Dickinson, 2006; Horne, 2002a). α_{s1} -Casein kann die Größe von β -Casein-Aggregaten verringern (Qi, 2007).

α_{s2} -Casein stellt mit 9,9 % die prozentual kleinste Fraktion dar. Es besitzt 207 Aminosäuren und von allen Fraktionen die meisten Phosphoserine. In erhitzter Milch (≥ 70 °C) kann es mit β -Lactoglobulin (β -Lg) Disulfid-Bindungen eingehen (Vasbinder et al., 2003).

2.1.3.3 β -Casein

β -Casein stellt mit 33,6 % Anteil am Gesamtcasein die zweitgrößte Caseinfraktion dar (Schmidt, 1982). Es besteht aus 209 Aminosäuren, besitzt eine flexible Struktur und keine Disulfidbindungen (Dickinson, 2006; Goff, 2014; Post et al., 2012). Es ist ein amphiphiles Caseinmolekül (Blockcopolymer) mit fünf hydrophilen Phosphoserinen am N-Terminus der Aminosäuresequenz und hydrophoben Resten wie Prolin am C-Terminus. Dies macht β -Casein zu einem optimalen Tensid und Stabilisator für die Lebensmittelindustrie (Horne, 2006; Post et al., 2012; West, 1986). Die selbstinduzierte Assoziation einzelner Moleküle zu kugelförmigen Micellen erfolgt, sobald eine bestimmte Konzentration an β -Casein vorhanden ist. Verantwortlich für die Aggregation sind hydrophobe Wechselwirkungen, wobei Temperatur und Ionenstärke eine große Rolle für das Ausmaß der Aggregation spielen (Dickinson, 2006). So liegt β -Casein bei niedrigen Temperaturen ($T \leq 4$ °C) hauptsächlich als Monomer vor, aber mit steigender Temperatur nimmt die Assoziation mit anderen Molekülen zu (Atamer et al., 2016; de Kruif & Grinberg, 2002). Ab 15-30 °C beginnt β -Casein sich eigenständig zusammenzulagern, was durch eine weitere Temperaturerhöhung und eine erhöhte β -Caseinkonzentration zusätzlich verstärkt wird (Atamer et al., 2016). Es dissoziiert daher bei niedrigen Temperaturen aus der Caseinmicelle, wobei bei pH 5,1 und 4 °C eine maximale Löslichkeit vorliegt (Dalglish & Law, 1998; Post et al., 2012). In wässriger Lösung kann β -Casein in vier Zuständen vorliegen (Abbildung 2-5). Bei 4 °C liegt es als Monomer (molekulare Phase) und bei 37 °C in micellarer Form (micellare Phase) vor. Wird der Lösung Calcium zugesetzt, so werden bei 4 °C die Moleküle über Calciumbrücken zu Polymeren (polymere Phase) verbunden und bei 37 °C die Micellen über Calciumbrücken zu Aggregaten (aggregierte Phase) assoziiert (Dauphas et al., 2005). In der Pharmazie wird β -Casein als Überzug für hydrophobe

Medikamente eingesetzt. Die Substanzen adsorbieren an den hydrophoben Domänen des β -Caseins. Durch Micellbildung werden die Wirkstoffe in wässriger Umgebung stabilisiert und vor dem Abbau geschützt (Atamer et al., 2016).

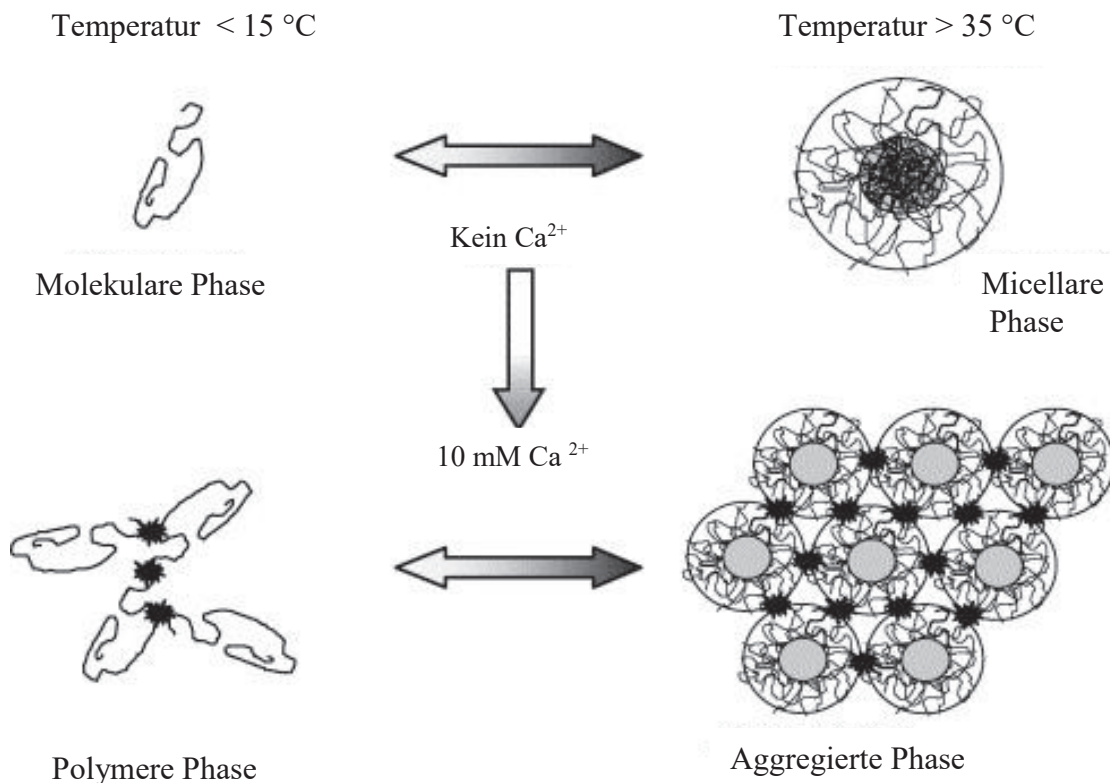


Abbildung 2-5: Die vier Zustände des β -Caseins in wässriger Lösung in Abhängigkeit von Temperatur und Calciumkonzentration (Dauphas et al., 2005).

2.1.3.4 κ -Casein

κ -Casein (11,9 % Anteil am Gesamtcasein) besitzt 169 Aminosäuren und ist hauptsächlich als „Hairy Layer“ an der Oberfläche von Caseinmicellen lokalisiert (Goff, 2014; Schmidt, 1982; Walstra, 1999). κ -Casein limitiert die Micellengröße (Qi, 2007). Durch sterische Abstoßung verhindert es die Aggregation der Micellen und trägt zu ihrer Stabilisierung bei (Herrmann et al.; 1988). Aufgebaut ist es wie ein Blockcopolymer, d. h. es besitzt einen hydrophoben in der Micelle befindlichen Teil und einen hydrophilen mit Kohlenhydratseitenketten in die umgebende Lösung ragenden Teil (Law & Leaver, 2003; Tuinier & de Kruif, 2002). In der Käseherstellung ist die enzymatische Hydrolyse des κ -Caseins verantwortlich für den Gerinnungsprozess. Bei der Dicklegung wird κ -Casein durch das Labenzym in para- κ -Casein und CMP gespalten. Das hydrophobe para- κ -Casein verbleibt in der Micelle und das hydrophile CMP geht in die Molke über. Durch die Entfernung des CMP verliert die Micelle ihre kolloidale Stabilität, aggregiert mit anderen Micellen

und bildet ein Gelnetzwerk (Goff, 2014; Law & Leaver, 2003; Qi, 2007). Beim Erhitzen von Milch über 60 °C denaturieren α -La und β -Lg und können über Disulfidbrücken an das κ -Casein der Micelle gebunden werden (Vasbinder et al., 2003).

2.1.4 Stabilität des Caseins

Die einzelnen Moleküle innerhalb der Caseinmicelle werden durch kolloidale Calciumphosphate zusammengehalten, wobei κ -Casein durch sterische Abstoßung die Aggregation mit anderen Micellen in der Milch verhindert (Herrmann et al., 1988; Phadungath, 2005; Tuinier & de Kruif, 2002). Destabilisierend auf die Micelle wirken Hochdruck (> 450 MPa), anionische Detergenzien (z. B. Natriumdodecylsulfat), Ethanol, Harnstoff, Proteasen (z. B. Chymosin), pH- und Temperaturänderungen (Fox & Brodkorb, 2008; Partschfeld, 2012; Post et al., 2012). Die Kombination einzelner Faktoren kann die Destabilisierung verstärken und die Gewinnung einzelner Fraktionen ermöglichen. So bewirkt eine Senkung des pH (5,5 – 5,2) bzw. der Temperatur (≤ 20 °C) die Dissoziation von Casein-Monomeren, vor allem von β -Casein (≤ 4 °C), aus der Caseinmicelle (Dalgleish & Law, 1988; Law & Leaver, 1998; Post & Hinrichs, 2011). Die Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen unterscheidet sich innerhalb der Fraktionen. So sind α_{s2} - und β -Casein gut zugänglich für das in der Milch vorkommende Plasmin. κ -Casein wird durch das im Kälbermagen vorkommende Chymosin gespalten. In der Käseherstellung wird dieses Verhalten zur Dicklegung der Milch genutzt (Law & Leaver, 2003).

Caseinmicellen zerfallen in Gegenwart von Ethanol, da er die hydrophoben Seitenketten der Caseinmoleküle für Wechselwirkungen nicht mehr zugänglich macht und somit die Hydrophobizität herabgesetzt wird. Verstärkt wird dieser Effekt durch Hitzeeinwirkung (Trejo & Harte, 2010), da die Abstoßungskräfte zwischen den Caseinen verstärkt werden (O'Connell et al., 2001). Die Micelle zerfällt ab einer bestimmten Ethanolkonzentration. Nach O'Connell et al. (2001) liegt diese bei 35 % (> 30 °C) bzw. nach Trejo et al. (2010) bei über 30 % (> 40 °C).

2.2 Methoden zur Caseinfraktionierung

2.2.1 Entwicklung

Hammarsten (1883) isolierte Casein, indem er Magermilch mit Essigsäure versetzte. Aber auch die Fällung mit Ammoniumsulfat bei niedriger Temperatur (1 – 2 °C) ist möglich, wie es McKenzie (1971) durchführte. Heutzutage wird micellares Casein bei 20 °C und pH 4,6 gefällt (z. B. mit Salzsäure (HCl)) (Yen et al., 2015). Mit der Entdeckung der Heterogenität des Caseins von Linderstrøm-Lang und Kodama im Jahre 1925, begann die Entwicklung diverser Methoden zur Fraktionierung des Caseins (Graham et al., 1993).

2.2.2 Gewinnung von Caseinfraktionen

Der Einsatz von Harnstoff in hohen Konzentrationen ist eine der ältesten Methoden zur Caseinfraktionierung (Hipp et al., 1952). Da die Fraktionen unterschiedliche Löslichkeiten in Harnstoff aufweisen, dissoziieren sie unterschiedlich schnell aus der Micelle (Law & Leaver, 2003).

Der Einsatz von Ethanol zur Fraktionierung wurde ebenfalls von Hipp et al. (1952) entwickelt. Hierbei werden die Fraktionen in 50% Ethanol in Anwesenheit verschiedener Salze (z. B. CaCl_2 , Natriumchlorid) und der Variation von Temperatur, pH und Ionenstärke getrennt. Trejo et al. (2010) arbeiteten mit Ethanolkonzentrationen von 0 – 60 % (v/V) und Temperaturen von 20 – 60 °C. O’Connell et al. (2001) versetzten Magermilch mit Natriumchlorid (0 – 50 mM), CaCl_2 (0 – 2 mM) oder EDTA (0 – 8 mM). Diese Milch mischten sie 1:1 mit Ethanol (65 % w/w) und temperierten sie auf 5 – 75 °C.

Waugh et al. (1956) fraktionierten Casein mit CaCl_2 bei neutralem pH. Dieses Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Calciumsensitivität der einzelnen Fraktionen.

Die Flüssigchromatographie basiert auf den Wechselwirkungen der Fraktionen in der mobilen Phase mit der stationären Phase (Atamer et al., 2016). Ein spezielles Verfahren der Flüssigchromatographie ist die Ionen-Austausch-Chromatographie. Hier kommen Harnstoff zur Dissoziation der Caseine und reduzierende Agenzien wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zur Reduzierung von Disulfidbindungen zwischen κ -Caseinmonomeren zum Einsatz. Man unterscheidet die Anionen-Austausch-Chromatographie (AAC) und die weniger verbreitete Kationen-Austausch-Chromatographie (KAC). Die Auftrennung der Caseine beruht auf deren

verschiedenen Nettonegativladungen bei basischem pH (AAC) bzw. Nettopositivladungen bei saurem pH (KAC) und damit deren Affinität zu einem positiv (AAC) bzw. negativ (KAC) geladenen Säulenmedium (Law & Leaver, 2003). All diese Verfahren sind nicht für die Lebensmittelproduktion einsetzbar. Die Verwendung von schädlicher Chemikalien (z. B. hochkonzentrierter Ethanol, 2-Mercaptoethanol, Salze wie Kaliumoxalat) macht das Ethanolverfahren, die Ionen-Austausch-Chromatographie und die CaCl_2 -Fällung bei neutralem pH für den Einsatz für die Lebensmittelindustrie unbrauchbar (Atamer et al., 2016). Außerdem sind die Harnstoffmethode (hohe Mengen an Harnstoff), die CaCl_2 -Fällung bei neutralem pH (hohe CaCl_2 -Konzentration nötig), die Gelelektrophorese, die Gelchromatographie und die Flüssigchromatographie (geringes Einsatzvolumen) nicht wirtschaftlich umsetzbar (Atamer et al., 2016; Law & Leaver, 2003).

2.2.3 Gewinnung von Caseinfraktionen unter Erhalt der Lebensmittelqualität

2.2.3.1 Calciumchlorid-Fällung bei basischem pH

Law und Leaver (2003) veröffentlichten ein Patent zur Caseinfraktionierung aus Milch oder Caseinaten mit CaCl_2 bei pH 11. Diese Methode ist eine Modifizierung der CaCl_2 -Fällung bei pH 6,6 – 6,8 (Waugh & von Hippel, 1956). Vor dem Zusatz von CaCl_2 wird das Ausgangsmaterial mit Natriumhydroxid (NaOH) auf pH 11 eingestellt. Dadurch sedimentiert calciumsensitives α - und β -Casein bei geringer CaCl_2 -Menge und eine strukturschädigende Hochleistungszentrifugation (bis 55200 g) wie bei der Fällungsmethode bei pH 6,6 – 6,8 ist nicht notwendig. Zur Separation wird stattdessen eine Mikrozentrifugation (bis 15000 g) oder eine Filtration (Faltenfilter, Maschenfilterbeutel) eingesetzt. Da κ -Casein durch Säurefällung gewonnen wird, entfallen Dialyseschritte mit toxischen Komplexbildern. Aus diesen Gründen kann Casein so im industriellen Maßstab isoliert und in Lebensmitteln eingesetzt werden. Mit diesem Verfahren können α -, β - und κ -Casein mit 85 %, 95 % und 60 % Reinheit gewonnen werden (Law & Leaver, 2003; Rickwood et al. 1994). Die Wahl der Separationsmethode sowie des Prozessvolumens hat Einfluss auf die Kriterien Reinheit, Ausbeute und Wiederfindung der Fraktionen. Post et al. (2011) arbeiteten mit micellarem Casein und Prozessvolumina von 2 L und 5 L. Zur Separation wurden Maschenfilterbeutel mit 50 μm und 5 μm Porengröße (2 L) und eine *Elecrem* Zentrifuge (5 L) eingesetzt.

Für die Gewinnung von κ -Casein zeigten sich in den Methoden keine signifikanten Unterschiede der Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit. Eine höhere Reinheit von α - und β -Casein konnte mit der Zentrifuge (5 L) erzielt werden. Hinsichtlich der Ausbeute und Wiederfindung konnte für α -Casein im 2 L-Maßstab und für β -Casein im 5 L-Maßstab ein besseres Ergebnis erzielt werden. Post et al. (2009, 2010, 2011) untersuchten in mehreren Studien, welchen Einfluss das Ausgangsmaterial auf Ausbeute, Reinheit und Wiederfindung von β -Casein hat. Sie verglichen verschiedene kommerzielle Calcium-, Natrium- und Kalium-Caseinate mit micellarem Casein und ermittelten eine viermal höhere Wiederfindung bei micellarem Casein (9 – 11 %). Dies schrieben sie der verringerten Löslichkeit der kommerziellen Caseinate zu. Der Versuch die Methode vom Labormaßstab (5 L micellare Caseinlösung) auf den Großmaßstab (85 L micellare Caseinlösung) zu übertragen, resultierte in einer Abnahme der Reinheit von 90 % zu 85 % (Post & Hinrichs, 2011).

2.2.3.2 Solubilisierung bei niedrigen Temperaturen

β -Casein verliert bei niedrigen Temperaturen ($\leq 4\text{ °C}$) an hydrophoben Bindungskräften und diffundiert aus der Micelle (Atamer et al., 2016). Dieses Verhalten wurde von Ram et al. (1994) zur Isolierung von β -Casein genutzt. Das Ausgangsmaterial wurde in kaltem Wasser aufgeschlämmt und bei einem pH von 3,5 – 8,0, sowie 5,0 – 8,0 und 2 – 4 °C für bis zu 30 h gehalten. Die feste β -caseinabgereicherte und die flüssige β -caseinangereicherte Phase wurden mittels Dekanter voneinander getrennt. Das gewonnene β -Casein hatte eine hohe Reinheit (95 %), allerdings war die Wiederfindung sehr gering (3 – 6 %). Le Magnen & Maugas (1995) arbeiteten mit Dekanter und Zentrifuge zur Isolierung von β -Casein aus labversetzter Magermilch (Reinheit 90 %). Ward & Bastian (1996) nutzten als Ausgangsmaterial mit Chymosin versetztes Calciumcaseinat. Dieses wurde auf 4 °C temperiert, gerührt und anschließend zentrifugiert. Der β -caseinreiche Überstand wurde auf 45 °C temperiert, um das β -Casein auszufällen. Die Wiederfindung betrug 55 %. Statt Caseinat nutzten Huppertz et al. (2006) den Bruch labgefällter Magermilch. Sie wuschen ihn mit Wasser und zentrifugierten ihn anschließend, um Molkenproteinreste zu entfernen. Der Bruch wurde dann mit kaltem Wasser (5 °C) versetzt und 24 h bei dieser Temperatur gelagert, um die

Solubilisation des β -Caseins herbeizuführen. Die Ausbeute lag hier bei 20 %. Diese Methode erfordert keine Säuren und Basen.

2.2.3.3 Membranfiltration

Die Membranfiltration trennt suspendierte oder gelöste Stoffe nach ihrer Molekülgröße bzw. -masse unter Verwendung von Druck und verschiedenen Membranen. Je nach Porengröße der eingesetzten Membran und der eingestellten transmembranen Druckdifferenz unterscheidet man zwischen

- a) Mikrofiltration: $10^{-1} - 10^1 \mu\text{m}$; 0,3 – 3 bar
- b) Ultrafiltration: $10^{-2} - 10^{-1} \mu\text{m}$; 0,5 – 10 bar
- c) Nanofiltration: $10^{-3} - 10^{-2} \mu\text{m}$; 5 – 60 bar
- d) Umkehrosmose: $10^{-4} - 10^{-3} \mu\text{m}$; 10 – 200 bar

(Melin & Rautenbach, 2007; Spreer, 2011).

Bei der Mikro- und Ultrafiltration wird unterschieden zwischen dem statischen Betrieb (Dead-End-Filtration), dem dynamischen Betrieb (Cross-Flow-Filtration) und dem Betrieb von getauchten Membranen. Aufgrund des hohen Feststoffgehaltes kann die Fraktionierung von Proteinen nur mit der Cross-Flow-Filtration durchgeführt werden (Melin & Rautenbach, 2007). Bei diesem Verfahren wird die Produktflüssigkeit parallel zur Oberfläche einer Membran gepumpt (Cheryan, 1990). Der von der Membran zurückgehaltene Teil der Flüssigkeit (Retentat) wird wieder in den Zulauf geleitet, während der die Membran passierende Teil (Permeat) abgeleitet wird (Spreer, 2011). Während des Prozesses wird dem Retentat nach und nach Flüssigkeit entzogen, sodass die Viskosität ansteigt. Dies führt zu einem abnehmenden Membranfluss (Flux) trotz steigender Pumpleistung. Um dies zu minimieren und so eine anhaltende Trennleistung zu gewährleisten, kann die Diafiltration angewendet werden. Dabei wird dem Retentat diskontinuierlich oder kontinuierlich Lösungsmittel (z. B. Wasser) zugeführt (Cheryan, 1990).

Die Auswahl der Membran richtet sich nach dem Einsatzbereich. Für die Lebensmittelindustrie geeignet sind Membranen aus anorganischen, synthetischen Polymeren wie Polyether, Polysulfon und Polyacrylnitril/Polyvinylchlorid. Diese besitzen eine hohe Temperatur- (max. 85 - 100 °C) und pH-Beständigkeit (pH-Bereich 1 - 13) (Kersten, 2001; Spreer, 2011). Die Ausschlussgrenzen der Membranen werden in μm und Da (Dalton; Molekülmasse) angegeben. Es gibt spezielle Molecular Weight Cut Off-Membranen (MWCO), die 90 % (oder 95 %) der Moleküle einer definierten Molekülmasse zurückhalten (Melin & Rautenbach, 2007).

Die Membranfiltration ermöglicht es bei Raumtemperatur (RT) Magermilch in ein molkenproteinangereichertes Permeat und ein Retentat mit micellarem Casein aufzutrennen (Atamer et al., 2016). Aus dem Retentat kann durch Temperierung auf unter 4 °C über 24 h und einer anschließenden Membranfiltration β -caseinangereichertes Permeat und α - und κ -caseinangereichertes Retentat gewonnen werden. Die geringe Molekülgröße der β -Casein-Monomere ermöglicht es ihnen, Mikrofiltrationsmembranen zu durchdringen und in das Permeat überzugehen, während im micellaren Verbund verbleibendes α - und κ -Casein die Mikrofiltrationsmembran nicht durchdringen (Atamer et al., 2016; Kersten, 2001; Post & Hinrichs, 2010).

Die Membranfiltration wurde von Murphy et al. (1991) zur Fraktionierung von β -Casein aus Natriumcaseinat angewendet. Dazu lösten sie zunächst das Caseinat in Wasser, stellten einen pH von 7,0 ein und kühlten es auf 0,4 °C ab. Zur Fraktionierung nutzten sie verschiedene Membranen, einerseits Polysulfon-Membranen mit 100000 Da und 300000 Da zur Ultrafiltration und andererseits Polyvinylidenfluorid-Membranen mit 0,1 μ m Porengröße zur Mikrofiltration. Die Permeate enthielten β -Casein (einschließlich γ -Casein) mit 70-80 % Reinheit. Le Berre & Daufin (1994) nutzen Membranen mit einer Zirkonoxidschicht (Porengrößen: 20,5 nm; 28,2 nm; 80,0 nm). Die geringe Reinheit des gewonnenen β -Caseins (≤ 60 %) wurde dem Fouling (Bildung einer Deckschicht auf der Membran) zugesprochen. Während des Prozesses der Filtration kommt es zum Abbau von β -Casein zu γ -Casein durch Plasmin. Da γ -Casein ähnliche Emulgier- und Stabilisierungseigenschaften wie β -Casein hat, stellt dieses Abbauprodukt kein großes Problem dar, wenn es darum geht diese Eigenschaften in einem Produkt zu verbessern. Mit der Methode nach Igarashi (1995) ist es möglich, dieses Abbauprodukt von β -Casein zu trennen.

Van Hekken & Holsinger (2000) mikrofiltrierte 1,5 L pasteurisierte Magermilch bei einer Temperatur von 4 °C. Dabei wurden Membranen mit Porengrößen von 0,2 μ m, 0,1 μ m oder 100000 Da genutzt. Die Permeate wurden mit einer 10000 Da MWCO-Membran filtriert, um den Feststoffgehalt zu erhöhen. Die β -Casein-Reinheit betrug 52,3 %, 60,8 % und 75 % (0,2 μ m; 0,1 μ m und 100000Da). Eine höhere Wiederfindung (10 % - 20 %) an β -Casein im Großmaßstab (380 L Magermilch) konnten O'Mahony et al. (2007) mittels einer mehrstufigen Filtration erzielen. Die erste Filtration (0,5 μ m Polyvinylidenfluorid-Membran) wurde nach einer 12 - 48 h Temperierung bei 1 - 2 °C durchgeführt. Im Retentat lagen α - und

κ -Casein sowie Molkenproteine und im Permeat β -Caseinmoleküle vor. Mit der zweiten Filtration wurde das Permeat demineralisiert, indem bei 1 - 6 °C ultrafiltriert (10000 Da Polyethersulfon-Membran) und mit gekühltem Wasser diafiltriert wurde. Die dritte Filtration wurde mit einer 0,5 μ m Polyethersulfon-Membran durchgeführt, um die Reinheit des β -Caseins zu erhöhen. Dafür wurde das Permeat auf 25 °C für 20 min erwärmt, damit die β -Caseinmoleküle zu Micellen assoziieren. Die Reinheit betrug über 90 %.

2.3 Wirkungsweise von Transglutaminase an Caseinen

2.3.1 Mikrobielle Transglutaminase

Das Enzym Transglutaminase (Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferase) kommt in verschiedenen Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor. Für die kommerzielle Nutzung hat sich mikrobielle Transglutaminase (mTGase) durchgesetzt, da diese kein Calcium zur Aktivierung benötigt, eine niedrige Substratspezifität hat und relativ kostengünstig ist. Eine häufig verwendete mTGase ist aus dem Bakterium *Streptovorticillium mobaraensis* isoliert. Das Enzym hat eine molekulare Masse von 38000 -40000 Da und besteht aus 331 Aminosäuren. Es ist bei pH 4,0 - 9,0 aktiv, wobei das Optimum zwischen pH 6,0 und 7,0 liegt. Während es bei 50 °C seine optimale Aktivität hervorbringt, wird es bei einer Temperatur ab 70 °C inaktiviert (Jaros et al., 2006a; 2006b).

In Abbildung 2-6 ist die Reaktion zwischen mTGase und einem Protein dargestellt: mTGase katalysiert Acyl-Transfer-Reaktionen zwischen der γ -Carboxamid-Gruppe von peptid- oder proteingebundenem Glutamin (Acyl-Donator) und primären Aminen (Acyl-Akzeptor) wie proteingebundenen Lysinresten. Dabei entstehen kovalente ϵ -(γ -glutamyl)-Lysin-Bindungen, die zur intermolekularen Quervernetzung der Proteine führen können. Dies kann in der Lebensmittelindustrie anstelle von chemischen Zusatzstoffen zur Veränderung verschiedenster Eigenschaften wie Gelbildung, Emulgiervermögen, Schaumbildung und Wasserbindevermögen genutzt (Gharst et al., 2007; Gauche et al., 2008; Jaros et al., 2006b).

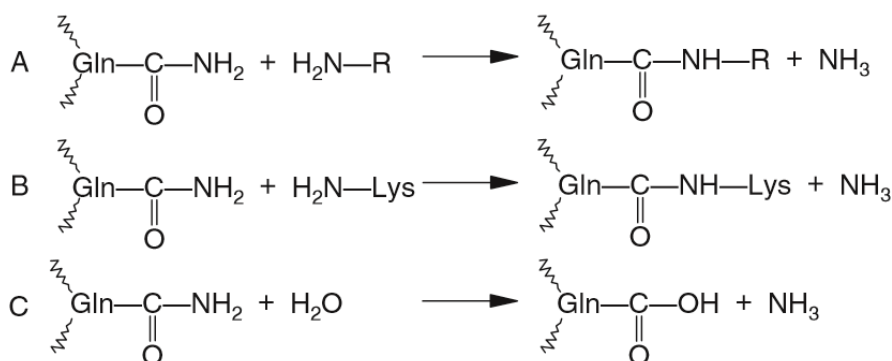


Abbildung 2-6: Proteinmodifikation durch mikrobielle Transglutaminase:
 A) Acyl-Transfer-Reaktion. B) Polymerisationsreaktion zwischen Glutamin und Lysin.
 C) Reaktion mit Wasser (Jaros et al., 2006b).

2.3.2 Enzymatisch verknüpfte Caseine in säureinduzierten Gelen

2.3.2.1 Herstellung säureinduzierter Gele

Der Einsatz von mTGase kann bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte deren Eigenschaften verbessern. MTGase wirkt sich durch Vernetzung der Milchproteine positiv auf die Gelsteifigkeit und das Wasserbindevermögen von fermentierten Milchprodukten wie Joghurt aus (Jaros et al., 2006b).

Um die Wirkung von enzymatisch quervernetzten Caseinen in Joghurtgelen genauer zu untersuchen, wird mit säureinduzierten Milchgelen gearbeitet. Als Ersatz für Milchsäurebakterien wird die Säuerung mit Glucono- δ -lacton (GDL) eingeleitet. GDL hydrolysiert in Wasser zu Gluconsäure, was eine Senkung pH bedingt. Diese Modellsysteme vereinfachen die Untersuchungen, da unerwünschte Effekte vermieden und auch bei breit variierten Parametern reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden können (Jaros et al., 2006b).

2.3.2.2 Zugänglichkeit der Substrate

Maßgeblich für die mTGase-induzierte Quervernetzung ist die Zugänglichkeit der Glutamin- und Lysinreste des Proteinmoleküls (Partschefeld, 2012). Wegen der offeneren Struktur sind ungeordnet vorliegende Moleküle (wie in Natriumcaseinat) wesentlich zugänglicher für mTGase als in Micellen geordnete Moleküle (wie in Milch) (Bönisch et al., 2004). Milch kann durch Ultrahocherhitzung zugänglicher für mTGase gemacht werden, da dadurch ein in der Milch vorkommender mTGase-Inhibitor inaktiviert werden kann und Caseinmonomere freigesetzt werden (Bulca & Kulozik, 2004; Jaros et al., 2006b). Durch die Quervernetzung der

einzelnen Caseinmonomere infolge der Enzymbehandlung sinkt der Anteil der Monomere mit steigender Inkubationszeit (Jaros et al., 2006b). Abbildung 2-7 zeigt, dass bis zu einer Inkubationszeit von 60 min (3 U/ g Protein, 40 °C) die Menge an oligomerisiertem Casein ansteigt und danach stagniert. Das liegt daran, dass nur bestimmte Lysin- und Glutaminreste von mTGase modifiziert werden können (Faergemand et al., 1999; Lauber et al., 2000).

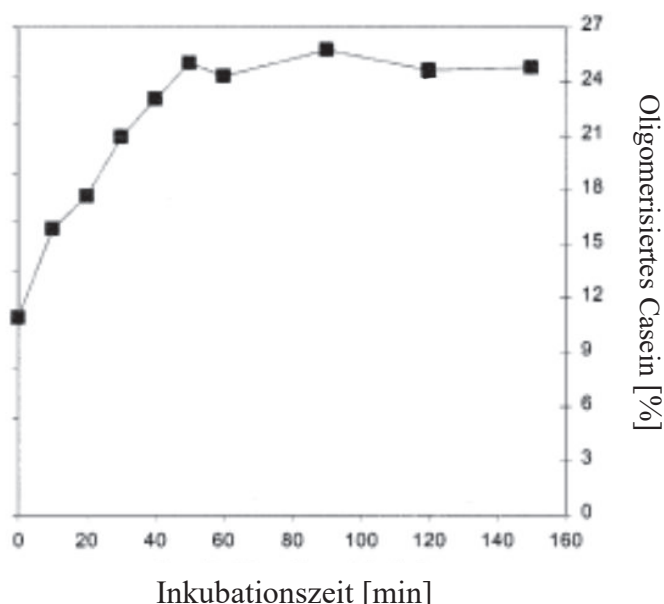


Abbildung 2-7: Inkubation von Magermilch mit mTGase (3 U/g Protein bei 40 °C). Transglutaminase-induzierte Casein oligomerisation in Abhängig der Inkubationszeit (Lauber et al., 2000).

2.3.2.3 Enzymatische Verknüpfung in säureinduzierten Milchgelen

Die enzymatische Quervernetzung mit mTGase führt in säureinduzierten Milchgelen zu einer Erhöhung der Gelsteifigkeit (Anema et al., 2005; Faergemand et al., 1999; Imm et al., 2000). Untersuchungen von säureinduzierten Gelen mTGase-behandelter Rohmilch zeigten einen Anstieg der Steifigkeit bei moderater Inkubation (Restmonomergehalt ≤ 75 %) und eine Abnahme bei weiterer Inkubation (Jaros et al., 2010). Die maximale Gelsteifigkeit ist abhängig von Faktoren wie Enzymkonzentration, Inkubationszeit, pH, aber auch Fett- und Eiweißgehalt der Milch (Faergemand et al., 1999; Flanagan et al., 2003; Imm et al., 2000; Menéndez et al. 2004). Lorenzen et al. (2002) stellten in enzymbehandelten Milchgelen für die Joghurtproduktion eine geringere Synäreseneigung und somit eine höhere Produktstabilität fest (Abbildung 2-8).

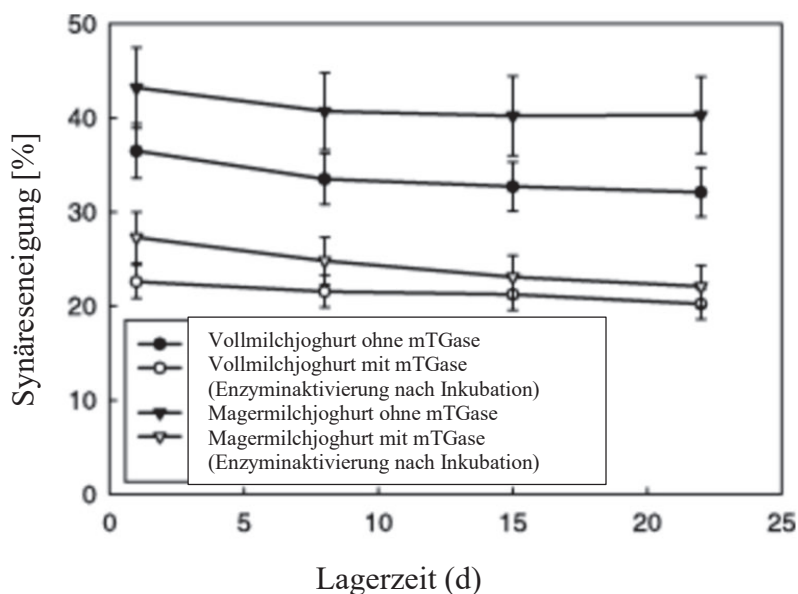


Abbildung 2-8: Synärese von unbehandeltem und mTGase-behandeltem Voll- und Magermilchjoghurt. Die Vollmilch wurde 2 h bei 40 °C mit mTGase behandelt und anschließend bei 80 °C für 1 min inaktiviert. In Magermilch fanden mTGase-Behandlung und bakterielle Fermentation zeitgleich statt (d. h. keine Inaktivierung der mTGase) (Lorenzen et al., 2002b)

2.3.2.4 Enzymatische Verknüpfung in säureinduzierten Caseingelen

In folgenden Studien wurde mit Säurecaseinlösung (SCL) gearbeitet. Diese hat den Vorteil, dass die Caseinfraktionen nicht in Micellen vorliegen und somit keinen komplexen strukturellen Veränderungen während der Säuerung unterworfen sind (Horne, 2003; McMahon et al., 2009). Die SCL wurde durch Lösen von Säurecasein in Phosphatpuffer (pH 6,8) hergestellt (Jaros et al., 2010). Jaros et al. (2010) säuerten mit mTGase-behandelte (3 U/g Protein, 40 °C) SCL (27 g/kg) und beobachteten einen Anstieg der Gelsteifigkeit (213 Pa) bis zu 3 h Inkubation und eine Abnahme bei längerer Inkubation (5 h = 181 Pa; 7 h = 142 Pa) (Abbildung 2-9). Interessant ist, dass der Monomergehalt mit steigender Inkubationszeit abnimmt. Die Gelsteifigkeit dagegen, hat ihren Höhepunkt nach 3 h Inkubation (20 – 30 % Monomergehalt) und nimmt danach wieder ab (Abbildung 2-9). Nach Jaros et al. (2010) bedingen besonders die nach kurzer Inkubationszeit gebildeten Di- und Trimere eine Erhöhung der Gelsteifigkeit. Eine längere Inkubation führt zur Verknüpfung von Caseinen zu sehr großen Aggregaten. Der Isopeptidgehalt zeigt bei 10 % Monomergehalt eine Zunahme an Bindungen. Daraus lässt sich schließen, dass bereits existierende Polymere weiter vernetzt werden, aber die weitere Netzbildung behindern (Jaros et al., 2014).

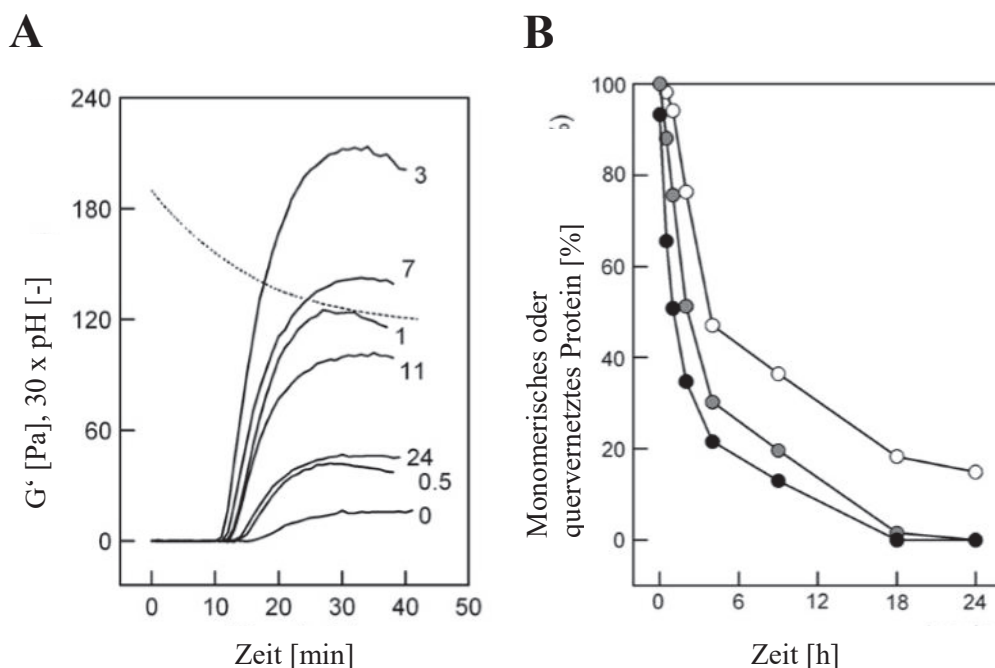


Abbildung 2-9: Enzymbehandelte Caseinlösungen (27 g/kg) wurden mit 3 U mTGase/g Protein unterschiedlich lang bei 40 °C inkubiert. Die mTGase wurde mit 1g/L N-Ethylmaleinimid inaktiviert. Die Gelbildung wurde mit 40 g/L D-Glucono- δ -lacton bei 30 °C durchgeführt. **A:** Gelbildungskurven enzymbehandelter Caseinlösungen.. Die Nummern stehen für die Inkubationszeit in h. Die gepunktete Linie zeigt den pH-Verlauf. **B:** Gehalt an monomeren (●), dimeren (◐) und trimeren (○) Caseinmolekülen in den Caseinlösungen (Jaros et al., 2010).

Raak et al. (2017) stellten Mischungen aus enzymbehandelter SCL (27 g/kg, 3 U mTGase/g Protein, 40 °C, 1 – 8 h) und unbehandelter SCL her. So erhielten sie Proben mit identischer Anzahl an Querverbindungen (Gehalt an N- ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptid, IC). Mischungen aus länger inkubierten Proben zeigten einen niedrigeren Polymerisierungsgrad. Hier traten Querverbindungen zwischen bereits existierenden Aggregaten auf. Um eine ähnliche Gelsteifigkeit bei gleichem Isopeptidgehalt zu erzielen, war eine bestimmte Polymergröße entscheidend. Gele mit hoher Steifigkeit konnten mit einem hohen Gehalt an größeren Polymeren erzielt werden. Auch die Säuerungstemperatur beeinflusst die Gelbildung. Proben, die bei 30 °C inkubiert wurden, zeigten niedrigere Gelsteifigkeiten als Proben, die bei 20 oder 40 °C inkubiert wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Projektübersicht

In Abbildung 3-1 ist die Vorgehensweise zur Fraktionierung und Charakterisierung der Caseinfractionen dargestellt. Zunächst wurde aus RMM mittels Membranfiltration β -Casein isoliert. Aus dem Retentat wurden mittels Calciumchlorid-Fällung α - und κ -Casein fraktioniert. Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit der Fraktionen konnten durch Bestimmung des Proteingehaltes und der Proteinverteilung ermittelt werden. Es folgte die Herstellung von Natriumcaseinatlösungen aus den Caseinfraktionen sowie aus kommerziellem Säurecasein. Abschließend wurden Gelbildungsuntersuchungen dieser NCL sowie damit angereicherter Magermilch durchgeführt.

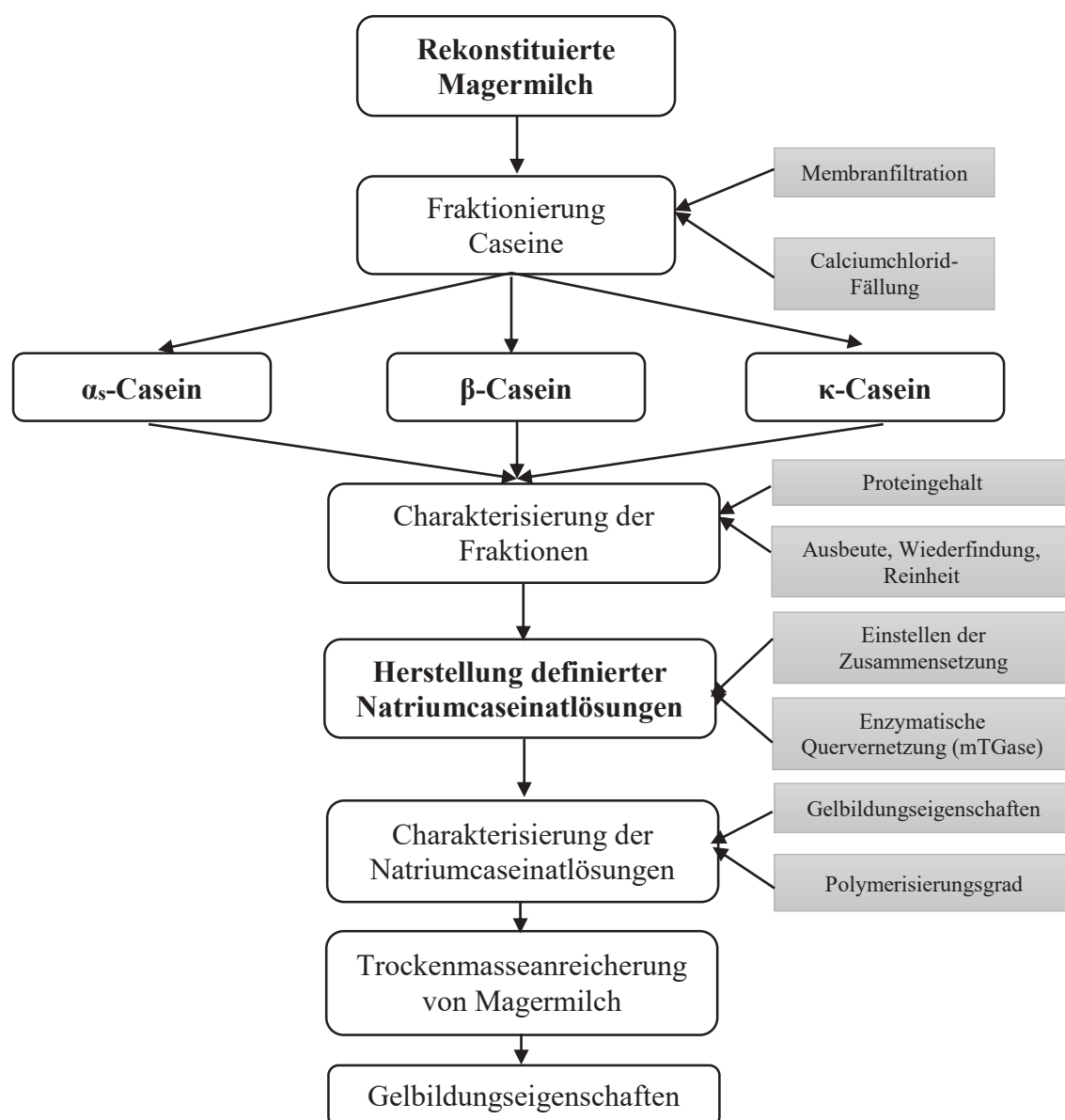


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Projektablaufes.

3.2 Chemikalien

In Tabelle 3-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien angeführt.

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid, Reinheit $\geq 98 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat, Reinheit $\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromthymolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CHAPS (3-[3-Cholamidopropyl]-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat), Reinheit $\geq 98 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Brilliantblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, Reinheit $\geq 99,5 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiothreitol, Reinheit $\geq 99 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, Reinheit 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethylendiamintetraacetat	Roquette Frères, Lestrem, Frankreich
Glucono- δ -lacton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumsulfat, Reinheit $\geq 98 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat, Reinheit $\geq 99,5 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver (Low-Heat) aus Kuhmilch	Sachsenmilch Leppersdorf GmbH, Leppersdorf, Deutschland
Methanol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Methylrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N,N'-Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Natriumazid, Reinheit $\geq 98 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid, Reinheit $\geq 99 \%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Säurecasein	Sachsenmilch Leppersdorf GmbH, Leppersdorf, Deutschland

Fortsetzung von Tabelle 3.1

Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	VWR International, Leuven, Belgien

3.3 Basismilch

Um in allen Versuchen eine replizierbare Zusammensetzung der Ausgangsmilch zu gewährleisten, wurde mit RMM gearbeitet. Zur Herstellung wurde Low-Heat-Magermilchpulver (MMP; 480 g/kg Lactose, 341,4 g/kg Protein, 40 g/kg Wasser, 10 g/kg Milchfett) kontinuierlich unter Rühren (Propellerrührer am Laborrührgerät EUROSTAR power control-visc IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland; Drehzahl: 200 min⁻¹) für 1 h in entionisiertem Wasser gelöst. Um eine ausreichende Homogenität zu gewährleisten, wurde die Milch anschließend noch 60 min gerührt. Zur Konservierung wurde Natriumazid (0,3 g/kg) zugesetzt. Die Milch wurde für mindestens 12 h im Kühlraum bei 6 °C gelagert.

3.4 Gewinnung der einzelnen Caseinfraktionen

3.4.1 Membranfiltration

3.4.1.1 Durchführung

Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die optimierte Methode, welche ab Versuch 4 (Tabelle 3-2) angewendet wurde. In den Versuchen davor wurde mit anderen Volumina für die Diafiltration gearbeitet. Zur Isolierung von β -Casein wurde eine Cross-Flow-Mikrofiltration mit diskontinuierlicher Diafiltration angewendet. Es wurde mit einem Sartoclon Slice Microfiltration Set (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) und zwei Polyethersulfon-Membranen (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einer Porengröße von 0,1 μ m gearbeitet.

5 L RMM wurden auf 100 g/kg Trockenmasse eingestellt, 24 h bei 3,5 °C vortemperiert und während der gesamten Mikrofiltration in einem Wasserbad bei 3,5 °C gehalten. Die Magermilch wurde zunächst 10 min mit einem Eingangsdruck von 2 bar und einem Ausgangsdruck von 0 bar im Kreislauf durch die Anlage gepumpt (Abbildung 3-2). Dann wurde 1 L Permeat aus dem Permeatauslass entnommen. Der Druck am Permeatauslass betrug 1 bar, der Eingangsdruck 2 bar

und der Ausgangsdruck 0 bar. Die äquivalente Menge des entnommenen Permeates wurde durch Zuführen vorgekühlten Diafiltrationsmittels (entionisiertes Wasser) zum Retentat wieder ausgeglichen. Anschließend wurde das Retentat 10 min im Kreislauf gepumpt und wieder 1 L Permeat entnommen. Dies wurde pro Tag 10-mal wiederholt und über 3 d durchgeführt. Es wurden insgesamt 30 Diafiltrationsschritte getätigt, sodass nach einem 30-Stufen-Verfahren gearbeitet wurde (Hurt & Barbano, 2010). Gereinigt wurde die Anlage am Ende jeden Tages mit 1 mol/L Natronlauge bei 40 °C und entionisiertem Wasser.



Abbildung 3-2: Aufbau des Versuchstandes zur Membranfiltration. (1) Retentatauslass, (2) Feedeinlass (in diesem Fall Retentateinlass), (3) Permeatauslass, (4) Membranen.

In Abbildung 3-3 ist die β -Caseinisolierung schematisch dargestellt. Das Permeat wurde 24 h bei 20 ± 1 °C gelagert. Durch Säurefällung mit HCl (6 mol/L) bei pH 4,6 und anschließender Filtration (Rotilabo-Faltenfilter Typ 600P CA21.1, 13 μ m Porengröße) konnte ein β -caseinreiches Präzipitāt und ein molkenproteinreiches Filtrat gewonnen werden. Das Präzipitāt wurde bei -18 °C gelagert und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) mit Vakuumpumpe (Drehschieberpumpe RZ 2.5, Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) bei -50 °C und 0,1 mbar über 4 d gefriergetrocknet und mit Mörser und Pistill zu Pulver vermahlen. Das Retentat wurde der CaCl_2 -Fällung (Kapitel 3.4.2) unterworfen.

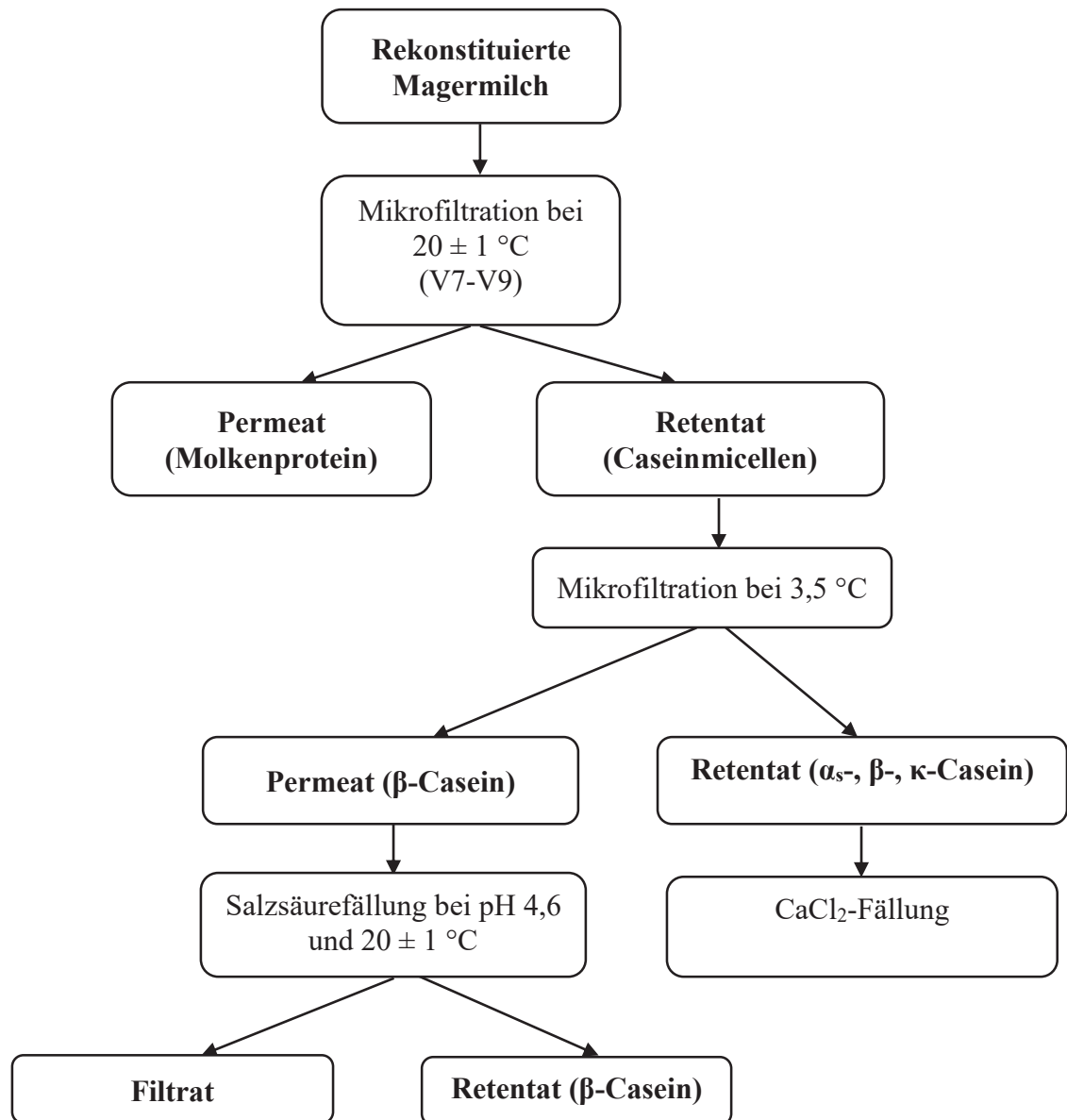


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung zur Isolierung von β-Casein

3.4.1.2 Variationen in der Durchführung der Membranfiltration

In Tabelle 3-2 sind die variierten Versuchsparameter aufgeführt. Versuch 1 (V1) diente als Vorversuch und ist daher nicht aufgeführt. V2 ist der erste Hauptversuch. Es wurde die Menge an Diafiltrationsmittel für eine maximale Ausbeute an β-Casein bestimmt. In ausgewählten Versuchen wurde eine Mikrofiltration bei 20 ± 1 °C zur Abtrennung der Molkenproteine vorgeschaltet. Es wurde mit 5 L eintionisiertem Wasser diafiltriert (Abbildung 3-3). Das Retentat wurde für die Kaltmikrofiltration genutzt.

Tabelle 3-2: Versuchsparameter Membranfiltration

Versuch	Volumen entnommenes Permeat [L]		Dauer Kaltfiltration [d]	Vorgeschaltete Warmfiltration
	Pro Tag	Gesamt		
V1	4	12	3	nein
V2	4	12	3	nein
V3	10	50	5	nein
V4	10	30	3	nein
V5	10	30	3	nein
V6	10	30	3	nein
V7	10	30	3	ja
V8	10	30	3	ja
V9	10	30	3	ja

3.4.2 Calciumchlorid-Fällung bei basischem pH

3.4.2.1 Durchführung

Folgende Versuchsdurchführung bezieht sich auf die optimierte Methode, welche ab Versuch 8 (Tabelle 3-3) durchgeführt wurde. Das Retentat wurde statt einer einfachen Salzsäurefällung einem mehrstufigen Fraktionierungsverfahren in Anlehnung an Law & Leaver (2003) und Post & Hinrichs (2010) unterworfen (Abbildung 3-4). Das aus der kalten Mikrofiltration gewonnene Retentat wurde auf 30 °C erwärmt, mit 1 mol/L Natriumhydroxid (NaOH) auf pH 11,0 eingestellt und zur Ausfällung von α - und β -Casein mit CaCl_2 (50 mmol/L Retentat) versetzt. Die Dispersion wurde 10 min gerührt, ein pH von 7,0 mit HCl (6 mol/L) eingestellt und nochmals 10 min gerührt. Präzipitat und Filtrat wurden mit einem Faltenfilter (Rotilabo-Faltenfilter, Typ 600P CA21.1, Porengröße 13 μm) getrennt (Filtration 1). Das α - und β -caseinreiche Präzipitat 1 wurde bei 20 ± 1 °C in entionisiertem Wasser resuspendiert, im Wasserbad bei 3,5 °C für 120 min temperiert und anschließend mit HCL (6 mol/L) auf pH 4,6 gesäuert. Durch nachfolgende Filtration (Whatman 595 1/2, Porengröße 4 – 7 μm) wurde α -caseinreiches Präzipitat 2 und β -caseinreiches Filtrat 2 erhalten. Das Filtrat 2 wurde auf 35 °C (pH 4,6) erwärmt, sodass β -Casein ausfiel. Durch Filtration wurde das β -caseinreiche Präzipitat 3 gewonnen; das Filtrat wurde verworfen. κ -Casein wurde durch Salzsäurefällung bei pH 4,3 und 20 ± 1 °C und anschließender Filtration aus Filtrat 1 gewonnen. Das κ -caseinreiche Präzipitat 4 wurde in entionisiertem Wasser bei pH 4,5 resuspendiert. Das Resuspendat wurde filtriert und κ -caseinreiches Präzipitat 5 erhalten. Die Präzipitate 2, 3 und 5 wurden bei -18 °C gelagert und in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) mit Vakuumpumpe (Drehschieberpumpe RZ 2.5,

Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $0,1\text{ mbar}$ über 4 d gefriergetrocknet und mit Mörser und Pistill zu Pulver vermahlen.

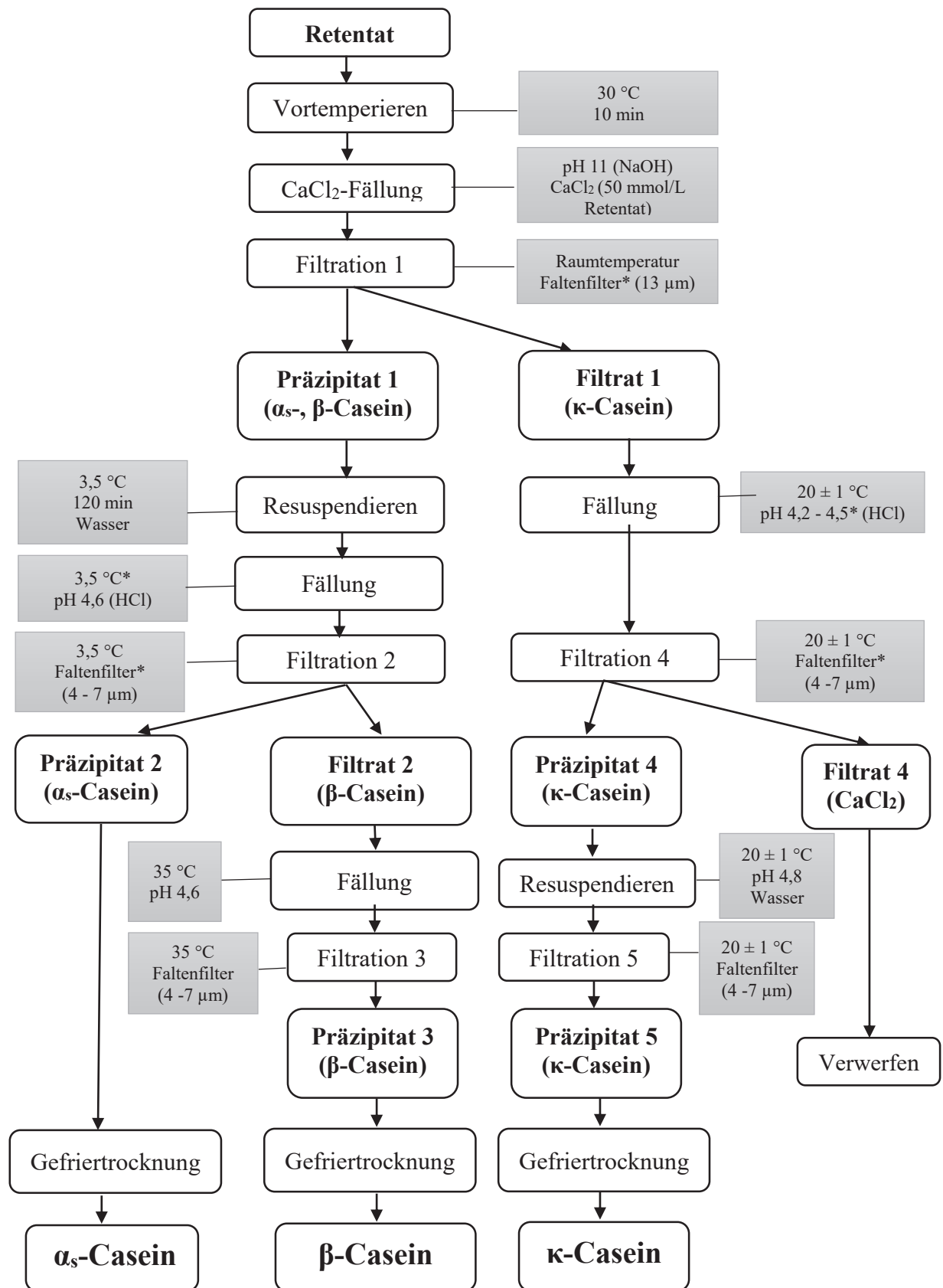


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Isolation von α -, β - und κ -Casein. Variierte Parameter sind mit (*) gekennzeichnet (Vgl. Tabelle 3-3).

3.4.2.2 Variationen in der Durchführung der Calciumchlorid-Fällung

In Tabelle 3-3 sind die variierten Versuchsparameter aufgeführt. Für die Zentrifugation wurden jeweils 30 mL des gefällten Retentats in 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 1000 x g und 20 °C (F1, F3, F4) bzw. 3,5 °C (F2) zentrifugiert. Für die CaCl₂-Lösung wurde eine definierte Menge CaCl₂ (50 mmol/L Retentat) in entionisiertem Wasser (20 mL/L Retentat) gelöst.

Tabelle 3-3: Parameter zur Calciumchlorid-Fällung in Versuch 4 - 9

Ver- such	Separation mit		P1 (Temperatur Säurefällung [°C])	F1 (pH Säurefällung)	Calciumchlorid zugegeben als	
	Zentri- fuge	Falten- filter			Fest- stoff	Lösung
V4	+	+	3,5	3,8	+	+
V5	-	+	3,5	3,8	+	+
V6	-	+	3,5	3,8	+	-
V7	-	+	2 und 20	4,6	+	-
V8	-	+	3,5	4,2	+	-
V9	-	+	3,5	4,5	+	-

* P1 = Präzipitat 1

** F1 = Filtrat 1

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Trockenmasse und Aschegehalt

Um verlässliche Werte für geringe Probenmengen des Caseinpulvers zu erhalten, kam die Thermogravimetrie zum Einsatz. Die thermogravimetrische Analyse ausgewählter Proben wurde am Institut für Verfahrenstechnik und Umwelttechnik (TU Dresden) von Frau Dr. rer. nat. Kathrin Gebauer zur Bestimmung der Trockenmasse und des Aschegehaltes jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die Proben (ca. 30 mg) auf den Analysetiegel einer Mettler Toledo TGA/DSC 1 HAT (Mettler Toledo Inc., Columbus, USA) aufgetragen und mit 10 K/min auf 103 °C aufgeheizt und gleichzeitig ausgewogen. Bei Massekonstanz wurde mit 20 K/min weiter auf 550 °C erhitzt und vollständig verascht.

3.5.2 Proteingehalt nach der Kjeldahl-Methode

Der Stickstoffgehalt der Caseinpulver wurde mit der Kjeldahl-Methode bestimmt (Anonymus, 2001). Im Anhang (Tabelle A 1) sind die verwendeten Lösungen zusammengefasst.

In einem Kjeldahl-Kolben wurden 0,10 g Probe eingewogen, mit 5 g Katalysator und 10 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt und unter schrittweiser steigender

Temperaturerhöhung in einer Aufschlusseinheit (Digestion Unit K-424, BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) erhitzt. Anschließend wurde in der Destillationseinheit Kjelflex K-360 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) die Probe mit NaOH (40 mL) und entionisiertem Wasser (50 mL) destilliert, sodass Ammonium und NaOH in eine Borsäurevorlage (20 mL) getrieben wurden. Das im Standkolben aufgefangene Ammoniumtriborat wurde mit 2 – 3 Tropfen Tashiro-Indikator versetzt und anschließend mit Salzsäure (0,1 mol/L) bis zum Farbumschlag titriert (Matissek, et al., 2014). Eine Blindprobe (5 g Katalysator, 10 mL Schwefelsäure) wurde mitgeführt. Der Gesamtstickstoffgehalt (N) wurde wie folgt berechnet:

$$N = \frac{(a-b) \times 14,008 \times 0,1}{E} \quad \text{Gl. 3-1}$$

N = Stickstoffgehalt in g

a = Volumen HCl für Probe in mL

b = Volumen HCl für Blindprobe in mL

E = Einwaage der Probe in g

14,008 = Molare Masse Stickstoff in g/mol

0,1 = Stoffmengenkonzentration HCl in mol/L

Durch Multiplikation mit dem produktspezifischen Umrechnungsfaktor $F = 6,38$ wurde der Proteingehalt aus dem Gesamtstickstoffgehalt berechnet (McSweeney & Fox, 2013). Die Analyse wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese bewegen sich Partikel und Moleküle gerichtet in einem elektrischen Feld. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von Nettoladung und Größe der Moleküle. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren bei dem Proteine vor der Elektrophorese durch das negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (1,4 g pro g Protein) solubilisiert und denaturiert werden. Dadurch wird eine negative Gesamtladung geschaffen, sodass jedes Protein ein einheitliches Masse-Ladungs-Verhältnis besitzt und die elektrophoretische Mobilität der Proteinmoleküle nur noch von ihrem Molekulargewicht und nicht von ihrer ursprünglichen Ladung abhängig ist. So können mit der SDS-PAGE Proteine fraktioniert und deren Molekulargewicht durch Verwendung eines Proteinmarker-Gemisches semi-quantitativ bestimmt werden (Matissek et al., 2014). Das Gelnetzwerk besteht aus polymerisierten

Acrylamidmonomeren, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid vernetzt sind. Ausschlaggebend für die Porengröße des Gels ist die Konzentration an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Polyacrylamidgele enthalten zwischen 7,5 % und 16 % Acrylamid. Dabei können größere Proteine (50000 – 200000 Da) mit geringerem Acryamidgehalt und kleinere Proteine (15000-50000 Da) mit höherem Acryamidgehalt getrennt werden. Ausgelöst wird die Polymerisation der Acrylamidmonomere durch den Radikalbildner Ammoniumperoxidsulfat und den Katalysator Tetramethylethyldiamin. Die Auftrennung der Proteine wird durch Harnstoff (Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen und Herabsetzung hydrophober Wechselwirkungen schwer löslicher Proteinaggregate), reduzierendes Dithiothreitol, Aufspaltung von Disulfidbrückenbindungen) und Erhitzung (Denaturierung der Proteine) bewirkt (Matissek et al., 2014, Menter, 2000).

Im Anhang sind alle verwendeten Lösungen mit Zusammensetzung in Tabelle A 2 zusammengefasst. Zum Einsatz kamen eine Gelelektrophoreseapparatur und Elektrophoreseplatten mit den Abmaßen 100 mm x 80 mm (C. B. S. Scientific, San Diego, USA). Das Trenngel wurde gemäß Pipettierschema hergestellt und zwischen die Platten gegossen (Tabelle 3-4). Um ein Austrocknen während der Polymerisierung zu vermeiden, wurde die Lösung mit Ethanol überschichtet, welches danach wieder abgegossen wurde. Darauffolgend wurde das Sammelgel gemäß Pipettierschema (Tabelle 3-4) hergestellt, in die Platten gegossen, mit dem Probenkamm versehen und 24 h zur vollständigen Polymerisierung ruhen gelassen. Die Platten wurden abschließend in die mit Laufpuffer befüllte Kammer eingesetzt.

Tabelle 3-4: Pipettierschema zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen	Trenngel [µL] 12,5 % Polyacrylamid	Sammelgel [µL] 4 % Polyacrylamid
Acrylamid-Stammlösung (18%)	8340	1560
Trenngelpuffer	3350	-
Sammelgelpuffer	-	2310
Entionisiertes Wasser	-	3130
5 – 10 min im Vakuum entgasen		
Natriumdodecylsulfat-Lösung	120	80
Tetramethylethyldiamin-Lösung	10	10
Ammoniumperoxidsulfat-Lösung	60	30

Zunächst wurden 0,05 g der Probe in 1 mL NaOH (0,1 mol/L) gelöst. Um ein SDS-Protein-Verhältnis von 1,4:1 zu erhalten, wurden 50 µL dieser Lösung mit 150 µL Harnstofflösung, 150 µL Probenpuffer und 10 µL Dithiothreitol versetzt und für 5 min

in siedendem Wasser gekocht. Anschließend wurden jeweils 10 µL der Probelösung in die Probentaschen injiziert. Die Apparatur wurde mit dem Kühlkreislauf und der Stromversorgung verbunden. Es wurde zunächst eine Spannung von 60 V angelegt, die auf 120 V erhöht wurde nachdem die Probenfront das Trenngel passiert hat. Ein Durchlauf dauerte zwischen 2 und 3 h. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung auf einem Laborschüttler (MTS 4, IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) für 45 min gefärbt. Abschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit einer Entfärbelösung entfernt. Die Entfärbelösung wurde dabei so oft gewechselt bis die Banden eindeutig erkennbar waren. Die Gele wurden zur Archivierung bei 300 x 300 dpi gescannt und visuell mittels Vergleich mit Standards (α -, β -, κ -Casein sowie α -La, β -LG und Rinderalbumin; 10 g/L) und über Farbdichtemessung mit der Software „CLIQS“ (Version 1.0, Totallab Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) ausgewertet. Die Banden konnten mit der Software durch manuelle Markierung von Anzahl, Position und Krümmung der Spuren automatisch detektiert werden. Nicht erkannte Banden wurden manuell ausgewählt. Der Hintergrund wurde über die „Rolling-Ball“-Funktion mit dem Wert 100 normiert. Innerhalb einer Spur wurde von der Software eine Farbdichtekurve erzeugt, die in die einzelnen Banden zerlegt wurde. So wurde ein Integral der normierten Farbdichte für eine Bande erzeugt. Über dieses Integral konnte der Flächeninhalt berechnet werden. Dieser Flächeninhalt wurde durch den Gesamtflächeninhalt aller Banden dividiert, sodass der prozentuale Anteil des Proteins erhalten wurde. Die Analysen wurden in Einfachbestimmung ausgeführt.

3.5.4 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde zur Bestimmung des Polymerisierungsgrades eingesetzt. Sie ist eine spezielle Variante der Flüssigkeitschromatographie. Sie ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht. Als Trennmedium werden quervernetzte hydrophile Makromoleküle, wie Dextran, Agarose oder Acrylderivate eingesetzt, welche in Form poröser Kügelchen (\varnothing 5-50 µm) in der Säule vorliegen. Aufgrund ihrer geringen Molekülgröße können niedermolekulare Proteine in kleine als auch große Poren eindringen, während hochmolekulare Proteine nur in größere Poren eindringen können. So verbleiben niedermolekulare Proteine länger in der Säule. Durch Variation der Kügelchengröße wird die Porengröße und somit die

Trennschärfe verändert. So kann mit kleineren Kügelchen die Trennschärfe erhöht werden (Hagel, 2011; Jahnsohn & Rothhämel, 2012; Striegel et al., 2009; Winter et al., 2011). Die Detektion der eluierenden Moleküle kann mit einem Brechungsindex-, Lichtstreu-, Viskositäts-, UV- oder UV-Photodiodenarraydetektor (Heinzmann, 2014) erfolgen. Mit der präparativen GPC können im Gegensatz zur analytischen GPC die aufgetragenen fraktionierten Proben zurückgewonnen werden (Hagel, 2011).

Es wurde mit einer Flüssigchromatographie-Anlage (Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) mit der Säule Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) gearbeitet. Zunächst wurde der Elutionspuffer (Tabelle A-3) hergestellt, vakuumfiltriert (regenerierte Cellulose, Porengröße 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) und anschließend für 30 min im Ultraschallbad (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) entgast. Der Probenpuffer (pH 6,8) wurde aus dem Elutionspuffer und 100 g/L Dithiothreitol hergestellt (Siegl, 2003). Dann wurden 925 µL Probenpuffer mit 75 µL Caseinlösung (Proteingehalt = 2 g/L) gemischt und über Nacht bei 5 °C gelagert, um Disulfidbrücken zu spalten. Vor der Probenaufgabe wurde die Probelösung mit einem Spritzenvorsatzfilter (regenerierte Cellulose, Porengröße 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) filtriert. Eine Probenmenge von 100 µL wurde auf die Säule aufgetragen. Die Messung fand bei einer isokratischen Flussrate von 0,5 mL/min und bei Raumtemperatur statt. Die Caseine wurden mit einem UV-Detektor (K-251, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) bei 280 nm detektiert (Raak, 2013). Die Auswertung erfolgte anhand der Chromatogramme, die mit der Software ClarityChrom 3.0.7 (Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) aufgenommen und verarbeitet wurden. Da die Peaks der Di- und Trimere keine scharfe Trennung zeigten, wurden sie den Polymeren zugeordnet. Zur Bestimmung des Monomer- und Polymergehaltes wurden die Flächen unter den jeweiligen Peaks berechnet und durch den Gesamtflächeninhalt von Mono- und Polymeren dividiert. So konnten die Massenanteile X_i der Mono- und Polymere bestimmt werden.

Mit folgender Gleichung wurde der Polymerisierungsgrad (PG) berechnet:

$$PG = X_{\text{Polymer}} \times 100 \% = (1 - X_{\text{Monomer}}) \times 100 \% \quad \text{Gl. 3-2}$$

3.6 Charakterisierung der Caseinfraktionen

Die Fraktionen ließen sich anhand von Ausbeute, Reinheit und Wiederfindung charakterisieren und vergleichen. Die Berechnungen wurden aus der Arbeit von Atamer et al. (2016) entnommen und leicht modifiziert.

Die Fraktionen lagen in Form von Pulvern (m_P) vor. Von diesen wurde der Proteingehalt mittels Kjeldahl bestimmt. Über diesen konnte dann die Masse an Protein (m_{Pr}) in der Fraktion berechnet werden (Gl. 3-3). Die Anteile an α -, β - und κ -Casein vom Protein der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und der Software „CLIQS“ ermittelt. Anhand des Beispiels der β -Caseinfraktion sind die weiteren Berechnungen erläutert. Zur Bestimmung der Reinheit (P) wurde das Produkt aus der Masse an Protein (m_{Pr}) und dem Gehalt an β -Casein in der Fraktion ($C_{\beta-CN,Fraktion}$) durch die Gesamtmasse der Fraktion (m_F) geteilt (Gl. 3-4). Die Ausbeute (Y) ist das aus dem Gesamtcasein gewonnene β -Casein. Dazu wurde das Produkt aus m_{Pr} und $P_{\beta-CN}$ durch das Gesamtcasein im MMP ($m_{CN,MMP}$) dividiert (Gl. 3-5). Die Wiederfindung (R) gibt an wie viel β -Casein aus der tatsächlich vorhandenen Caseinfraktion isoliert werden konnte. Dazu wurde das Produkt aus m_{Pr} und $P_{\beta-CN}$ durch die Masse des β -Caseins im MMP dividiert (Gl. 3-6).

$$m_{Pr} = \frac{m_F \times c_{Pr}}{100} \quad \text{Gl. 3-3}$$

$$P_{\beta-CN} = \frac{m_{Pr} \times c_{\beta-CN,Fraktion}}{m_P} \quad \text{Gl. 3-4}$$

$$Y_{\beta-CN} = \frac{m_{Pr} \times P_{\beta-CN}}{m_{CN,MMP}} \quad \text{Gl. 3-5}$$

$$R_{\beta-CN} = \frac{m_{Pr} \times P_{\beta-CN}}{m_{\beta-CN,MMP}} \times 100 \quad \text{Gl. 3-6}$$

3.7 Herstellung der Probenlösungen

3.7.1 Herstellung von Natriumcaseinatlösungen

Zur Herstellung von kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (kNCL) wurde Säurecasein (27 g Protein/kg) in Wasser suspendiert, der pH mit 1 mol/L NaOH auf 6,7 eingestellt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zum Konservieren wurde Natriumazid (0,3 g/kg) zugesetzt. Aus den in Versuch 9 isolierten Caseinfraktionen wurde nach demselben Vorgehen fraktionierte Natriumcaseinatlösung (fNCL) hergestellt.

Drei verschiedene fNCL-Mischungen (27 g Protein/kg) wurden hergestellt: α -fNCL, α - κ -fNCL und α - β - κ -fNCL. Das Verhältnis der Fraktionen für die α - κ -fNCL und die α - β - κ -fNCL ergab sich aus der Masse der ausgewogenen Fraktionen (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Masseverhältnisse der Caseinfraktionen

Fraktion	Masse Pulver [g]	Proteingehalt [g/100 g]	Masse [g]	Protein	Anteil [%]
α	68,44	94,66	64,99		65,25
β (Permeat)	22,86	92,98	21,36		21,44
κ	14,60	90,82	13,26		13,31
Gesamt			99,61		100

Für die α - κ -fNCL wurden die Massen beider Fraktionen zusammengerechnet und dann die jeweilige Fraktion durch diese Summe dividiert (Abbildung 3-5). Gemäß Tabelle 3-6 wurden dann jeweils 300 mL fNCL hergestellt.

$$\begin{aligned}
 &64,99 \text{ g } \alpha\text{-Casein} + 13,26 \text{ g } \kappa\text{-Casein} = 78,25 \text{ g} \\
 &\text{Anteil } \alpha\text{-Casein} = \frac{64,99 \text{ g}}{78,25 \text{ g}} \times 100 = 83,05 \% \\
 &\text{Anteil } \kappa\text{-Casein} = \frac{13,26 \text{ g}}{78,25 \text{ g}} \times 100 = 16,95 \%
 \end{aligned}$$

Abbildung 3-5: Berechnung der Zusammensetzung der α - κ -fNCL

Tabelle 3-6: Zusammensetzung der fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL)

	Abkürzung	Anteil α -fNCL [g/kg]	Anteil β -fNCL [g/kg]	Anteil κ -fNCL [g/kg]
α -fNCL	M4	100	0	0
α - κ -fNCL	M5	830,5	0	169,5
α - β - κ -fNCL	M6	652,5	214,4	133,1

3.7.2 Inkubation mit mikrobieller Transglutaminase

Die NCL wurde im Wasserbad auf 40 °C vortemperiert. MTGase (3 U/g Casein (90 U/g; Ajinomoto Food Europe S.A.S., Paris, Frankreich)) wurde in 2 mL entionisiertem Wasser suspendiert und der NCL zugesetzt. Die kNCL wurde unterschiedlich lang (1 h, 3 h, 5 h, 6 h, 7 h, 16 h und 24 h) und die fNCL 3 h mit mTGase bei 40 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben zur Inaktivierung der mTGase für 10 min bei 85 °C erhitzt und danach in Eiswasser abgekühlt. Eine Probe ohne mTGase diente als Referenz.

3.7.3 Herstellung von angereicherter rekonstituierter Magermilch

Um den Einfluss von enzymatisch quervernetztem Natriumcaseinat auf die Gelbildung von Milch zu untersuchen, wurde RMM mit 150 g/kg Trockenmasse als Basismilch hergestellt (Tabelle 3-7). Die Magermilch wurde 2:0,5:0,5 mit NCL und Wasser (M2) oder 2:1 mit NCL (M3) versetzt. Als Referenz diente eine mit Wasser versetzte Magermilch (M1) im Verhältnis 2:1 (Magermilch:Wasser), um eine gleiche Trockenmasse der Magermilch wie in den anderen Mischungen zu gewährleisten. Der Anteil sowie die Trockenmasse der Magermilch blieb in allen Mischungen gleich. Die Trockenmasse der Magermilchmischungen wurde durch die Anreicherung mit NCL (und Wasser) variiert. Für die fraktionierten NCL wurden ebenfalls die fNCL und eine Mischung mit Magermilch im Verhältnis 2:1 (Milch:fNCL) untersucht (Tabelle 3-8). Anschließend wurde die Magermilch für 10 min bei 90 °C erhitzt und danach in Eiswasser abgekühlt.

Tabelle 3-7: Versuchsreihen mit kommerzieller Natriumcaseinatlösung

	M0	Milch	M1	M2	M3
Zusammensetzung	kNCL	MM	MM:ent.H ₂ O	MM:ent.H ₂ O:NCL	MM:NCL
g*					
Verhältnis	1	1	2:1	2:0,5:0,5	2:1
Trockenmasse	28,8	144,0	96	100,8	105,6
[g/kg]					
Proteingehalt	27,0	51,3	34,2	38,7	43,2
[g/kg]					

* kNCL = kommerzielle Natriumcaseinatlösung, MM = Magermilch, Ent. H₂O = entionisiertes Wasser

Tabelle 3-8: Versuchsreihen mit fraktionierter Natriumcaseinatlösung

	M4A	M5A	M6A	M4B	M5B	M6B
Zusammensetzung*	α-fNCL	α-k-fNCL	α-β-k-fNCL	MM: α-fNCL	MM: α-k-fNCL	MM: α-β-k-fNCL
Verhältnis	1	1	1	2:1	2:1	2:1
Trockenmasse	28,4	28,7	28,9	105,5	105,8	105,9
[g/kg]						
Proteingehalt	27,0	27,0	27,0	43,20	43,20	43,20
[g/kg]						

* fNCL = fraktionierte Natriumcaseinatlösung; MM = Magermilch

3.8 Dynamische Messungen am Rheometer

Messungen im Oszillationsmodus wurden mit dem deformationsgesteuerten Couette-Rheometer ARES RFS3 (TA Instruments, Alzenau, Deutschland) mit einer Zylindergemometrie ($d_A = 34$ mm, $d_i = 32$ mm, $h = 33,5$ mm) und einer wasserbadgesteuerten (DC8, Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Temperierung am Außenzylinder ($30 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt. Es wurde bei einer Frequenz $\omega = 1 \text{ rad/s}$ und einer Deformation $\gamma = 0,003$ gemessen, wobei alle 60 s ein Wert detektiert wurde. Es wurde das Drehmoment aufgenommen, aus dem der Speichermodul $G' \text{ [Pa]}$ in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt wurde. Der maximale Speichermodul $G'_{\max} \text{ [Pa]}$ wurde als maximale Gelsteifigkeit aus den Kurven extrahiert.

Zur Messung wurden 12 mL Probe mit GDL (Tabelle 3-9) versetzt und in den Außenzylinder gebracht. Der Innenzylinder wurde in den Außenzylinder abgesenkt, sodass die Probe die gesamte Mantelfläche des Innenzylinders bedeckte. Dann wurde die Messung gestartet. Die Zeit zwischen GDL-Zugabe und Start der Messung wurde in den Ergebnissen berücksichtigt. Alle angegebenen Ergebnisse der Versuche mit Milch, kNCL und mit kNCL angereicherter Magermilch sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Versuche mit fNCL und mit fNCL angereicherter Magermilch wurden aus Zeitgründen nur in Einfachbestimmung ausgeführt.

Parallel zu den rheologischen Messungen wurde in Doppelbestimmung jeweils der pH-Verlauf der Proben aufgenommen. Dazu wurden 5 mL der Probe auf $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ vortemperiert, mit GDL versetzt und alle 60 s der pH mit einem pH-Meter mit Speicherfunktion (WTW inolab pH 730, Weilheim, Deutschland) bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen.

Tabelle 3-9: GDL-Mengen zur rheologischen Erfassung der Gelbildung

	M0	M1 - M3	M4A – M6A	M4B – M6B
Menge GDL	40	40	15	40
[g/L]	20			

3.9 Bestimmung der Synäreseneigung

Das Wasserbindungsvermögen der Milchgele wurde mittels Synäresetest ermittelt. Dazu wurden 30 g Probe in einem Zentrifugenröhrchen auf $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ vortemperiert, mit 40 g/L GDL versetzt und eine definierte Zeit im Wasserbad bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gesäuert. Die Säuerungszeit entsprach der Zeit des Erreichens der maximalen Gelsteifigkeit, die aus der Gelbildungskurve hervorging. Danach wurde die Probe in Eiswasser abgekühlt und anschließend in einer Zentrifuge (Sigma 3-30K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) bei $1000 \times g$ und einer Temperatur von $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min zentrifugiert. Das Gewicht des Zentrifugenröhrchens samt Probe wurde ausgewogen, dann wurde das Serum

abgenommen und nochmals das Gewicht bestimmt. Anhand der Differenz der Auswaagen konnte dann die Synäreseneigung berechnet werden (Gl. 3-7).

$$SN = \left(\frac{\text{Masse vor Synärese} - \text{Masse nach Synärese}}{\text{Masse vor Synärese}} \right)^* \times 100 \% \quad \text{Gl. 3-7}$$

* Das Leergewicht des Zentrifugenröhrchens wurde bereits subtrahiert
SN = Synäreseneigung

3.10 Thromboelastometrie

Die Thromboelastometrie (TEM) ist ein Verfahren für die Charakterisierung des Gerinnungsverhaltens von Blut. Zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften einer Blutprobe wird diese mit einem Koagulationsaktivator versetzt und bei niedrigen Scherkräften analysiert. Das Gerät besteht aus einer Küvette und einem Stift, der an einem Torsionsdraht aufgehängt ist. Die Probe (0,36 mL) wird in die Küvette gefüllt, in die der Stift herabgesenkt wird (Donahue & Otto, 2005). Der Becher oszilliert in einem Winkel von 4,75 ° um den Stift. Mit Einsetzen der Blutgerinnung werden Fibrinstränge zwischen Becher und Stift gebildet, wodurch der Stift der Oszillation des Bechers folgt und das Drehmoment erhöht wird (Bolliger et al., 2012).

Dem Thromboelastogramm können u. a. die Reaktionszeit R und die Maximale Amplitude MA entnommen werden (Abbildung 3-6). Die Reaktionszeit gibt die Zeit in s vom Start der Messung bis zum Beginn der Gelbildung an. Die Maximale Amplitude ist die Hälfte des maximalen Abstandes in mm zwischen zwei auseinanderlaufenden Zweigen (Donahue & Otto, 2005; Larsen et al., 2011).

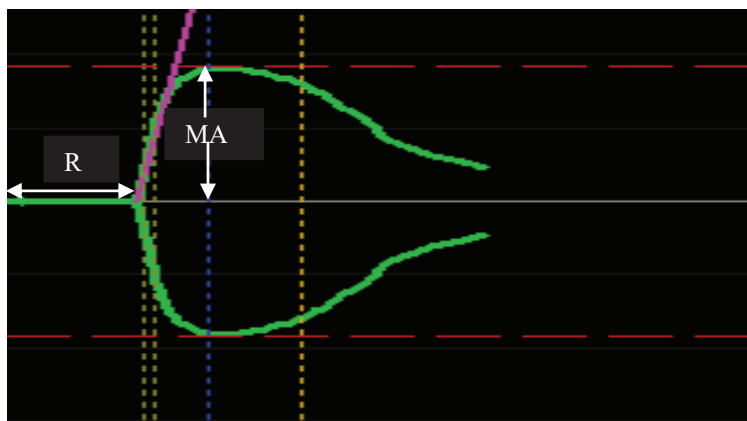


Abbildung 3-6: Thromboelastogramm: R = Reaktionszeit, MA = Maximale Amplitude

Ähnlich wie bei der Rheometrie können auch mit der TEM Rückschlüsse auf die maximale Gelsteifigkeit (G'_{\max} bzw. MA) und die Gerinnungszeit t ($G' \geq 1$) bzw. Reaktionszeit von säureinduzierten Milchgelen gezogen werden. Der Vorteil der TEM ist der Einsatz geringer Probenvolumina (0,36 mL) (Raak et al., 2015).

Die Messungen wurden mit dem ThromboElastoMeter-Automated (TEM-A, Framar Hemologix, Rom, Italien) bei 30 °C durchgeführt. Zur Messung wurden 500 µL auf 30 °C vortemperierte Probe mit GDL versetzt (Tabelle 3-9) und mit einem Vortexer gemischt. Daraus wurde ein Probenvolumen von 360 µL in den Becher injiziert und anschließend der Stift mechanisch in den probegefüllten Becher getaucht. Der Start der Messung erfolgte 2 min nach der GDL-Zugabe. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse wurden mit den rheologischen Daten verglichen.

3.11 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Gelbildungsversuche (G'_{\max} , MA, Gelbildungsstartzeit) sowie der Synäreseneigung wurde mit Excel durchgeführt. Wurden zwei Messdurchläufe verglichen, so wurde der t-Test bei unabhängigen Stichproben angewendet. Zuvor wurde der Zwei-Stichproben F-Test zur Ermittlung gleicher oder unterschiedlicher Varianzen angewendet. Für den Vergleich von 3 Messdurchläufen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau für die statistische Auswertung betrug $p < 0,05$. Die Berechnung der mittleren Abweichungen erfolgte für Analysedaten mit $n = 2$ über die halbe Differenz (Gl. 3-8) und für Analysedaten mit $n = 3$ über die Standardabweichung (Gl. 3-9).

$$x = \frac{d}{2} \quad \text{Gl. 3-8}$$

d = Differenz zwischen den beiden Mittelwerten

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}} \quad \text{Gl. 3-9}$$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Gewinnung von Caseinfraktionen

4.1.1 Charakterisierung Magermilchpulver

Zur Bestimmung von Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit der Fraktionen, wurde zunächst das Milchpulver charakterisiert. Es wurden 500 g MMP (Proteingehalt: 345,7 g/kg) in 4500 g entionisiertem gelöst. Dies entsprach einem Proteingehalt von 172,85 g/500 g MMP. In Tabelle 4-1 ist die Proteinverteilung dargestellt.

Tabelle 4-1: Proteinverteilung in Magermilchpulver bestimmt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

*	α -La [g]	β -Lg [g]	BSA [g]	α -CN [g]	β -CN [g]	κ -CN [g]
In 500 g MMP	23,38	7,75	1,95	75,45	49,54	14,78
In 100 g MMP	4,68	1,55	0,39	15,09	9,91	2,96

* α -La = α -Lactalbumin; β -Lg = β -Lactoglobulin; BSA = Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin); α -CN = α -Casein; β -CN = β -Casein; κ -CN = κ -Casein

4.1.2 Hinweise zur Auswertung

RMM wurde mikrofiltriert, um β -Casein zu isolieren. α - und κ -Casein sowie verbliebenes β -Casein wurden aus dem Retentat durch selektive Fällung unter Einsatz von CaCl_2 gewonnen.

Bei der Analyse der α - und κ -Caseinfraktionen mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese kam es am Probeneintritt zu einer Ansammlung größerer Moleküle wie Oligomere bzw. Polymere aufgrund nicht aufgespaltener Bindungen (Abbildung 4-1). Dies können Disulfidbrücken (κ -Casein, α_{s2} -Casein, α -La) oder intermolekulare Proteinbindungen sein. Gründe für diese nicht aufgespalteten Bindungen können zu wenig Dithiothreitol (für die Disulfidbrücken), zu wenig Harnstoff oder eine unzureichende Erhitzung (zu kurz, zu niedrige Temperatur) sein.

Außerdem wurden im oberen Teil des Gels Banden (hauptsächlich bei den α - und κ -Caseinfraktionen) detektiert, die den eingesetzten Standards nicht zugeordnet werden konnten. Diese wurden als „nicht zugeordnet“ definiert (Abb. 4-1). In einigen Studien wurden diese Banden als Polymere identifiziert (Myllärinen et al., 2007; Partanen et al., 2008). Das Ausgangsmaterial in diesen Studien war allerdings quervernetztes kommerzielles Natriumcaseinat, das nicht unbeschränkt vergleichbar ist mit den in dieser Arbeit gewonnen Caseinfraktionen. Deswegen kann nicht zweifellos davon ausgegangen werden, dass gleiche Banden die gleichen Proteine darstellen.

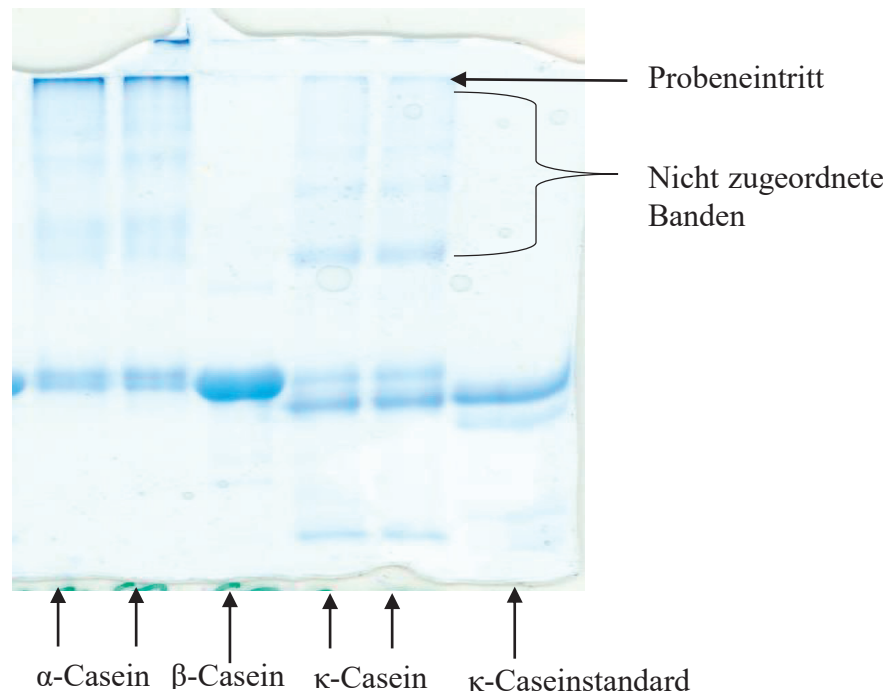


Abbildung 4-1: Gel einer Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese-Analyse: Am Probeneintritt von α- und κ-Casein sind Molekülansammlungen zu erkennen.

4.1.3 Ermittlung der maximalen β-Caseinausbeute

Zuerst wurde ermittelt wie viel Diafiltrationsmittel (DFM) notwendig ist, um eine maximale Ausbeute an β-Casein zu erhalten. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen an β-Casein (Proteinkonzentration) in den Permeaten herangezogen (Abbildung 4-2), die mittels Auswertung der SDS-PAGE bestimmt wurden. Dazu war ein Vergleich mit einem β-Caseinstandard bekannter Konzentration (10 g β-Casein/L) notwendig. Durch Zugabe von 30 µL dieses β-Caseinstandards zu 310 µL Probelösung, wurde eine Konzentration von 0,882 µg β-Caseinstandard/µL Probelösung eingestellt. Davon wurden 10 µL in die Probentaschen injiziert, was einer Konzentration von 8,82 µg/10 µL (8,82 g/10 L) entsprach. Die Peakhöhen von β-Casein im Standard und in den Permeatproben wurden mittels der Software *CLIQS* bestimmt und anhand Gl. 4-1 die Konzentration an β-Casein im Permeat berechnet.

$$C_{\beta-CN,Fraktion,Probe} = \frac{\frac{c_{\beta-CN,Standard} \times h_{\beta-CN,Fraktion}}{h_{\beta-CN,Standard}} \times V_{Probelösung}}{V_{\beta-CN,Fraktion,Lösung} \times V_{Probentasche}} \quad \text{Gl. 4-1}$$

c_i = Proteinkonzentration

h_i = Peakhöhe

V_i = Volumen

Gemäß Tabelle 3-3 wurde das zugeführte Volumen an DFM zum Retentat in V2-V4 variiert. In Abbildung 4-2 ist die β -Caseinkonzentration über das Volumen des DFM aufgetragen. Das Zuführen von 12 L DFM (V2) zeigte keinen Rückgang der β -Caseinkonzentration im Permeat. Dagegen waren Ausbeute und Wiederfindung gering (Tabelle 4-2). Bis zu 20 L DFM blieb die β -Caseinkonzentration im entnommenen Permeat konstant, begann dann stark zu sinken bis zu 30 L (V3) bzw. 40 (V4) und stagnierte bis zu 50 L (V4). Bereits am dritten Tag der Filtration (30 L DFM) enthielt das Retentat nur wenig die Membran passierende Moleküle ($\leq 0,1\mu\text{m}$). Dies zeigte sich an einer raschen Verstopfung der Membran nach wenigen Filtrationen, was durch einen erhöhten Eingangsdruck zu erkennen war. Am vierten Tag (40 L DFM) war die Membran nach den ersten drei Filtrationen schon so verstopft, dass die Pumpleistung um 40 % reduziert werden musste, um den Eingangsdruck auf 2 bar zu regulieren. Um die Membran vor hartnäckiger Verunreinigung und Drucküberlastung zu schützen, wurde entschieden die nächsten Versuche mit 30 L DFM durchzuführen. Der Vergleich der Ausbeuten zeigt, dass dies kaum Verluste brachte (4-2).

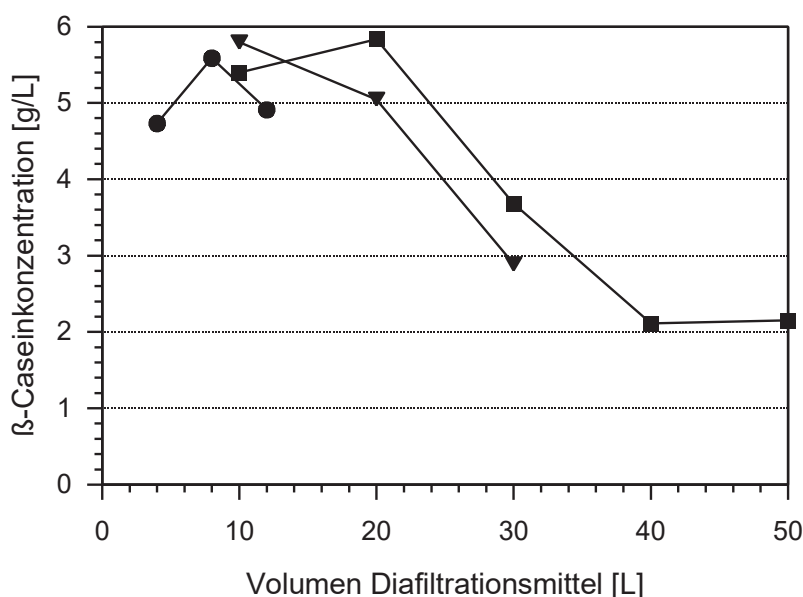


Abbildung 4-2: β -Caseinkonzentration in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen Diafiltrationsmittel: 12 L (Kreise), 30 L (Dreiecke), 50 L (Vierecke).

Tabelle 4-2: Ausbeute und Reinheit der mittels Membranfiltration isolierten β -Caseinfractionen

Versuch (Volumen)	Ausbeute [%]	Wiederfindung [%]	Reinheit [%]
V2 (12 L)	5,92	16,69	88,58
V3 (30 L)	16,15	45,58	82,86
V4 (50 L)	17,49	49,36	86,05

4.1.4 Variation der Calciumchlorid-Fällung

4.1.4.1 Filtrationsmethoden

In Anlehnung an Post & Hinrichs (2010, 2011) wurde in V4 untersucht, ob eine Separation mit Zentrifuge oder Faltenfilter besser geeignet ist. Dafür wurde das Retentat aufgeteilt und unterschiedlich verarbeitet. 1,5 L wurden mit CaCl_2 (kristallin) und anschließend je 0,5 L mit Faltenfilter (F1 und F2) oder Zentrifuge (Z1) separiert. Schon in der Durchführung war ersichtlich, dass die Zentrifugation keinen ausreichenden Separationseffekt erbringt. Die Niederschläge nach dem Zentrifugieren der Präzipitate waren sehr gering oder teilweise nicht vorhanden. Das Auswiegen der gewonnenen Pulver bestätigte diese Beobachtungen. So konnten mittels Zentrifugation lediglich 0,21 (Z1) α -Casein und kein κ -Casein aus 0,5 L Retentat gewonnen werden. Im Gegensatz dazu war bei der Faltenfiltration eine sichtbare Separation zu verzeichnen. Hier konnten 2,48 (F1) bzw. 1,24 g (F2) α -Casein und 4,67 (F1) bzw. 1,83 g (F2) κ -Casein aus jeweils 0,5 L Retentat gewonnen werden. Post & Hinrichs (2011) stellten für κ -Casein keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den in ihrer Arbeit angewandten Methoden fest. Ein Vergleich der Werte zeigt, dass auch in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied vorliegt. Verglichen mit der statistischen Auswertung von Post & Hinrichs (2011) stellte die in dieser Arbeit ermittelte Schwankung der Ausbeute bei κ -Casein bei der Faltenfiltration keinen signifikanten Unterschied dar. β -Casein konnte in beiden Varianten nicht gewonnen werden. Auch konnten höhere Reinheiten des α -Caseins mit dem Faltenfilter (83 % bzw. 78 %) als mit der Zentrifuge (70 %) erreicht werden.

Dass der Separationseffekt mit der Zentrifuge nur gering war, kann daran liegen, dass nur geringe Probenmengen (30 mL) zentrifugiert werden konnten. Durch eine größere Zentrifuge mit mehr Fassungsvermögen könnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Ein weiterer Grund kann die niedrige „Schleuderziffer“ (RZB-Wert) sein. Ein höherer Wert könnte den Separationseffekt verstärken. Die Faltenfiltration brachte zwar Verluste mit sich (Rückstände im Filterpapier), eignete sich aber besser zur Separation kleiner Volumina.

4.1.4.2 Zugabe des Calciumchlorids in kristalliner oder gelöster Form

Aus den Arbeiten von Post & Hinrichs (2010, 2011) geht nicht hervor, in welcher Form das CaCl_2 zugesetzt wurde. Die Zugabe in kristalliner Form zeigte eine

sichtbare Fällung. Allerdings blieb die Vermutung, dass die Zugabe in gelöster Form einen besseren Fällungseffekt bewirken könnte. Deswegen wurde in weiteren Versuchen (V4 und V5) die Zugabe des CaCl_2 variiert. Zur Auswertung wird nur Versuch 5 herangezogen.

Das Retentat wurde in 2 x 2 L aufgeteilt. Für die Prüfung 2 (P2) wurde das CaCl_2 in kristalliner und für die Prüfung 3 (P3) in gelöster Form dem Retentat zugesetzt (Prüfung 1 war mit HCl gefälltes Retentat). Abbildung 4-3 zeigt die Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit der gewonnenen Fraktionen. Da die durchgeführte Methode der von Post & Hinrichs (2011) mit Maschenfilternbeuteln (2 L Prozessvolumen) ähnlich war, wurde deren statistische Auswertung zur Orientierung herangezogen. Die Ausbeuten der β - und κ -Caseinfraktionen zeigten keinen deutlichen Unterschied. Die α -Caseinfraktion könnte einen signifikanten Unterschied zeigen. Bei der Wiederfindung und der Reinheit ist ein signifikanter Unterschied bei allen Fraktionen möglich. Mit Ausnahme von β -Casein konnten für die Fraktionen höhere Reinheiten und Wiederfindungen erzielt werden, wenn das CaCl_2 in kristalliner Form zugesetzt wurde. Die Ausbeute von α -Casein konnte ebenfalls mit kristallinem CaCl_2 erhöht werden. Da die β -Caseinfraktion großteils schon mittels der Membranfiltration isoliert wurde, stand hier die Separation von α - und κ -Casein im Vordergrund. Daher wird mehr Augenmerk auf die Ergebnisse dieser beiden Fraktionen gesetzt. Wird von einer Signifikanz der Unterschiede ausgegangen, so lieferte die Zugabe des CaCl_2 in kristalliner Form bessere Ergebnisse. Somit wurde für die weiteren Versuche CaCl_2 in kristalliner Form verwendet.

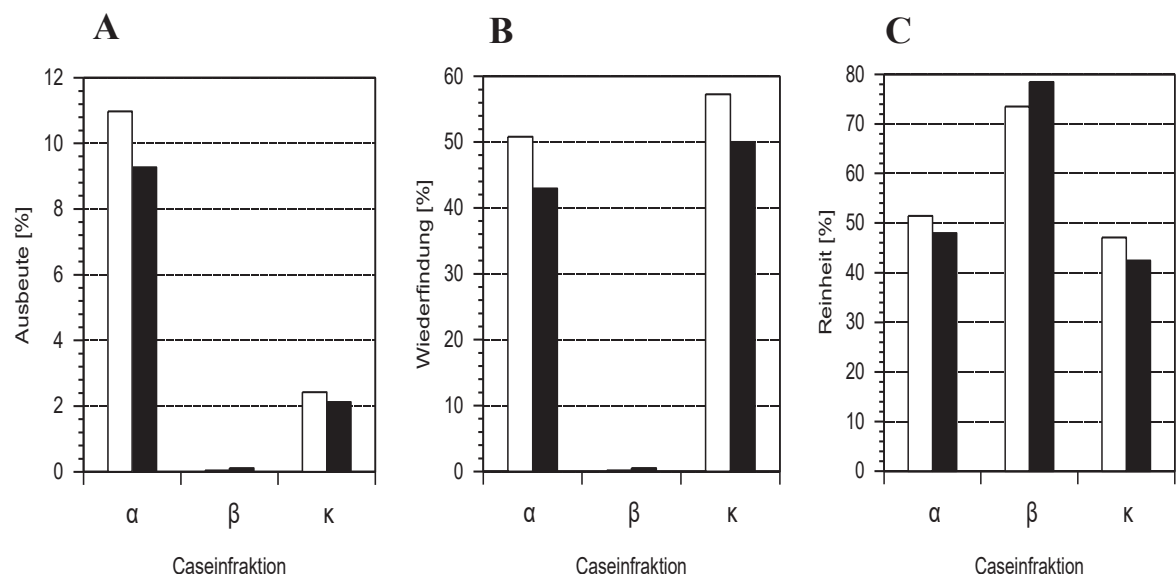


Abbildung 4-3: Zugabe des Calciumchlorids in kristalliner Form (weiß) oder gelöster Form (schwarz) und die Auswirkung auf Ausbeute (A), Wiederfindung (B) und Reinheit (C) der α -, β - und κ -Caseinfraktion.

4.1.4.3 Einfluss der Fällungstemperatur auf die Isolierung von α - und β -Casein

Das aus der Mikrofiltration gewonnene Retentat wurde mit CaCl_2 (kristallin) gefällt und mit Faltenfilter separiert. Das daraus gewonnene α - und β -caseinangereicherte Präzipitat wurde bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in entionisiertem Wasser resuspendiert und 120 min im Wasserbad bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Dieses Resuspendat wurde dann bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ mit HCl auf pH 4,6 gesäuert (Post & Hinrichs, 2011). Es wird vermutet, dass α -Casein durch Senkung des pH auf 4,6 nochmals gefällt wird. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Fällungsreaktion, so liegt die Fällungstemperatur im Bereich von $0 - 20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sauermost & Freudig, 1999). Ziel war es zu untersuchen, ob Ausbeute, Wiederfindung und Reinheit der α - und β -Caseinfraktion erhöht werden können. In Versuch 7 (V7) wurde das Resuspendat (5 L) in $2 \times 2,5 \text{ L}$ aufgeteilt und anschließend bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ mit HCl (6 mol/L) bei pH 4,6 gefällt.

Die Fällung bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ bewirkte eine höhere Ausbeute und Wiederfindung der α -Caseinfraktion als bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abbildung 4-4). Für die β -Caseinfraktion konnte für Ausbeute und Wiederfindung kein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse sollten mit Vorsicht betrachtet werden, da der Feststoffanteil der aufgeteilten Resuspendate höchstwahrscheinlich nicht homogen verteilt war. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Reinheit des Feststoffanteils homogen verteilt war und kann daher zur Beurteilung in Betracht gezogen werden. Es zeigte sich, dass die Fällungstemperatur die Reinheit der α -Caseinfraktion nicht beeinflusst. In V7 wurde in der β -Caseinfraktion bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ eine 3-mal höhere Reinheit als bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ Fällungstemperatur ermittelt (Abbildung 4-4). Da laut Theorie bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ mehr Caseinmonomere aus der Micelle diffundieren, würde dies auch in einer höheren Reinheit resultieren. In zwei weiteren Versuchen (V8 und V9) wurde deshalb zur Überprüfung die Fällung bei $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Es wurde eine Reinheit von 93 % erzielt, was in Einklang mit der Theorie steht (Abbildung 4-4). Es wird vermutet, dass die Proben aus V7 bei der Abfüllung oder der Analyse mittels SDS-PAGE vertauscht wurden.

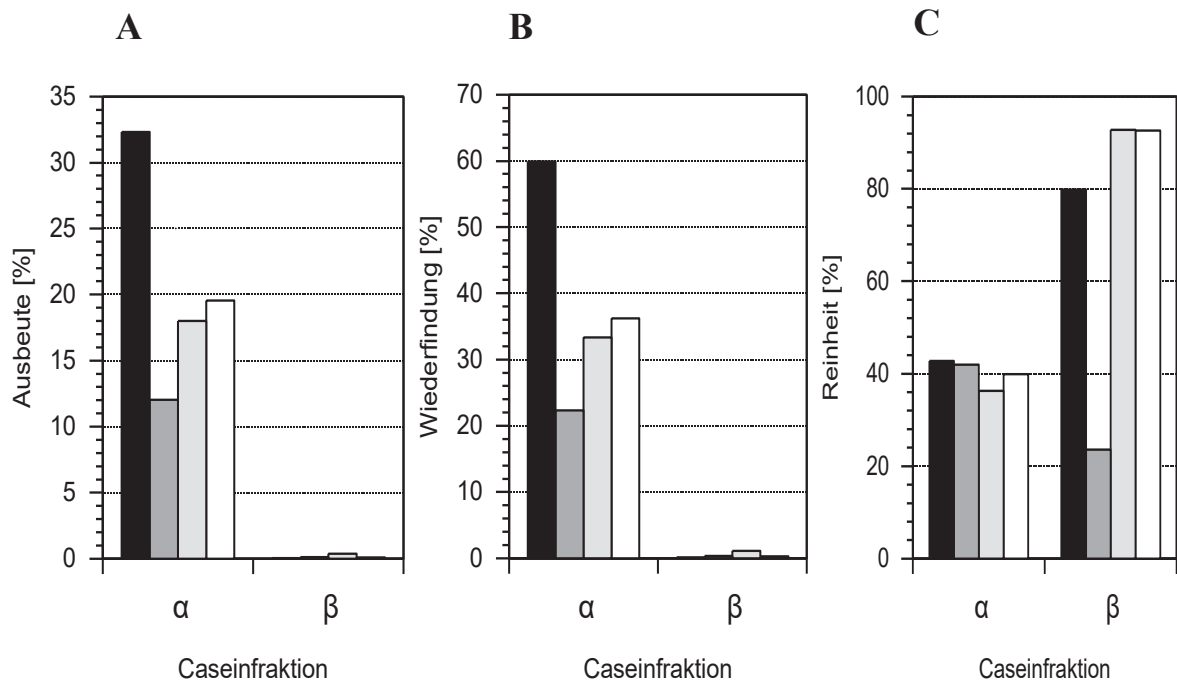


Abbildung 4-4: Einfluss der Fällungstemperatur auf Ausbeute (A), Wiederfindung (B) und Reinheit (C) der α -, β - und κ -Caseinfraction. Versuch 7 bei 20 ± 1 °C gefällt (schwarz), Versuch 7 bei 3,5 °C gefällt (dunkelgrau), Versuch 8 bei 3,5 °C gefällt (hellgrau), Versuch 9 bei 3,5 °C gefällt (weiß).

4.1.4.4 Einfluss des pH auf die Isolierung von κ -Casein

Der von Post & Hinrichs (2011) angegebene pH von 3,8 für die Fällung des κ -caseinreichen Filtrates liegt unter dem in der Literatur angegebenen isoelektrischen Punkt von κ -Casein (pH 4,1-4,8) (Kersten, 2001). Deswegen wurde getestet, ob eine Fällung im pH-Bereich des isoelektrischen Punktes eine bessere Isolierung von κ -Casein bewirkt. Dazu wurde der pH von 3,8 bis 4,6 variiert. Die Erhöhung des pH von 3,8 bis 4,5 zeigte einen Anstieg der Wiederfindung von κ -Casein. Eine weitere Erhöhung auf pH 4,6 bewirkte eine Abnahme der Wiederfindung. Für die Ausbeuten zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Die Reinheiten bei pH 4,2 und 4,5 waren ähnlich und das bei pH 4,6 gefällte κ -Casein hatte die geringste Reinheit (Abbildung 4-5). Diese Ergebnisse bestätigen auch die Beobachtungen einer grobflockigeren Ausfällung während der Durchführung.

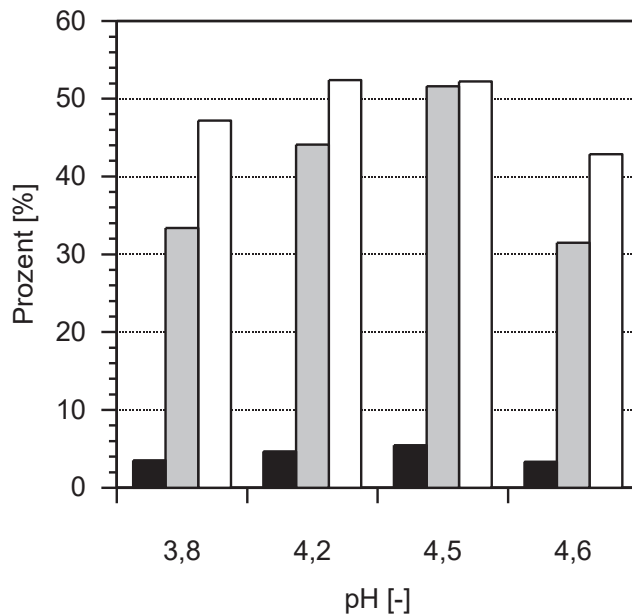


Abbildung 4-5: Abhängigkeit der Ausbeute (schwarz), Wiederfindung (grau) und Reinheit (weiß) des κ -Caseins vom pH der Fällung.

4.1.4.5 Vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung

Durch Mikrofiltration von Magermilch bei 20 ± 1 °C gehen Molkenproteine in das Permeat über, während das Casein im Retentat verbleibt. Es sollte geklärt werden, ob durch eine vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung weniger Molkenproteine in den Fraktionen verbleiben.

Zunächst wird die mittels Mikrofiltration isolierte β -Caseinfraktion betrachtet. Wie in Abbildung 4-6 zu sehen ist, hatte die vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung keinen reduzierenden Einfluss auf den Molkenproteingehalt in der β -Caseinfraktion. Die Molkenproteingehalte der Versuche mit vorgeschalteter Molkenproteinabtrennung (V7, V8) bewegten sich zwischen den Molkenproteingehalten der Versuche ohne vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung (V5, V6). Wobei V5 relativ stark von V7 und V8 abwich. Eine deutliche Zunahme oder Abnahme des Molkenproteinanteils infolge vorgeschalteter Mikrofiltration bei 20 ± 1 °C konnte nicht ermittelt werden. Interessanterweise wurde in den Fraktionen mehr α -La als β -Lg detektiert (Abbildung A-1, Tabelle A-4), obwohl β -Lg (7 – 12 %) einen größeren Anteil des Milchproteingehaltes als α -La (2 – 5 %) ausmacht (Kersten, 2001).

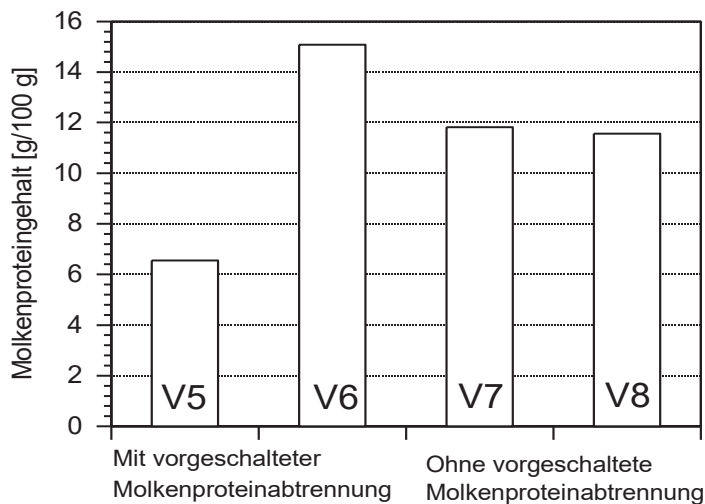


Abbildung 4-6: Einfluss der vorgeschalteten Molkenproteinabtrennung auf den Molkenproteingehalt in der β -Caseinfraction. Der Molkenproteingehalt bezieht sich auf den Proteinanteil der Caseinfraction. Dargestellt ist β -Casein, das mittels Mikrofiltration isoliert wurde.

Die α - und β -Caseinfractionen waren sowohl mit als auch ohne vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung frei von Molkenproteinen, da Molkenprotein bei der Filtration des ausgefällten Retentats in das κ -caseinreiche Filtrat übergang (Abbildung A-2). In den κ -Caseinfractionen wurde nur α -La detektiert (Tabelle A-5). Wie in Abbildung 4-7 zu sehen, gab es eine Schwankung des Molkenproteingehaltes innerhalb der Versuche mit vorgeschalteter Molkenproteinabtrennung (V7, V8) als auch Schwankungen zwischen den Versuchen mit und ohne vorgeschalteter Molkenproteinabtrennung (V6, V7, V8). Der Grund dafür könnte sein, dass α -La besser Calcium bindet als β -Lg (Baumy & Brule, 1988), dadurch an Molekülgröße zunimmt und den Filter nicht mehr durchdringt.

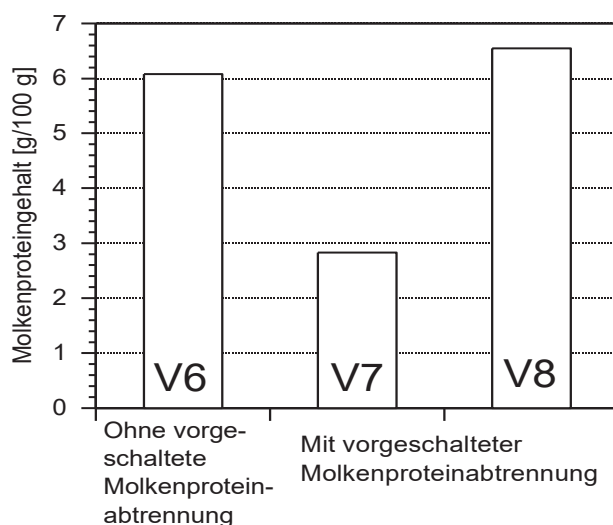


Abbildung 4-7: Abhängigkeit des Molkenproteingehaltes der κ -Caseinfraction von der vorgeschalteten Molkenproteinabtrennung. Der Molkenproteingehalt bezieht sich auf den Proteinanteil der jeweiligen Caseinfraction. V6 (ohne Molkenproteinabtrennung), V7 und V8 (mit Molkenproteinabtrennung).

Dass Molkenproteine in den Fraktionen zurückblieben, könnte an dem eingesetzten Rohstoff Low-Heat-MMP liegen. Durch die Erhitzung bei 70 °C für 15 s können die Molkenproteine Bindungen mit den Caseinmicellen eingehen (Spreer, 2011; Vasbinder et al, 2003).

Eine Reduzierung des Molkenproteingehaltes durch eine vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung konnte nicht erreicht werden. Die vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung hat hinsichtlich der Rückstände in den Fraktionen keinen signifikanten Einfluss, da durch die Filtrationen mit dem Faltenfilter Molkenproteine ohnehin abgetrennt werden. Sinnvoll wäre dieser Schritt zur Gewinnung eines molkenproteinreichen Permeat. Somit kann die Gewinnung von Molkenprotein und Casein verbunden werden, indem das Retentat zur Caseinisolierung genutzt wird. Negative Auswirkungen auf die Caseinisolierung hat die vorgeschaltete Molkenproteinabtrennung nicht.

4.2 Charakterisierung der Caseinfraktionen

4.2.1 α -Casein

Zur Auswertung wurden die Fraktionen aus V8 und V9 herangezogen, da diese der optimierten Verfahrensweise entsprachen. Wie in Tabelle 4-3 zu sehen, unterschieden sich V8 und V9 in Protein- und Aschegehalt. V9 zeigt einen höheren Protein- und Aschegehalt. Die Summe dieser beiden Gehalte übersteigt 1000 g/kg, sodass die Bestimmungen fehlerhaft gewesen sein könnten. Andererseits könnte die Aminosäurezusammensetzung des Caseins die Proteinbestimmungen verfälscht haben. Deswegen wurde der Proteingehalt zusätzlich mit dem spezifischen F-Wert für α_{s1} -Casein (6,34) (McSweeney & Fox, 2013) berechnet. Dies brachte trotzdem Proteingehalte, die in der Summe mit dem Aschegehalt 1000 g/kg überschritten.

Tabelle 4-3: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der α -Caseinfraktion

Versuch	Fraktion	Trockenmasse [g/kg]	Protein g/kg]		Asche g/kg]
			F = 6,38	F = 6,34	
V8	α	964,5	921,4	915,6	85,9
V9	α	960,3	949,6	943,6	114,0

Obwohl Protein- und Aschegehalt bei V8 realistischer erschienen, gestaltete sich die Herstellung der fNCL schwierig. Das α -Casein wurde in Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 6,7 eingestellt. Je mehr NaOH zugegeben wurde, desto gelartiger wurde die fNCL (Abbildung 4-8). Mit dem α -Casein aus V9 konnte eine flüssige fNCL hergestellt werden (Abbildung 4-9).



Abbildung 4-8: α -Natriumcaseinatlösung aus Versuch 8



Abbildung 4-9: α -Natriumcaseinatlösung aus Versuch 9

Die Fehlerquelle, die das unterschiedliche Verhalten hervorgerufen hat, ist noch unklar. In Ausbeute, Reinheit und Wiederfindung beider Fraktionen waren keine deutlichen Unterschiede erkennbar (Tabelle 4-4). Ebenso waren die Gehalte an α - und β -Casein in den α -Caseinfraktionen ähnlich. Unterschiede wurden im Aschegehalt, dem Proteingehalt und dem κ -Caseingehalt der Fraktionen detektiert. So hatte die Fraktion aus V9 einen höheren Asche- und Proteingehalt, enthielt aber kein κ -Casein (Tabelle 4-4). Es wird vermutet, dass die α -Caseinfraktion von V8

einen höheren Calciumrückstand hatte. Das Calcium könnte zu Verknüpfungen der Caseinmoleküle über deren Phosphoserylreste und somit zur Gelbildung geführt haben (Udabage et al., 2001).

Tabelle 4-4: Kriterien zur Beurteilung der α -Caseinfraction sowie Caseinverteilung in den einzelnen Fraktionen.

Versuch	V8	V9
Fraktion	α	α
m_F^* [g]	69,27	68,44
m_{Pr}^{**} [g]	25,15	27,32
Ausbeute [%]	17,99	19,55
Wiederfindung [%]	33,33	36,21
Reinheit [%]	36,30	39,92
Anteil α -Casein [%]	39,40	42,04
Anteil β - Casein [%]	28,70	24,37
Anteil κ - Casein [%]	2,60	0,00
Anteil „Nicht zugeordnet“ [%]	29,30	33,59

* m_F = Masse der Fraktion;

** m_{Pr} = Masse des Proteinanteils der Fraktion

Aufgrund der oben erwähnten Problematik wird somit nur die Caseinfraction aus V9 charakterisiert. Es konnte eine Fraktion mit 20 % Ausbeute, 36 % Wiederfindung und 40 % Reinheit gewonnen werden. Diese Ergebnisse lagen unter denen von Post & Hinrichs (2011). Sie konnten mit der Maschenfilter(2 L)- bzw. Separatoren (5 L)-Methode 34 % bzw. 21 % Ausbeute, 80 bzw. 50 % Wiederfindung und 41 bzw. 50 % Reinheit erzielen. Anzumerken ist, dass die Methode von Post & Hinrichs (2011) nicht gänzlich mit der in dieser Arbeit durchgeführten Methode verglichen werden kann, da mit 5 L und Faltenfilter gearbeitet wurde. Ausbeute und Wiederfindung nahmen in Post & Hinrichs Arbeit mit Erhöhung des Prozessvolumens von 2 L auf 5 L ab. Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit zwar etwas niedriger, aber hinsichtlich der verschiedenen Verfahrensweisen noch akzeptabel. Für weitere Versuche wäre eine Separation mit höherem RZB-Wert in einem Separator ratsam. Des Weiteren könnte man anschließend den Niederschlag mehreren Waschvorgängen unterwerfen, um die Reinheit zu erhöhen.

4.2.2 β -Casein

Zur Auswertung wurden die Fraktionen aus V8 und V9 herangezogen, da diese der optimierten Verfahrensweise entsprachen. Im Folgenden werden die Fraktionen aus der Membranfiltration und der nachfolgenden CaCl_2 -Fällung betrachtet und verglichen. In Trockenmasse, Protein- und Aschegehalt unterschieden sich die Fraktionen nicht (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der mittels Membranfiltration (MF) bzw. Calciumchlorid-Fällung (CaCl₂) isolierten β -Caseinfraction

Versuch	Fraktion	Trockenmasse [g/kg]	Protein [g/kg]	Asche [g/kg]
V8	β (MF)	962,4	928,3	86,2
	β (CaCl ₂)	965,4	940,0	88,9
V9	β (MF)	965,7	929,8	88,7
	β (CaCl ₂)	958,8	926,6	831

Mit der Isolation mittels Membranfiltration konnte eine Ausbeute von 15 % bzw. 14 %, eine Wiederfindung von 41 % bzw. 39 % und eine Reinheit von 88 % bzw. 84 % (Tabelle 4-6). Die Ausbeute und Wiederfindung sind vergleichbar und teilweise besser als die bisheriger Studien zur β -Caseinisolierung (Atamer, et al., 2016). Van Hekken & Holsinger (2000), die mit ähnlichen Parametern arbeiteten konnten lediglich eine Reinheit von 60 % erzielen. O'Mahony et al. (2007) erreichten eine Reinheit von 90 % aus 380 L Magermilch. Die Membranfiltration mit den in dieser Arbeit angewandten Parametern eignet sich gut zur β -Caseinisolierung. Die Reinheit dieser Fraktion könnte durch nachfolgende Waschschriffe noch erhöht werden.

Die β -Caseinfraction aus der CaCl₂-Fällung kann hinsichtlich Ausbeute und Wiederfindung nicht ausgewertet werden, da ein Großteil der Fraktion vorhergehend mittels Membranfiltration abgetrennt wurde. Somit wird nur die Reinheit zur Auswertung herangezogen. Diese sollte allerdings kritisch betrachtet werden, da nicht klar ist, ob die Werte genauso wären, wenn ein Großteil nicht vorher schon abgetrennt worden wäre. Post & Hinrichs (2011) erzielten eine Reinheit von 81 % (Maschenfilterbeute) bzw. 90 % (Separator). In dieser Arbeit wurde eine Reinheit von ca. 92 % erreicht.

Tabelle 4-6: Vergleich Masse Pulver, Masse Fraktion, Reinheit, Ausbeute und Wiederfindung der β -Caseinfractionen

Ver- such	Fraktion	m _P [g]	m _{Fr} [g]	Reinheit [%]	Ausbeute [%]	Wiederfindung [%]
V8	β (P)	23,40	20,46	87,80	14,64	41,30
	β (R)	0,59	0,55	92,82	0,39	1,10
V9	β (P)	22,86	19,34	83,86	13,84	39,05
	β (R)	0,17	0,16	92,66	0,11	0,32

4.2.3 κ -Casein

Zur Auswertung wurde die Fraktion aus V9 herangezogen, da diese der optimierten Verfahrensweise entsprach. Protein- und Aschegehalt waren geringer sind als in der α - und β -Caseinfraction (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der α -Caseinfraction

Versuch	Fraktion	Trockenmasse [g/kg]	Protein [%]	Asche [%]
V8	κ	968,7	882,0	61,4
V9	κ	966,3	908,2	51,6

Ebenso wie von Post & Hinrichs (2011) konnte auch hier eine Ausbeute von $\sim 5\%$ erzielt werden. Bei V8 konnte eine Wiederfindung von 44% und bei V9 von 52% erreicht werden (Tabelle 4-8). Dies waren vermutlich natürliche Schwankungen der Methode, wie ein Vergleich mit der Arbeit von Post & Hinrichs (2011) vermuten lässt. Die Wiederfindung war mit 44% bzw. 52% höher als in der genannten Arbeit, in der 35% (Maschenfilterbeutel) bzw. 22% (Separator) erzielt werden konnte. Wobei auch hier eine natürliche Schwankung der Methode vorliegen könnte. Post & Hinrichs (2011) gewannen κ -Casenfraktionen mit einer Reinheit von 31% bzw. 22% , während in dieser Arbeit 52% erzielt wurden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode eignet sich gut zur Isolierung von κ -Casein.

Tabelle 4-8: Vergleich Masse Pulver, Masse Fraktion, Reinheit, Ausbeute und Wiederfindung der κ -Caseinfraction

Versuch	Fraktion	m_P [g]	m_{Fr} [g]	Reinheit [%]	Ausbeute [%]	Wiederfindung [%]
V8	κ	12,43	6,52	52,41	4,66	44,06
V9	κ	14,60	7,63	52,26	5,46	51,62

4.2.4 Herstellung der fraktionierten Natriumcaseinatlösung

Das β -fNCL wurde aus dem β -Casein hergestellt, das mittels der Membranfiltration gewonnen wurde. Auffällig an den NCL (27 g/kg) ist das Aussehen. So sind α - und κ -NCL weißlich und trüb, während β -NCL farblos und klar ist (Abbildung 4-10). Beim Anfertigen der α -fNCL traten Probleme auf (Kapitel 4.2.1). Des Weiteren löste sich die α -Caseinfraction in den ersten Versuchen nicht vollständig auf, sodass das inhomogene Pulver durch Sieben von groben Partikeln getrennt werden musste. Die anderen Fraktionen konnten trotz größerer Partikel gut gelöst werden.



Abbildung 4-10: Natriumcaseinatlösungen [27 g/kg] aus Versuch 9

4.3 Gelbildungsuntersuchungen

4.3.1 Vergleich der Säuerungskurven

Die Steifigkeit der Gele während der säureinduzierten Gelbildung wird beeinflusst von der Säuerungsgeschwindigkeit (Horne, 2003; Jaros et al., 2010). Daher war es wichtig einen vergleichbaren pH-Verlauf aller Proben durch Variation der GDL-Konzentrationen zur Säuerung zu gewährleisten.

Innerhalb der einzelnen Substrate (NCL, Magermilch, angereicherte Magermilch) waren die Säuerungskurven aller Inkubationszeiten ähnlich. Deswegen wurde für den Vergleich der Substrate untereinander nur die Säuerungskurve einer Inkubationszeit herangezogen. Für kNCL sowie damit angereicherter Magermilch wurde die 3 h inkubierte kNCL herangezogen und für Magermilch die unbehandelte Probe. Ein vergleichbarer Säuerungsverlauf konnte mit 20 g/kg für die kNCL und 40 g/kg GDL für die Magermilch sowie für die angereicherte Magermilch erreicht werden (Abbildung 4-11). Eine Säuerung der NCL mit 15 g/kg GDL könnte der Säuerungskurve der Magermilch noch näher kommen. In Abbildung 4-12 sind die Säuerungskurven der fNCL (15 g/kg GDL) und der mit fNCL angereicherten Magermilch (40 g/kg GDL) sowie der unbehandelten Magermilch (40 g/kg GDL) dargestellt.

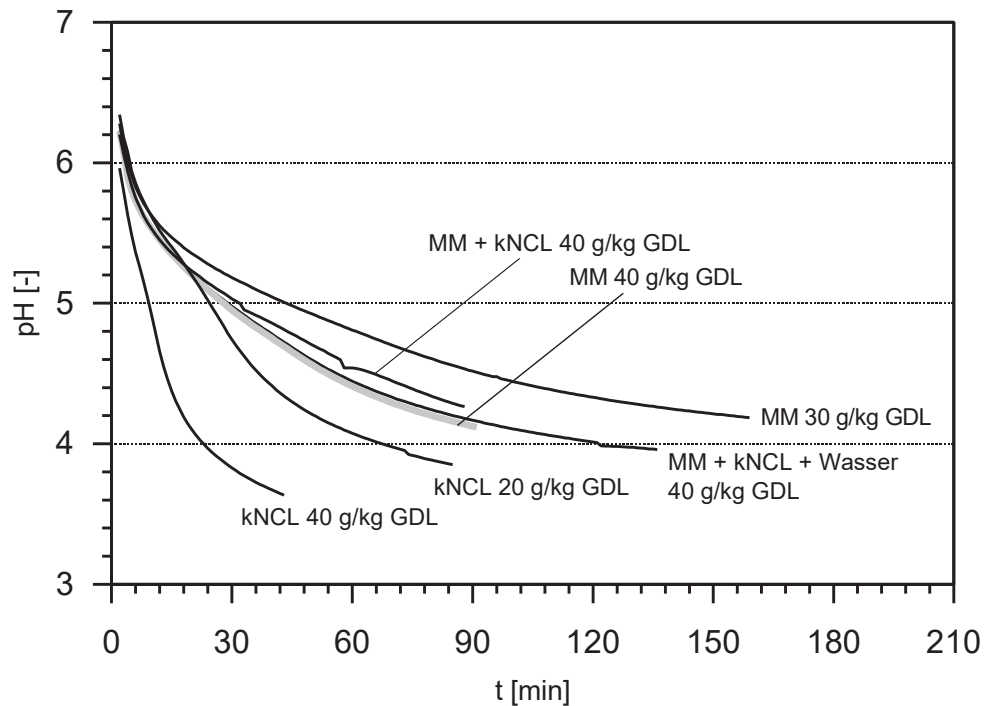


Abbildung 4-11: Darstellung des pH-Verlaufs unterschiedlich säureinduzierter Gele (20, 30 und 40 g/kg Glucono- δ -Lacton (GDL), 30 °C). Dargestellt sind unbehandelte Magermilch (MM), enzymbehandelte kommerzielle Natriumcaseinatlösung (kNCL), mit enzymbehandelter kNCL angereicherte Magermilch (Milch + kNCL) und mit enzymbehandelter kNCL und Wasser angereicherte MM (MM + kNCL + Wasser). Die kNCL wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C, 3 h) inkubiert.

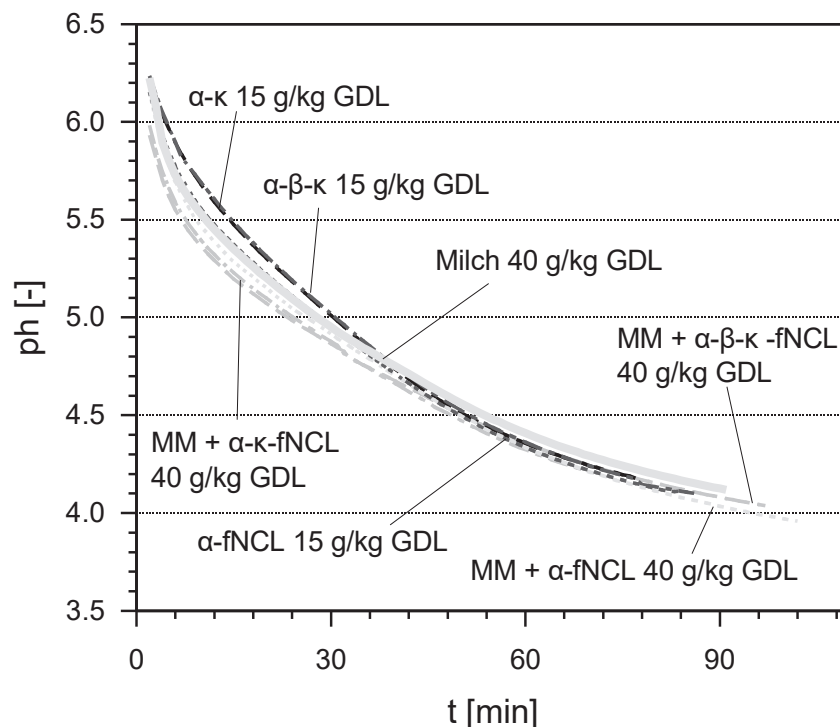


Abbildung 4-12: Darstellung des pH-Verlaufs unterschiedlich säureinduzierter Gele (15 und 40 g/kg Glucono- δ -Lacton (GDL), 30 °C). Dargestellt sind unbehandelte Magermilch (MM), enzymbehandelte fraktionierte Natriumcaseinatlösungen (fNCL, 15 g/kg GDL) und mit enzymbehandelter fNCL angereicherte MM (40 g/kg GDL). Die fNCL sind α -fNCL, α - κ -fNCL und α - β - κ -fNCL. Die fNCL wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C, 3 h) inkubiert.

4.3.2 Einfluss der Hitzebehandlung von Milch auf deren Gelbildungseigenschaften

Es wurde untersucht, ob eine Hitzebehandlung von Magermilch Einfluss auf deren Gelbildungseigenschaften hat. In dieser Untersuchung wurde ohne mTGase gearbeitet. Magermilch (100 g/kg) wurde 10 min bei 90 °C erhitzt. Als Referenz diente eine nicht hitzebehandelte Magermilch (100 g/kg).

Es wurde ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Proben detektiert ($p < 0,05$). Die hitzebehandelte Probe wies eine höhere Gelsteifigkeit auf (Abbildung 4-13). Durch die Hitzebehandlung wurden Molkenproteine denaturiert und Caseinmonomere freigesetzt, was zu veränderten Wechselwirkungen während der Säuerung und Gelbildung führt (Bulca & Kulozik, 2004; Lucey et al. 1999). Lucey et al. (1999) beobachteten in den Gelen aus erhitzter Magermilch eine homogenere Mikrostruktur mit dünner aggregierten Proteinketten als in Gelen aus nicht erhitzter Magermilch.

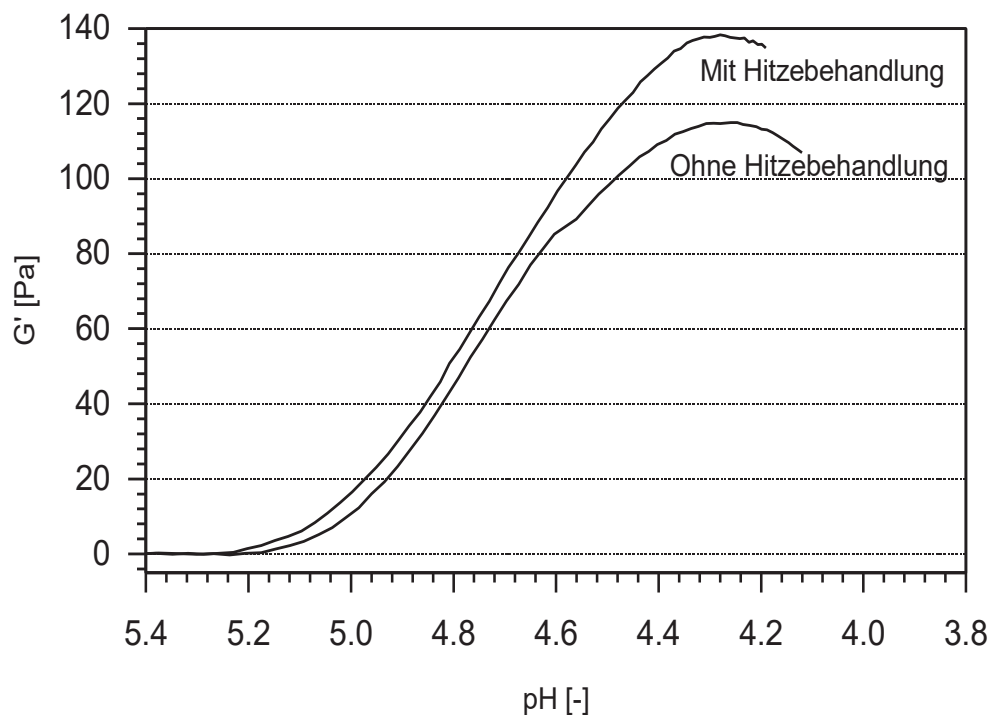


Abbildung 4-13: Einfluss der Hitzebehandlung auf die Gelsteifigkeit (G') säurinduzierter Milchgele (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Rekonstituierte Magermilch (100 g/kg) wurde für 10 min bei 90 °C erhitzt.

4.3.3 Enzymatische Quervernetzung kommerziellen Natriumcaseinat-lösung und damit angereicherter Milch

4.3.3.1 Enzymatische Quervernetzung kommerzieller Natriumcaseinatlösung

Die Inkubationsdauer der NCL mit mTGase hat erheblichen Einfluss auf die Quervernetzung. Wie vorherige Studien gezeigt haben, ist nach einer bestimmten Inkubationszeit die maximale Gelsteifigkeit erreicht. So fanden Jaros et al. (2010) in 1h, 3h und 7 h inkubierter SCL das Maximum nach 3 h. Ziel war es die Inkubationszeit für die maximale Gelsteifigkeit von NCL zu bestimmen.

Die Gelbildungskurven der verschieden lang inkubierten kNCL sind in Abbildung 4-14 (20 g/kg GDL) und Abbildung 4-15 (40 g/kg GDL) als Funktion des pH dargestellt. Die geladenen Gruppen der Caseine werden durch die Säuerung mit GDL neutralisiert und somit abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen reduziert. Dadurch können sich die Caseine anlagern und es kommt zur Gelbildung über nicht-kovalente Bindungen. Liegt mTGase vor, so wird das Gel durch kovalente Bindungen zusätzlich stabilisiert (Menéndez et al., 2004). Mit Erhöhung der Inkubationszeit nahm die Gelsteifigkeit der mit 20 g/kg gesäuerten kNCL zu, wobei ab 3 h Inkubationszeit die Steifigkeit stagnierte ($p > 0,05$). Bei 40 g/kg GDL wurden steifere Gele mit Erhöhung der Inkubationszeit gebildet, wobei die ersten 3 h Inkubationszeit den größten Einfluss auf die Gelsteifigkeit hatten. Danach stieg die Steifigkeit von 3 h zu 24 h nur noch in geringem Maße an ($p < 0,05$).

Die maximale Gelsteifigkeit wurde mit 15 – 20 min für die mit 40 g/kg GDL gesäuerte kNCL schneller erreicht als für die mit 20 g/kg GDL gesäuerte kNCL (40 – 60 min). Es wird vermutet, dass sich durch die schnelle Säuerung weniger nicht-kovalente Bindungen zwischen den Caseinen ausgebildet haben. Enzymbehandelte kNCL zeigten in beiden Fällen höhere Gelsteifigkeiten als unbehandelte kNCL. Das liegt daran, dass durch die Enzymbehandlung Caseine zu Di- und Trimeren verknüpft werden, wodurch sie ein stabilisierendes Gerüst formen. An dieses können sich Monomere lagern und ein homogenes Gel kann gebildet werden (Jaros et al., 2010).

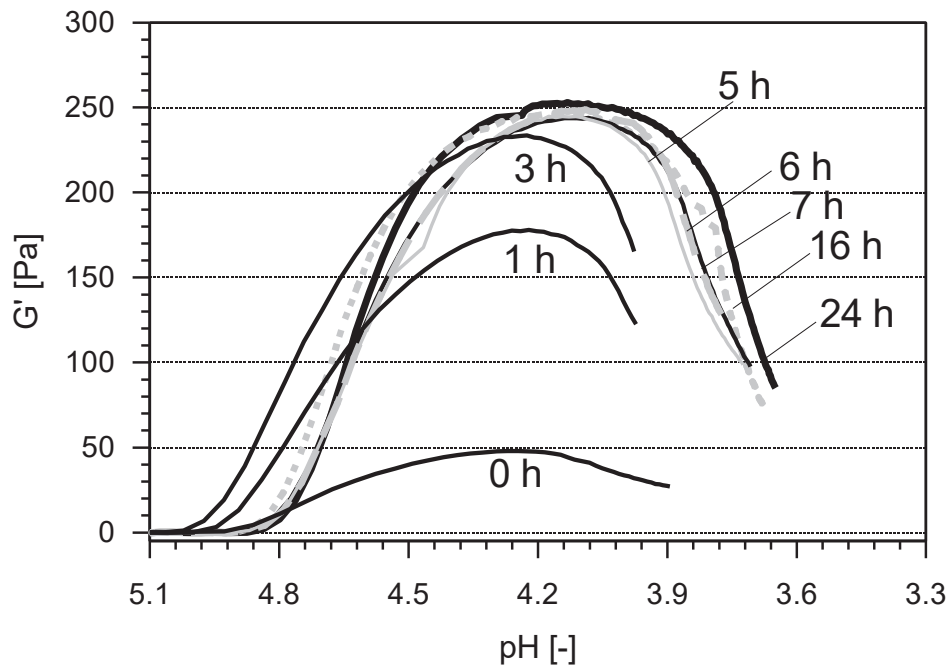


Abbildung 4-14: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (20 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg).

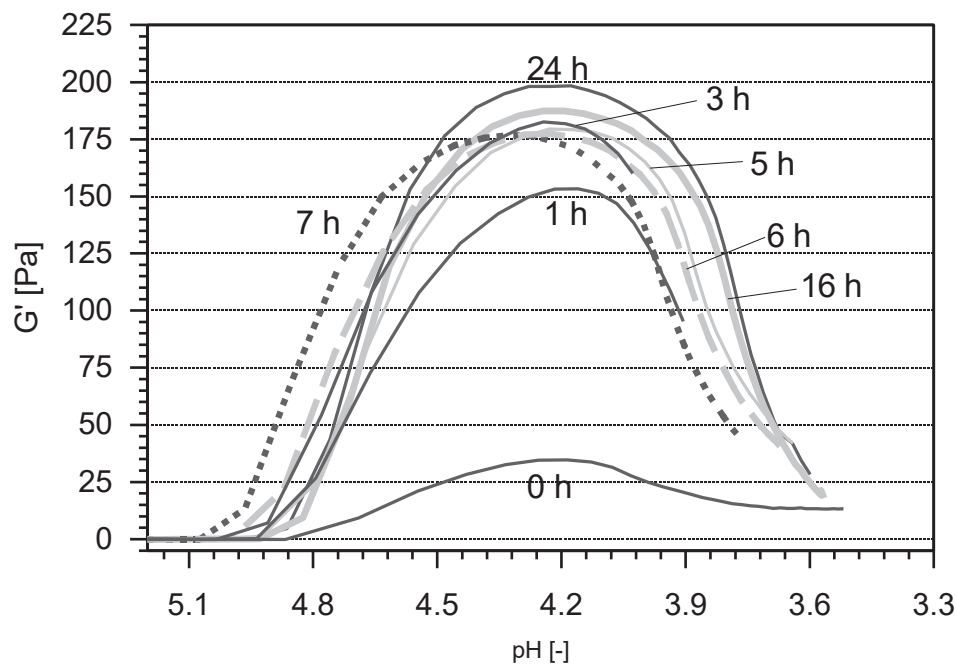


Abbildung 4-15: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg).

Von den unterschiedlich lang inkubierten kNCL wurde mittels GPC der Polymerisierungsgrad bestimmt. Die Polymerisierung nahm bis zu 3 h Inkubationszeit stark zu, mit weiterer Inkubation aber nur noch geringfügig (Abbildung 4-16). Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Polymergehalt von 95 % ermittelt. Da die Messungen nur in Einzelbestimmung durchgeführt wurden, kann keine Aussage über signifikante Unterschiede zwischen den 3 h – 24 h inkubierten

kNCL getroffen werden. Der Verlauf des maximalen Speichermoduls und des Polymerisierungsgrades der kNCL waren qualitativ ähnlich. Somit hat der Polymerisierungsgrad Einfluss auf die Gelsteifigkeit. Jaros et al. (2014) ermittelten den Isopeptidgehalt als weiteren Faktor für die Gelsteifigkeit. Isopeptide sind Proteine, die durch die mTGase-katalysierte kovalente Bindung zwischen Glutamin- und Lysinresten gebildet werden (Jaros et al., 2006b).

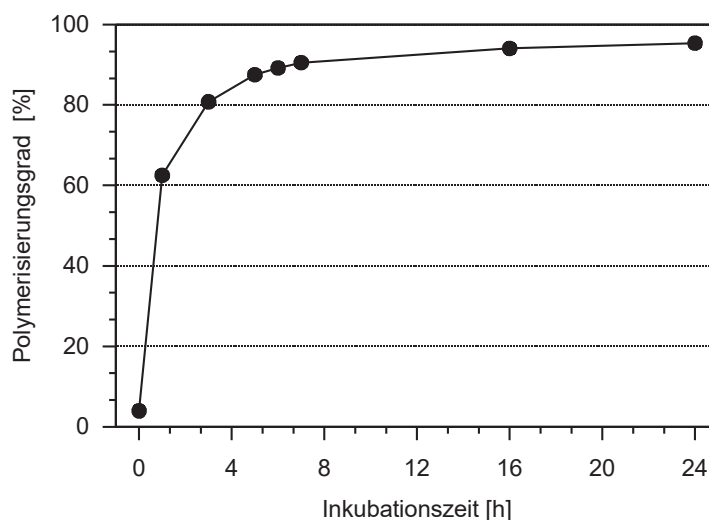


Abbildung 4-16: Polymerisierungsgrad enzymbehandelter Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.

4.3.3.2 Wirkung enzymatisch quervernetzter kommerzieller Natriumcaseinatlösung in Magermilch

Die säureinduzierte Gelbildung von Milch wird zur Herstellung von Joghurtherzeugnissen genutzt. Häufig werden deklarationspflichtige Verdickungsmittel und Stabilisatoren zugesetzt, um eine höhere Gelsteifigkeit zu erreichen. Als Alternative dazu werden Möglichkeiten erforscht, die Gelsteifigkeit ohne deklarationspflichtige Zusätze zu erhöhen. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von mTGase zur Erhöhung der Quervernetzung. Dazu wurde Magermilch mit unterschiedlich lang enzymbehandelter kNCL sowie unbehandelter kNCL angereichert.

Die Gelsteifigkeit nahm bis zu 3 h Inkubation mit mTGase zu. Anders als bei den Caseingelen (kNCL) sank die Steifigkeit mit weiterer Inkubation (Abbildung 4-17). Säureinduzierte Magermilchgele werden über nicht-kovalente Bindungen stabilisiert. Die Anreicherung mit bis zu 3 h mTGase-behandelter kNCL stabilisiert das Magermilchgel zusätzlich durch die kovalenten Bindungen (Myllärinen et al., 2007; Tang et al., 2005). Länger inkubierte kNCL verfügen über mehr kovalente

Bindungen, sodass die nicht-kovalenten Bindungen reduziert werden. Dadurch können sie in ihrer Mobilität eingeschränkt werden und sich nicht mehr frei im Raum bewegen (Mounsey et al., 2005; Partanen et al., 2008).

Die mit den 5 h, 6 h und 7 h inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgele zeigten gleiche Gelsteifigkeiten ($p > 0,05$). Bei den 16 h und 24 h inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgele war eine niedrigere Gelsteifigkeit als bei den kürzer inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgele zu erkennen. Ähnlich steife Gele wurden mit Magermilch erzeugt, die mit unbehandelter, 16 h und 24 h enzymbehandelter kNCL angereichert wurde ($p > 0,05$), während die 0 h inkubierte kNCL eine wesentlich geringere Gelsteifigkeit auswies als die länger inkubierten kNCL ($p < 0,05$). Vermutlich wurden bei den mit 16 h und 24 h inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgele die nicht-kovalenten Bindungen durch die vermehrten kovalenten Bindungen so stark eingeschränkt, sodass die Gelsteifigkeit herabgesetzt wurde.

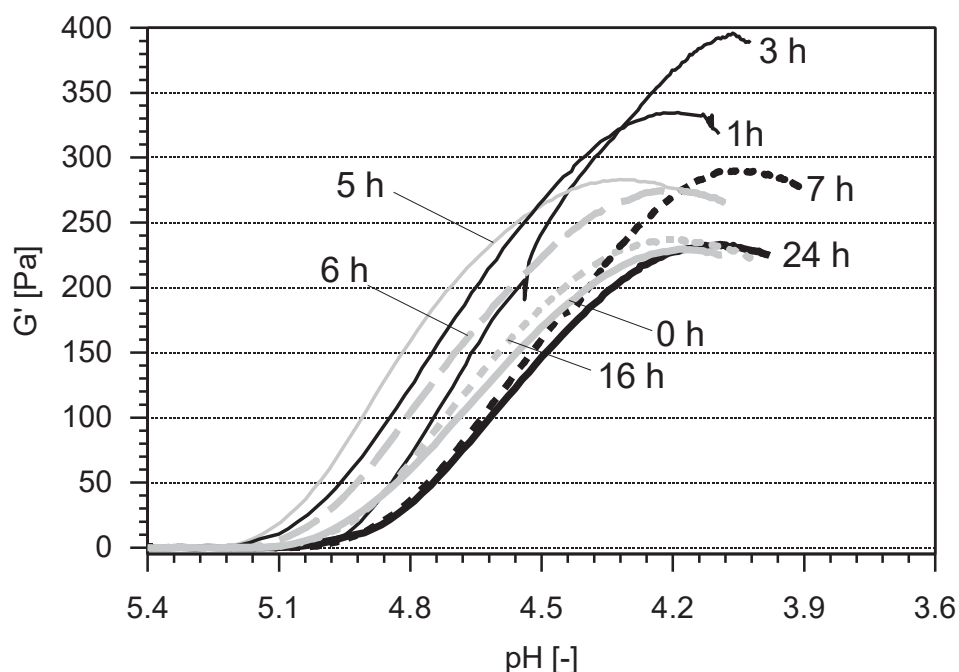


Abbildung 4-17: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von angereicherter Magermilch. Die Magermilch wurde mit unterschiedlich lang enzymbehandelten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen wurden für mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.

Das Erhöhen der Trockenmasse trug zur Bildung steiferer Gele bei. So zeigte die nicht angereicherte Magermilch (Trockenmasse = 96 g/kg) eine Gelsteifigkeit von ca. 140 Pa und die mit unbehandelter kNCL angereicherte Magermilch (Trockenmasse = 105,6 g/kg) eine Gelsteifigkeit von 230 Pa (Abbildung 4-17).

Um die Trockenmasse gering zu halten, sollte in weiteren Versuchen herausgefunden werden, in welchem Verhältnis Magermilch mit Wasser und 3 h inkubierter kNCL angesetzt werden muss, um eine ähnliche Gelsteifigkeit wie die von mit 0 h inkubierter kNCL angereicherter Magermilch zu erhalten. Dafür wurde ein 2:0,5:0,5-Mischung aus Magermilch, Wasser und 3 h enzymbehandelter kNCL (Trockenmasse = 100,8 g/kg) hergestellt. In Abbildung 4-18 sind unterschiedlich angereicherte Magermilch sowie nicht angereicherte Magermilch gegenübergestellt. Das mit 3 h inkubierter kNCL angereicherte Magermilchgel zeigte eine vergleichbare Gelsteifigkeit ($p > 0,05$) wie das Gel der mit unbehandelter kNCL angereicherter Magermilch.

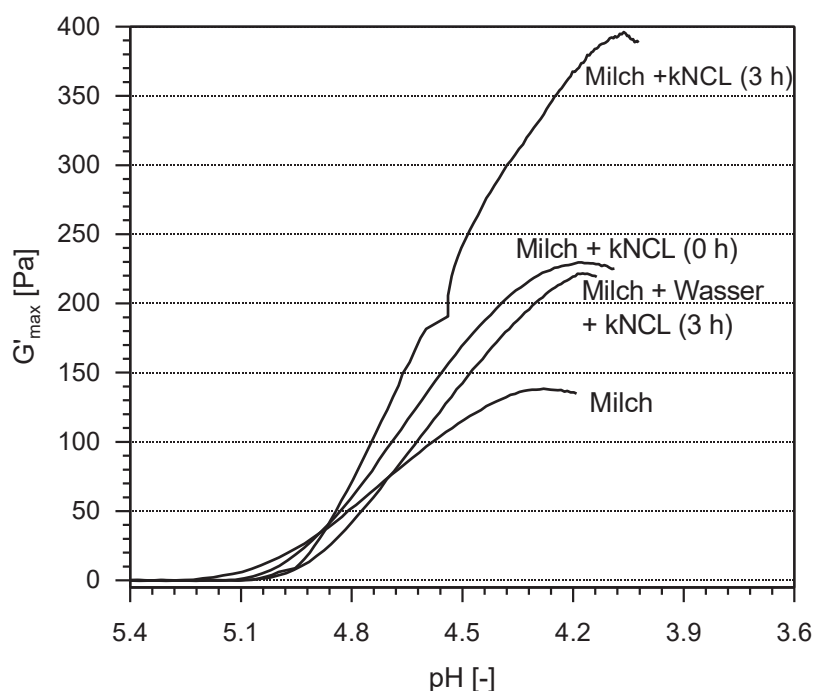


Abbildung 4-18: Vergleich säureinduzierter (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) Gele unbehandelter Magermilch und mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Protein, 40 °C, 0 h und 3 h) behandelter angereicherter Magermilch. Magermilch wurde jeweils mit kommerzieller Natriumcaseinatlösung (kNCL, 27 g/kg) sowie mit kNCL und Wasser angereichert.

4.3.3.3 Vergleich von dynamisch oszillierenden Messungen und Thromboelastometrie

Es wurde untersucht, ob säureinduzierte Casein- und Magermilchgele durch TEM charakterisiert werden können. Um dies zu untersuchen, wurde die Gelbildung von verschieden enzymbehandelten kNCL sowie damit angereicherter Magermilch mittels dynamischer Oszillation sowie TEM analysiert. Die als Indikator für die Gelsteifigkeit bestimmten maximalen Speichermodule (G'_{\max}) bzw. maximalen Amplituden (MA) wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

Abbildung 4-19 zeigt den Vergleich der durch dynamische Oszillation sowie durch TEM detektierten maximalen Gelsteifigkeiten der unterschiedlich lang inkubierten kNCL, welche mit 20 g/kg sowie 40 g/kg GDL gesäuert wurden. Die Messungen mit dem Thromboelastometer zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die oszillierenden Messungen.

Bei den dynamisch oszillierenden Messungen wurden bei 20 g/kg GDL gesäuerter kNCL keine signifikanten Änderungen der maximalen Gelsteifigkeit detektiert, bei 40 g/kg GDL gesäuerten kNCL dagegegen schon. Mittels TEM wurden für 3 h – 24 h enzymbehandelte kNCL keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) bei Säuerung mit 20 g/kg und 40 g/kg GDL festgestellt. Aufgrund der geringen Probenmenge ist es möglich, dass die Änderungen in der Gelsteifigkeit so gering sind (wie bei der mit 40 g/kg GDL gesäuerten kNCL), dass sie als zufällige Messabweichung berechnet werden.

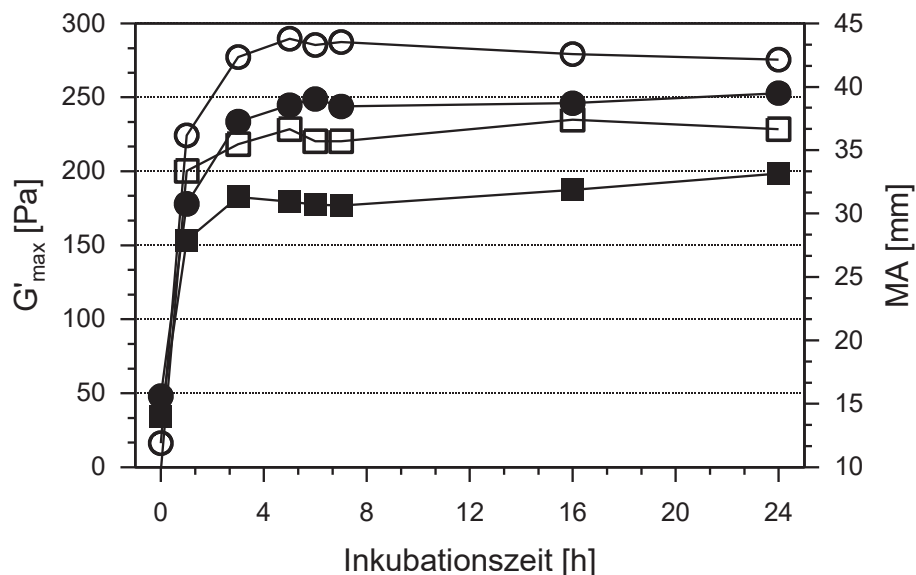


Abbildung 4-19: Vergleich der durch dynamische Oszillation (maximaler Speichermodul; G'_{max} ; geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA; offene Symbole) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten Caseingelen. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die Natriumcaseinatlösungen wurden mit 20 g/kg GDL (Kreise) bzw. 40 g/kg GDL (Vierecke) gesäuert.

Abbildung 4-20 zeigt den Vergleich der durch dynamische Oszillation sowie durch TEM detektierten maximalen Gelsteifigkeiten der mit unterschiedlich lang inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgele, die mit 40 g/kg GDL gesäuert wurden. Der Verlauf der mittels TEM ermittelten Gelsteifigkeiten war qualitativ vergleichbar mit den durch dynamische Oszillation ermittelten Gelsteifigkeiten.

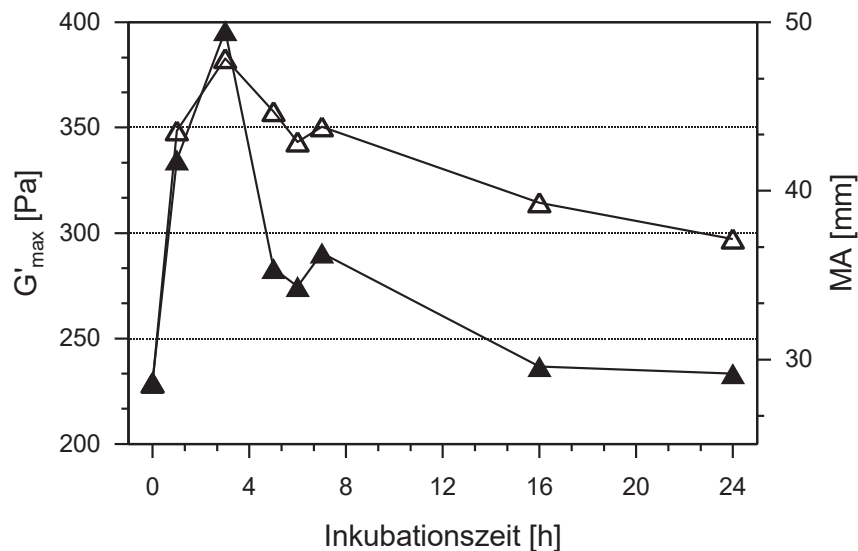


Abbildung 4-20: Vergleich der durch dynamische Oszillation (maximaler Speichermodul; G'_{\max} ; geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA; offene Symbole) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) angereicherten Magermilchgelen. Die Magermilch wurde 2:1 mit unterschiedlich lang enzymbehandelten kommerziellen Natriumcaseatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten Natriumcaseatlösungen wurden für mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.

4.3.3.4 Beginn der Gelbildung

Der Beginn der Gelbildung wurde bei der TEM dem Messprotokoll entnommen. Bei der dynamischen Oszillation wurde das Überschreiten von $G' = 1$ Pa als Gelbildungsbeginn definiert (Lucey et al., 1997).

Die Erfassung des Beginns der Gelbildung war mit beiden Messmethoden (dynamische Oszillation und TEM) qualitativ ähnlich (Abbildung 4-21). Bei der mit 20 g/kg GDL gesäuerten kNCL war bei der Messung mittels TEM ein verzögerter ($p < 0,05$) Beginn der Gelbildung zwischen unbehandelter und enzymbehandelten kNCL zu verzeichnen, wobei das Ausmaß der Inkubation keine weitere Verzögerung bedingte ($p > 0,05$). Die dynamische Oszillation zeigte bei 40 g/kg GDL mit erhöhter Inkubationszeit eine später beginnende Gelbildung ($p < 0,05$), wobei 5 h, 6 h und 7 h gleich ($p > 0,05$) waren. Die mit 40 g/kg gesäuerte kNCL zeigte bei der TEM ebenfalls eine spätere Gelbildung zwischen unbehandelter und enzymbehandelten kNCL ($p < 0,05$), wobei die Dauer der Inkubation unerheblich war ($p > 0,05$). Bei der dynamischen Oszillation nahm die Gelbildungsstartzeit mit Erhöhung der Inkubationszeit zu ($p < 0,05$), wobei 1 h – 7 h ($p > 0,05$) gleich waren. Die Erhöhung der GDL-Konzentration um das Doppelte führte zu einer mehr als doppelt so hohen Gelbildungsstartzeit.

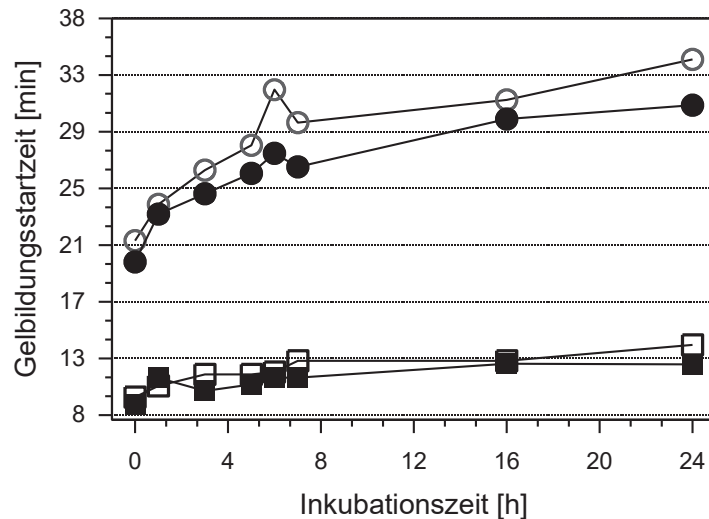


Abbildung 4-21: Vergleich der durch dynamische Oszillation (geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (offene Symbole) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten Caseingelen. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die Natriumcaseinatlösungen wurden mit 20 g/kg GDL (Kreise) bzw. 40 g/kg GDL (Vierecke) gesäuert.

Abbildung 4-22 zeigt die mittels dynamischer Oszillation und TEM ermittelten Gelbildungsstartzeiten der angereicherten Magermilch (2:1 Milch:KNCL) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Mittels dynamischer Oszillation und TEM konnten qualitativ ähnliche Zeiten erfasst werden. Allerdings waren die Messungen mittels TEM größeren Schwankungen unterlegen, sodass keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Inkubationszeiten ermittelt wurden. Die Messungen mittels dynamischer Oszillation zeigten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Inkubationszeiten. Bei der 3 h inkubierten KNCL trat die Gelbildung am spätesten ein.

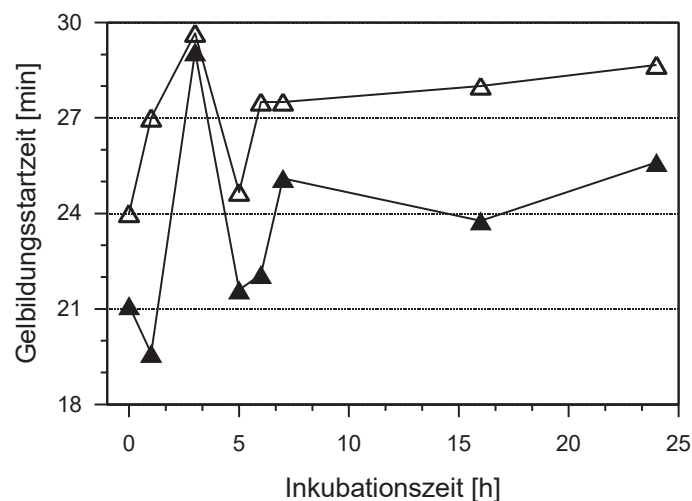


Abbildung 4-22: Vergleich der durch dynamische Oszillation (geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (offene Symbole) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten angereicherten Magermilchgelen. Die Magermilch wurde 2:1 mit unterschiedlich lang enzymbehandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten Natriumcaseinatlösungen wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.

4.3.4 Enzymatische Quervernetzung fraktionierter Natriumcaseinat-lösung und damit angereicherter Milch

4.3.4.1 Enzymatische Quervernetzung fraktionierter Natriumcaseinatlösung

Aus den mittels Membranfiltration und CaCl_2 -Fällung gewonnen Caseinfraktionen wurden fNCL hergestellt. Diese waren α - β - κ -fNCL, α - κ -fNCL und α -fNCL. Es sollten die maximalen Gelsteifigkeiten ermittelt werden. Um zu untersuchen wie stark die Gelbildung ist, wurden die fNCL mit der kNCL verglichen. Da nur Einfachbestimmungen für die dynamisch oszillierenden Messungen durchgeführt wurden, wurden parallel in Doppelbestimmung Messungen mit dem Thromboelastometer durchgeführt. Die Ergebnisse der TEM waren vergleichbar mit denen der dynamischen Oszillation (Vgl. Kapitel 4.2.3.3).

In Abbildung 4-23 sind die mittels dynamischer Oszillation ermittelten Gelbildungskurven der fNCL sowie der kNCL dargestellt. Unbehandelte fNCL verhielten sich ähnlich wie unbehandelte kNCL. Durch Enzymbehandlung bildete die kNCL ein wesentlich steiferes Gel als die fNCL.

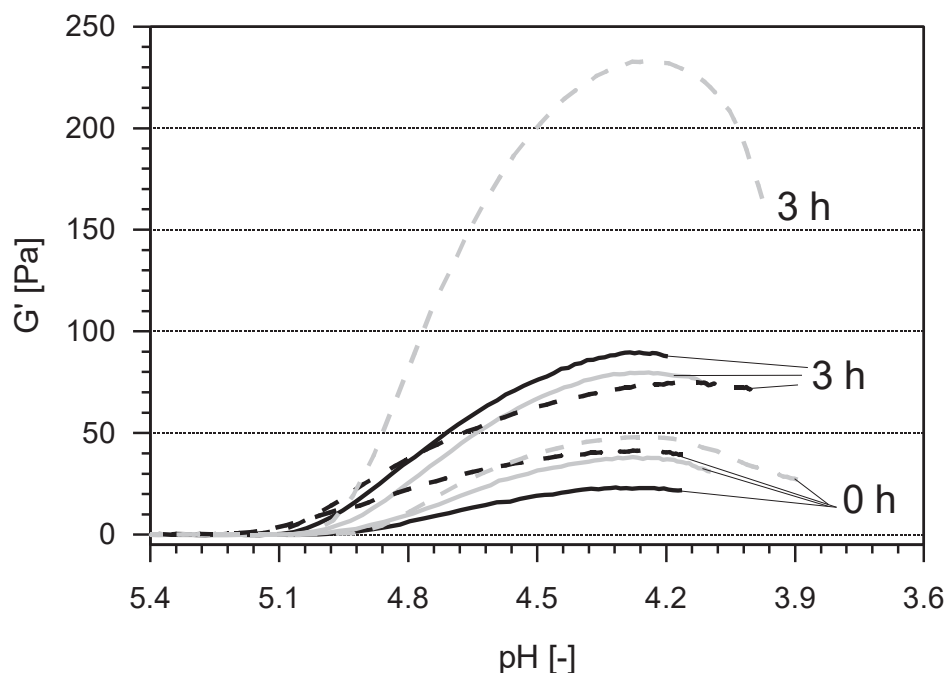


Abbildung 4-23: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg). Die verwendeten fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL) sind α - β - κ -fNCL (schwarze durchgezogene Linien), α - κ -fNCL (graue durchgezogene Linien) und α -fNCL (schwarze gestrichelte Linien) und wurden mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Als Referenz diente eine kommerzielle Natriumcaseinatlösung (graue gestrichelte Linien), die mit 20 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert wurde.

Da die TEM in Doppelbestimmung und die dynamische Oszillation nur in Einfachbestimmung ausgeführt wurde, wird die TEM zur statistischen Auswertung herangezogen. Die unbehandelten fNCL zeigten untereinander signifikante Unterschiede in der Gelsteifigkeit ($p > 0,05$), die enzymbehandelten fNCL nicht ($p < 0,05$) (Abbildung 4-24). Die α - und α - κ -fNCL zeigten untereinander sowohl unbehandelt als auch enzymbehandelt keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$), was vermutlich an dem geringen Anteil an κ -Casein in der α - κ -fNCL liegt. Durch 3-stündige Enzymbehandlung der fNCL konnten steifere Gele generiert werden. Dabei zeigte die α - κ -fNCL mit einem Anstieg der MA von 11,4 mm auf 17,6 mm den niedrigsten Anstieg von den drei fNCL, während α - β - κ -fNCL mit einem Anstieg der MA von 6,2 mm auf 17,6 mm den höchsten Anstieg der Gelsteifigkeit zeigte. Die α -fNCL zeigte einen Anstieg der MA von 10,95 mm 19,25 mm nach der Enzymbehandlung. Das lässt vermuten, dass die Anwesenheit von β -Casein die Verknüpfung positiv beeinflusst, also zugänglicher für die mTGase wird. Dies wäre ein Beweis dafür, dass die α -Caseinfraction die Verknüpfung negativ beeinflusst. Um dies zu belegen, sollten Gelbildungsuntersuchungen von β - sowie κ -fNCL durchgeführt werden. Die fNCL konnten durch mTGase nicht so stark vernetzt werden wie die Referenzprobe kNCL, was an dem wesentlich höheren Anstieg der MA von 11,9 mm auf 4,35 mm der kNCL nach der Enzymbehandlung zu erkennen ist. Dass die Gelsteifigkeiten aller fNCL so niedrig waren, lag vermutlich an der α -Caseinfraction. Diese besaß eine geringe Reinheit und einen Aschegehalt von 114 g/kg. Es wird eine Substanz vermutet, welche die Verknüpfung durch Transglutaminase einschränkt. Es wäre auch möglich, dass α -Casein weniger durch mTGase verknüpft wird als die Caseinmicelle und β -Casein. Ebenso kann es sein, dass α -Casein bei 3 h Inkubationszeit weniger verknüpft wird als die anderen Proben. Da die α - β - κ -Caseinfraction eine deutlich geringe Gelsteifigkeit zeigte als die kNCL, ist die Theorie der verunreinigten α -Caseinfraction am wahrscheinlichsten.

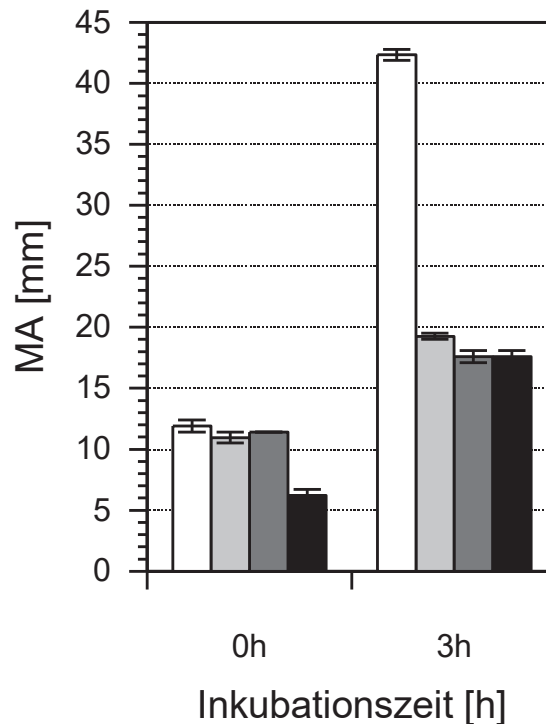


Abbildung 4-24: Vergleich der durch Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten kommerziellen (weiß) und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL, κNCL). Die κNCL wurden mit 20 g/kg Glucono-δ-Lacton und die fNCL mit 15 g/kg Glucono-δ-Lacton bei 30 °C gesäuert. Die fNCL sind α-fNCL (hellgrau), α-κ-fNCL (dunkelgrau) und α-β-κ-fNCL (schwarz). Die verwendeten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Anzahl der Messungen je Probe: n = 2.

4.3.4.2 Wirkung enzymatisch quervernetzter fraktionierter Natriumcaseinatlösung in Magermilch

Um den Einfluss der enzymatischen Quervernetzung von fNCL in damit angereicherter Magermilch zu untersuchen, wurde Magermilch mit enzymbehandelter und unbehandelter fNCL gemischt. Als Referenz dienten mit enzymbehandelter und unbehandelter κNCL angereicherte Magermilch.

Der durch dynamische Oszillation (Abbildung 4-25) ermittelte Anstieg der maximalen Gelsteifigkeiten unbehandelter und enzymbehandelter mit fNCL angereicherter Magermilch stimmt nicht mit den Ergebnissen der TEM (Abbildung 4-26) überein.

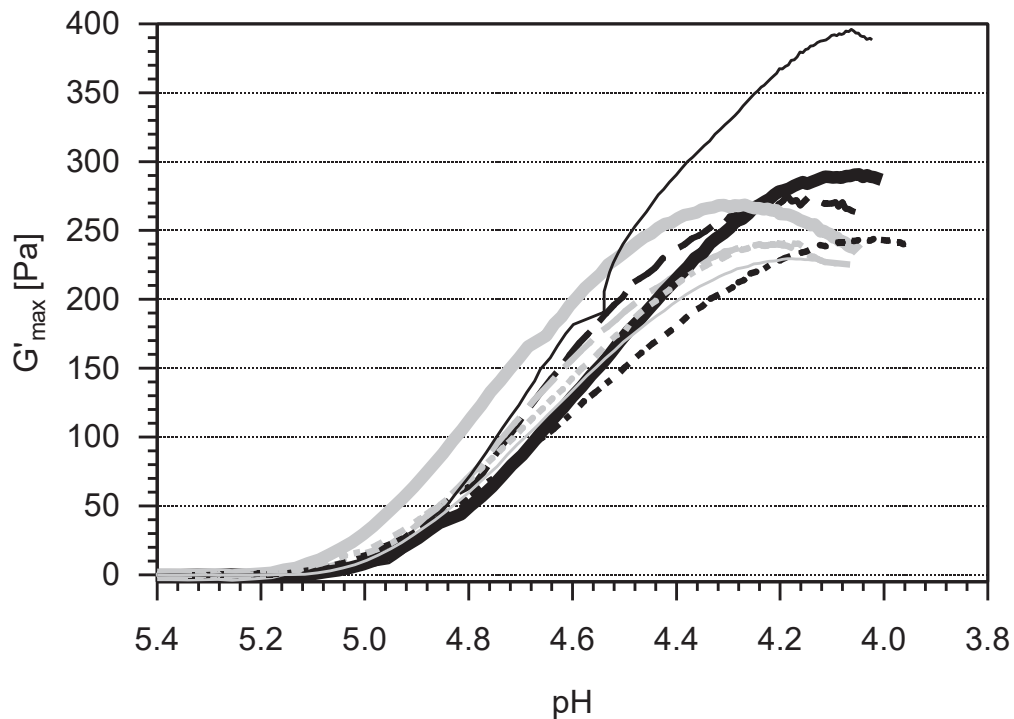


Abbildung 4-25: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von angereicherter Magermilch. Die Magermilch wurde 2:1 mit enzymbehandelten (schwarze Linien) und unbehandelten (graue Linien) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (kNCL, fNCL) wurden für 3 Stunden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Eingesetzt wurden kNCL (durchgezogene dünne Linien), α -fNCL (gepunktete Linien), α -k-fNCL (durchgezogene dicke Linien) und α - β -k-fNCL (lang gestrichelte Linien).

Da die TEM in Doppelbestimmung und die dynamische Oszillation nur in Einfachbestimmung ausgeführt wurde, wird die TEM zur Auswertung herangezogen.

Magermilch, die mit unbehandelter α -k- oder α - β -k-fNCL angereichert wurde, bildete steifere Gele ($p < 0,05$) als mit unbehandelter α -fNCL angereicherte Magermilch. Die Gelsteifigkeit der mit unbehandelter α -k- oder α - β -k-fNCL angereicherter Magermilch unterschied sich nicht ($p > 0,05$). Die mit der 3 h inkubierten α -k-fNCL und α - β -k-fNCL angereicherten Magermilchgele zeigten die gleiche ($p > 0,05$) maximale Gelsteifigkeit, die höher ($p < 0,05$) war als die des mit 3 h inkubierten α -fNCL angereicherten Magermilchgels.

Die Enzymbehandlung hat bei dem α -fNCL angereicherten Magermilchgel eine Erhöhung ($p < 0,05$) der Gelsteifigkeit bewirkt, wobei diese trotzdem niedriger ($p < 0,05$) war als die der α -k- und α - β -k-fNCL angereicherter Magermilch. Die Enzymbehandlung der α -k- und α - β -k-fNCL führte bei den Caseingelen zu höheren ($p < 0,05$) Gelsteifigkeiten, bei den Magermilchgele konnten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) festgestellt werden. Bei den Casein- und Magermilchgele aus α -fNCL konnten durch Enzymbehandlung steifere Gele ermittelt werden.

Möglicherweise wurden bei der α - κ -fNCL und α - β - κ -fNCL Magermilchgelen mehr kovalente Bindungen gebildet, sodass die nicht-kovalenten Bindungen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wurden und deswegen die Gelbildung nicht verstärkt werden konnte. Die Gelsteifigkeit des mit 3 h inkubierten kNCL angereicherten Magermilchgels konnte mit den fNCL angereicherten Magermilchgelen nicht erreicht werden. Interessanterweise wiesen die fNCL-angereicherten Magermilchgele höhere Gelsteifigkeiten als das kNCL-angereicherte Magermilchgel (Trockenmasse = 105,6 g/kg). Da die Trockenmassen der fNCL-angereicherten Magermilch im Bereich von 105,5 g/kg – 105,9 g/kg lagen, kann es nicht an der Trockenmasse liegen. Vermutlich ist die Bildung nicht-kovalenter Bindungen durch die fNCL in der Magermilch stärker.

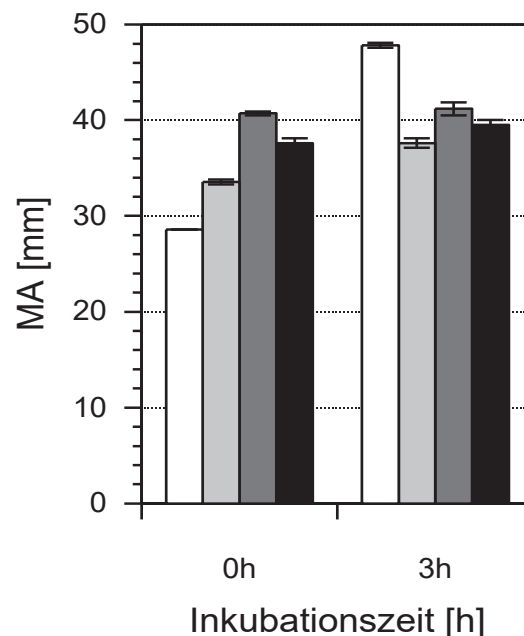


Abbildung 4-26: Vergleich der durch Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten angereicherten Magermilchgelen.

Die Magermilch wurde 2:1 mit enzymbehandelten (3 h) und unbehandelten (0 h) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (kNCL, fNCL) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die kNCL wurden mit 20 g/kg Glucono- δ -Lacton und die fNCL mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Eingesetzt wurden kNCL (weiß), α -fNCL (hellgrau), α - κ -fNCL (dunkelgrau) und α - β - κ -fNCL (schwarz). Anzahl der Messungen je Probe: n = 2.

4.3.4.3 Beginn der Gelbildung

Die statistische Auswertung wurde nur von den mittels TEM detektierten Werten durchgeführt. Die Gelbildung setzte bei den unbehandelten fNCL zu ähnlichen Zeiten ($p > 0,05$) und bei den unbehandelten zu unterschiedlichen ($p < 0,05$) Zeiten ein (Abbildung 4-27). Die Gelbildung startete bei der enzymbehandelten α -fNCL früher ($p < 0,05$) und bei der α - κ -fNCL später ($p < 0,05$) als bei der unbehandelten

Probe. Die Gelbildungsstartzeit der α - β - κ -fNCL war unbehandelt als auch enzymbehandelt gleich ($p > 0,05$). Bei 3 h waren die Gelbildungsstartzeiten von kNCL, α -fNCL und α - β - κ -fNCL gleich ($p > 0,05$), während bei der α - κ -fNCL die Gelbildung später ($p < 0,05$) einsetzte.

Die Gelbildung der mit unbehandelten NCL-angereicherten Magermilchgele setzte zur etwa gleichen Zeit ein ($p > 0,05$) (Abbildung 4-27). Bei den enzymbehandelten fNCL angereicherten Magermilchgelen waren die Gelbildungszeiten auch etwa gleich ($p > 0,05$), unterschieden ($p < 0,05$) sich aber von dem enzymbehandelten kNCL angereicherten Magermilchgel. Die Enzymbehandlung hat bei dem mit kNCL, α -fNCL, α - κ -fNCL und α - β - κ -fNCL angereicherten Magermilchgel keinen Einfluss ($p > 0,05$) auf die Gelbildungsstartzeit.

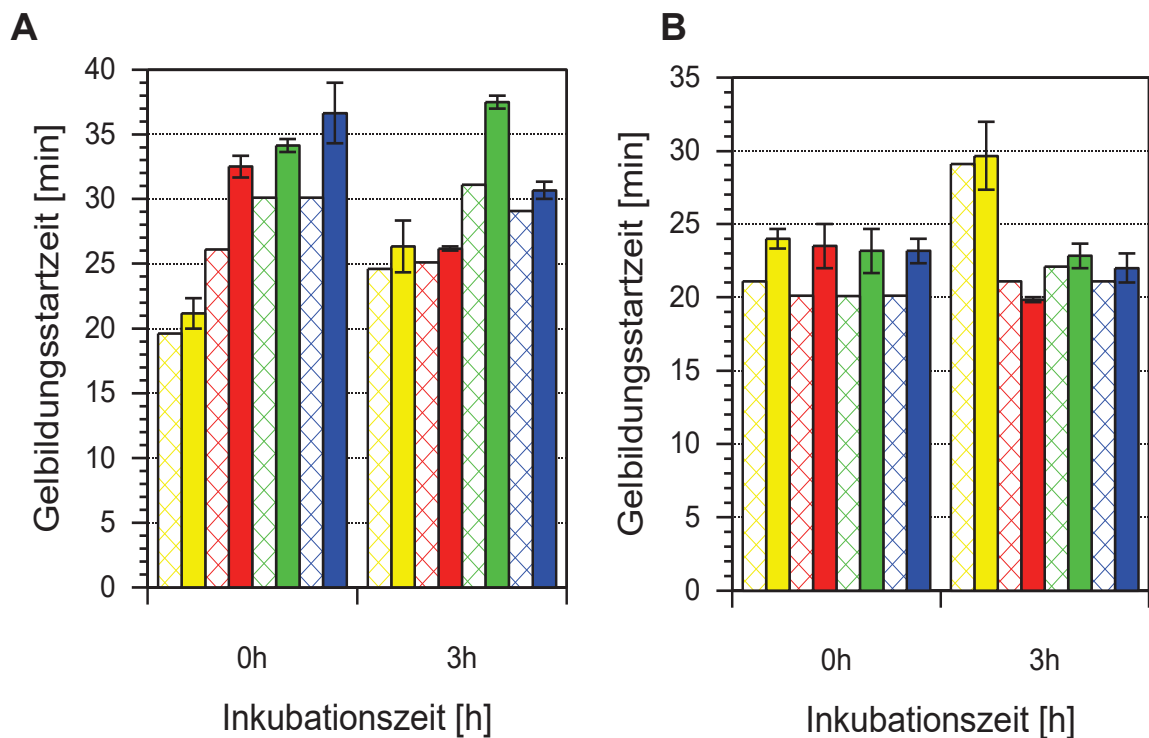


Abbildung 4-27: Vergleich der durch dynamische Oszillation (schraffiert) bzw. Thromboelastometrie (ausgefüllt) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten Caseingelen (A) bzw. kNCL- oder fNCL-angereicherten Magermilchgelen (B). Kommerzielle Natriumcaseinatlösungen (kNCL) und fraktionierte Natriumcaseinatlösungen (fNCL) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die kNCL wurden mit 20 g/kg und die fNCL mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Eingesetzt wurden kNCL (gelb), α -fNCL (rot), α - κ -fNCL (grün) und α - β - κ -fNCL (blau). Anzahl der Messungen je Probe: n = 1 (dynamische Oszillation), n = 2 (Thromboelastometrie).

4.3.5 Synäreseneigung

Um den Einfluss des Trockenmasseanteils und der enzymatischen Quervernetzung auf die Produktstabilität zu charakterisieren, wurde die Synäreseneigung der säureinduzierten angereicherten Magermilchgele untersucht. Eine verringerte Synäreseneigung wird durch ein erhöhtes Wasserbindevermögen bedingt. Durch die Bildung von Bindungen nimmt die Porengröße ab und der Wasseraustritt verringert sich (Farnsworth et al., 2006).

In Abbildung 4-28 ist die Synäreseneigung von unbehandelter Magermilch (M1, Trockenmasse = 96 g/kg), mit Wasser und enzymbehandelter kNCL angemischter Magermilch (M2, Trockenmasse = 100,8 g/kg) sowie mit unbehandelter und enzymbehandelter kNCL angereicherter Magermilch (M3, Trockenmasse = 105,6 g/kg) dargestellt. Obwohl die Hitzebehandlung von Magermilch zu steiferen Gelen führte, nahm das Wasserbindevermögen nicht signifikant zu ($p > 0,05$). Je höher die Trockenmasse der Probe war, desto geringer war die Synäreseneigung. Die Erhöhung der Trockenmasse um ca. 1% führt zu einer 3-mal geringeren Synärese (Vergleich M1 und M3). Dies liegt daran, dass mit höherer Trockenmasse steifere Gele erzeugt wurden und dadurch ein höheres Wasserbindungsvermögen auftrat. M2 mit 3 h enzymbehandelter kNCL und M3 mit unbehandelter kNCL bildeten ähnlich steife Gele, trotzdem war das Wasserbindevermögen der M2 mit 3 h inkubierter kNCL etwas schwächer ($p < 0,05$).

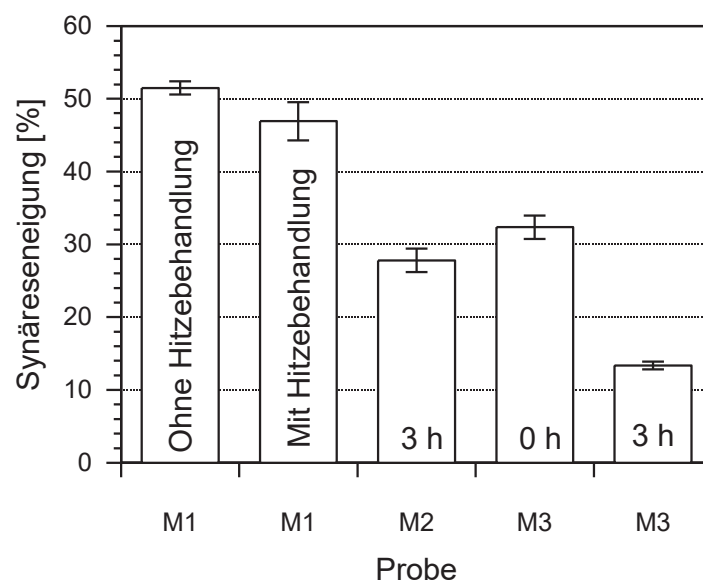


Abbildung 4-28: Vergleich der Synäreseneigung von säureinduzierten Magermilchgele (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Dargestellt sind Magermilch verdünnt mit Wasser 2:1 (M1), Magermilch angereichert mit kNCL und Wasser 2:0,5:0,5 (M2), Magermilch angereichert mit kNCL 2:1 (M3). Die kNCL wurde für 3 h mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Anzahl der Messungen je Probe: n=3.

In Abbildung 4-29 ist die Synäreseneigung der mit enzymbehandelter (3 h) und unbehandelter kNCL (M3), α -fNCL (M4), α - κ -fNCL (M5) oder α - β - κ -fNCL (M6) angereicherten säureinduzierten Magermilchgele dargestellt. Durch Enzymbehandlung nahm bei M4 die Synärese ($p < 0,05$), bei M5 und M6 jedoch nicht ($p > 0,05$). Die höchste Synäreseneigung zeigte M4 ($p < 0,05$), welche auch weniger steife Gele bildete als M5 und M6. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Gelbildungsuntersuchungen. Das mit M5 und M6 verglichene geringere Wasserbindevermögen von M4 ist auf das schwächer ausgebildete Gelnetzwerk zurückzuführen. Obwohl bei M6 durch Enzymbehandlung steifere Gele generiert werden konnten, blieb die Synäreseneigung unverändert. Die Synäreseneigung der mit unbehandelter fNCL angereicherter Magermilch war geringer als die der mit unbehandelter kNCL angereicherten Magermilch. Durch Enzymbehandlung der NCL war die Synäreseneigung von M3 geringer als von M4, M5 und M6.

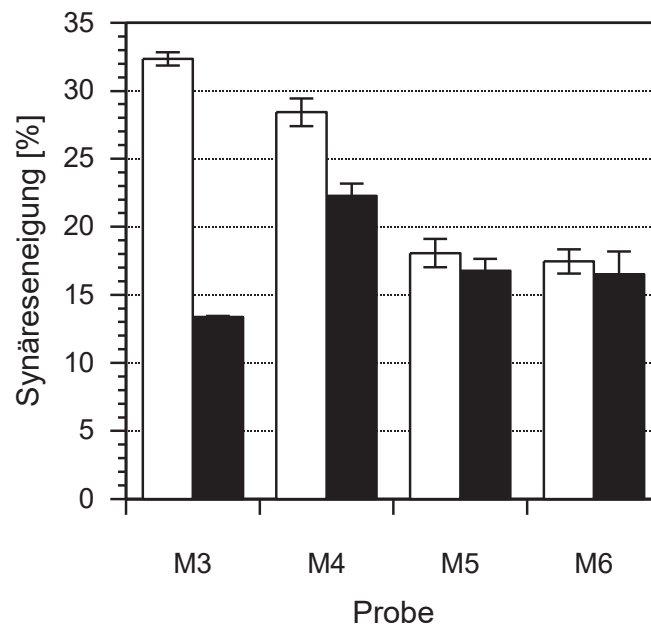


Abbildung 4-29: Vergleich der Synäreseneigung von säureinduzierten Magermilchgele (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Diese wurden angereichert mit unbehandelten (weiße Balken) und enzymbehandelten (schwarze Balken) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg; fNCL). Die fNCL wurden für 3 h mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Dargestellt sind mit kNCL angereicherte Magermilch (M3), mit α -fNCL angereicherte Magermilch (M4), mit α - β -fNCL angereicherte Magermilch (M5), mit α - β - κ -fNCL angereicherte Magermilch (M6). Anzahl der Messungen je Probe: $n=3$.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung von Caseinen durch mikrobielle Transglutaminase auf die Gelbildung von kommerziellen und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (kNCL, fNCL) sowie damit angereicherter Magermilch untersucht. Zur Herstellung der fNCL wurden die einzelnen Caseinfraktionen mittels Membranfiltration (β -Casein) und CaCl_2 -Fällung (α - und κ -Casein) isoliert. Für die β -Caseinfraktion und die κ -Caseinfraktion konnte eine Ausbeute von 15 % und 6 %, eine Wiederfindung von 41 % und 52 % und eine Reinheit von 88 % und 52 % Reinheit erzielt werden. Damit konnten teilweise höhere Werte erreicht werden als in bestehenden Studien mit ähnlichen oder anderen Methoden (O'Mahony et al., 2007; Post & Hinrichs, 2011; van Hekken & Holsinger, 2000). Mit einer Ausbeute von 20 %, einer Wiederfindung von 36 % und einer Reinheit von 40 % lagen die Ergebnisse für die α -Caseinfraktion unter denen bestehender Studien (Post & Hinrichs, 2011). Zudem ergaben sich bei dieser Fraktion Probleme bei der Herstellung der fNCL. Es wurden zwei fNCL aus zwei Versuchsreihen gleicher Vorgehensweise (V8 und V9) hergestellt. Bei einer bildete sich ein Gel (V8), die andere blieb in Lösung (V9). Die Fehlerquelle ist noch unklar, es wird aber ein erhöhter Calciumanteil in V8 vermutet. Des Weiteren ließ sich diese Fraktion (V9) weniger quervernetzen als kommerzielles Säurecasein, was sich durch Bildung weniger steifer Gele nach Säuerung zeigte.

Die Gelbildungsuntersuchen der kNCL zeigten eine Erhöhung der Gelsteifigkeit mit steigender Inkubationszeit, wobei Inkubationen für mehr als 3 h nur noch geringfügig zu steiferen Gelen führten. Inkubationszeiten bis zu 3 h führten in kNCL-angereicherter Magermilch zu steiferen Gelen, bei längerer Inkubation nahm die Gelsteifigkeit wieder ab. Gele aus unbehandelter kNCL und fNCL unterschieden sich kaum bezüglich der Gelsteifigkeit. Die 3-stündige Inkubation mit mTGase bedingte zwar steifere Gele aus fNCL, diese konnten die Steifigkeit der Referenzprobe (kNCL) allerdings nicht erreichen. Von den fNCL wies die α -fNCL nach Enzymbehandlung die höchste Gelsteifigkeit (MA = 19,25 mm) auf. Dagegen ließ sich die α - β - κ -fNCL am besten durch mTGase verknüpfen, was an dem Anstieg der MA von 6,2 mm auf 17,6 mm infolge der Enzymbehandlung zu erkennen war. Dies lässt positiven Effekt des β -Caseins vermuten. So schien die α -Caseinfraktion die stärkste selbstinduzierte Gelbildung aufzuweisen, ließ sich dagegen aber schwer verknüpfen. Bei Magermilch führte die Anreicherung mit unbehandelter

fNCL zu steiferen Gelen als mit unbehandelter kNCL angereicherter Magermilch, was an der etwas höheren Trockenmasse der fNCL, der Caseinzusammensetzung der fNCL oder den isolierten Caseinfraktionen in der fNCL liegen könnte. Mit enzymbehandelter kNCL angereicherte Magermilch bildete steifere Gele als mit enzymbehandelter fNCL angereicherte Magermilch. Im Gegensatz zu den Caseingelen aus fNCL wurden die steifsten Magermilchgele aus enzymbehandelter α -k-fNCL und α - β -k-fNCL gebildet, wohingegen das Magermilchgel aus α -fNCL die höchste Steifigkeitserhöhung auswies. Der Grund dafür könnte sein, dass die vermehrt gebildeten kovalenten Bindungen in der α -k-fNCL und α - β -k-fNCL die nicht-kovalenten Bindungen in ihrer Mobilität eingeschränkt haben und somit die Ausbildung des Gelnetzwerkes behindert wurde. Die Synäreseuntersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Gelbildungsuntersuchungen. D. h. steifere Gele wiesen eine geringere Synäreseneigung auf.

Die Isolierung der α -Caseinfraktion mittels CaCl_2 -Fällung sollte wiederholt und anschließend eine Aufreinigung durch wiederholtes Waschen oder eine Dialyse durchgeführt werden. Des Weiteren sollte die genaue Zusammensetzung aller Fraktionen untersucht werden (Calcium, Phosphor), um Unterschiede der einzelnen Fraktionen herauszufinden. Auch sollten verschiedene Methoden zur Protein- und Aschegehaltbestimmung angewendet werden, da hier im Falle der α -Caseinfraktion unpassende Ergebnisse auftraten. Dadurch könnte geklärt werden, warum α -Casein solche Probleme bereitete. Außerdem sollten Gelbildungsuntersuchungen der einzelnen Fraktionen durchgeführt werden. Da die optimale Inkubationsdauer noch nicht genau bestimmt wurde, sollte auch diese weiter erforscht werden. Für die fNCL, die mit fNCL angereicherte Magermilch sowie die mit kNCL angereicherte Magermilch sollten Zeiten zwischen 1 h und 5 h getestet werden.

6 Literaturverzeichnis

Anema, S. G. et al., 2005. Rheological properties of acid gels prepared from pressure- and transglutaminase-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, Band 19, pp. 879-887.

Anonymus, 2001. *ISO 8968-1:2001 (IDF 20-1:2001)*.

Atamer, Z. et al., 2016. Bovine β -casein: isolation, properties and functionality. A review. *International Dairy Journal*, pp 1-36.

Baltes, W., 2000. *Lebensmittelchemie*. 5 Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Baumy, J. J. & Brule, G., 1988. Binding of bivalent cations to α -lactalbumin and β -lactoglobulin: effect of pH and ionic strength. *Lait*, Band 1, pp. 33-48.

Bian, H., 2012. *Colloidal behavior of casein biopolymer in alkaline solution and its application in self-levelling underlayments (SLUs)*. München: Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.

Bolliger, D., Seeberger, M. D. & Tanaka, K. A., 2012. Principles and Practice of Thromboelastography in Clinical Coagulation. *Transfusion Medicine Reviews*, 26(1), pp. 1-13.

Bönisch, M. P., Lauber, S. & Kulozik, U., 2004. Effect of Ultra-high Temperature Treatment on the Enzymatic Cross-linking of Micellar Casein and Sodium Caseinate by Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 69(8), pp. E398-E404.

Bulca, C. & Kulozik, U., 2004. Heat-induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration. *Advances in Fractionation and Separation: Processes for Novel Dairy Applications*, 389(133), pp. 36-39.

Cheryan, M., 1990. *Handbuch Ultrafiltration*. Hamburg: Behr's Verlag.

Dalgleish, D. G. & Law, A. J. R., 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins.. *Journal of Dairy Research*, Band 55, pp. 529-538.

Dauphas, S. et al., 2005. The supramolecular organisation of β -casein: effect on interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 19(3), pp. 387-393.

de Kruif, C. G. & Grinberg, V. Y., 2002. Micellisation of β -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210(2-3), pp. 183-190.

de Kruif, C. G. & Holt, C., 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. *Advanced Dairy Chemistry*, pp. 233-276.

de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V., 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, Band 171-172, pp. 36-52.

- Dickinson, E., 2006. Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. *Colloids and Surfaces*, Band 288, pp. 3-11.
- Donahue, S. & Otto, C. M., 2005. Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 15(1), pp. 9-16.
- Faergemand, M. et al., 1999. Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set-style yoghurt. *Milchwissenschaften*, Band 54, pp. 563-566.
- Farías, M. E., Martinez, M. J. & Pilosof, A. M. R., 2010. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, Band 2, pp. 79-88.
- Farnsworth, J. P., Li, J., Hendricks, G. M. & Guo, M. R., 2006. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, Band 65, pp. 113-121.
- Flanagan, J., Gunning, Y. & Fitzgerald, R. J., 2003. Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Research International*, Band 36, pp. 267-274.
- Fox, P. F. & Brodtkorb, A., 2008. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, Band 18, pp. 677-684.
- Gauche, C., Vieira, J. T. C., Ogliari, P. J. & Bordignon-Luiz, M. T., 2008. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, Band 43, pp. 788-794.
- Gharst, G., Clare, D. A., Davis, J. P. & Sanders, T. H., 2007. The Effect of Transglutaminase Crosslinking on the Rheological Characteristics of Heated Peanut Flour Dispersions. *Journal of Food Science*, 72(7), pp. C369-C375.
- Goff, H. D., 2014. *The Dairy Science and Technology eBook*, Guelph, Kanada.
- Graham, E. R. B., Malcolm, G. N. & McKenzie, H. A., 1984. *On the isolation and conformation of bovine β -casein A*, Canberra, Australia: Australian National University.
- Graham, E. R. B., McKenzie, H. A. & Murphy, W. H., 1993. The isolation and properties of whole casein: Some implications for comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104B(4), pp. 747-757.
- Grieve, P. A. & Kitchen, B. J., 1985. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, 52(1), pp. 101-112.
- Hagel, L., 2011. Gel filtration: Size exclusion chromatography. In: *Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications* Wiley, pp. 51-91.
- Hammarsten, O., 1883. Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei.. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 7(3), pp. 227-273.

Heinzmann, G., 2014. *Analytik News*. <https://www.analytik-news.de/> [Zugriff am 13 11 2016].

Herrmann, M., Bylund, G. & Damerow, G., 1988. *Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*. Essen:Verlag Th. Mann.

Hipp, N. J., Groves, M. L., Custer, J. H. & McMeekin, T. L., 1952. Separation of α -, β - and γ -Casein. *Journal of Dairy Science*, 35(3), pp. 272-281.

Holt, C., 1998. *Casein structure and casein-calcium phosphate interactions*. Copenhagen: Federation, Danish National Committee of International Dairy.

Holt, C., Sorensen, E. S. & Clegg, R. A., 2009. Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. *FEBS Journal*, 276(8), pp. 2308-2323.

Horne, D. S., 1998. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 8(3), pp. 171-177.

Horne, D. S., 2002a. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Band 7, pp. 456-461.

Horne, D. S., 2002b. Caseins - molecular properties, casein micelle formation and structure. In: *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. New York: Elsevier.

Horne, D. S., 2003. Casein micelles as hard spheres: Limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces , A: Physicochemical and Engineering Aspects* (213), pp. 255-263.

Horne, D. S., 2006. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current opinion in Colloid & Interface Science*, Band 11, pp. 148-153.

Huppertz, T. et al., 2006. A method for the large-scale isolation of β -casein. *Food Chemistry*, 99(1), pp. 45-50.

Hurt, E. & Barbano, M., 2010. Processing factors that influence casein and serum protein separation by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, Band 93, pp. 4928-4941.

Igarashi, Y., 1995. An improved procedure for the preliminary fractionation of milk proteins.. *International Dairy Journal*, Band 5, pp. 305-310.

Imm, J. Y., Lian, P. & Lee, C. M., 2000. Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *Journal of Food Science*, Band 65, pp. 200-204.

Janer, C., Peláez, C. & Requena, T., 2004. Caseinomaclopeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, 86(2), pp. 263-267.

Jansohn, M. & Rothhämel, S. Hrsg., 2012. *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Hrsg. München: Elsevier.

Jaros, D., Jacob, B., Otto, C. & Rohm, H., 2010. Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, Band 20, pp. 321-327.

Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T. & Rohm, H., 2006b. Transglutaminase in Dairy Products: Chemistry, Physics, Applications. *Journal of Texture Studies*, Band 37, pp. 113-155.

Jaros, D., Pätzold, J., Schwarzenbolz, U. & Rohm, H., 2006a. Small and Large Deformation Rheology of Acid Gels from Transglutaminase Treated Milks. *Food Biophysics*, pp. 124-132.

Jaros, D. et al., 2014. Cross-linking with microbial transglutaminase: Relationship between polymerisation degree and stiffness of acid casein gels. *International Dairy Journal*, Band 38, pp. 174-178.

Kersten, M., 2001. *Proteinfraktionierung mittels Membrantrennverfahren*, Düsseldorf: VDI Verlag.

Larsen, O. H. et al., 2011. Diagnostic Performance and Therapeutic Consequence of Thromboelastometry Activated by Kaolin versus a Panel of Specific Reagents. *Anesthesiology*, 8(115), pp. 294-302.

Lauber, S., Henle, T. & Klostermeyer, H., 2000. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, Band 210, pp. 305-309.

Law, A. J. R. & Leaver, J., 1998. Effects of acidification and storage of milk on dissociation of bovine casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Band 46, pp. 5008-5016.

Law, A. J. R. & Leaver, J., 2003. *Methods of extracting casein fractions from milk and caseinates and production of novel products*. s.l. Patentnr. WO 2003003847 A1.

Le Berre, O. & Daufin, G., 1994. Fouling and selectivity of membranes during separation of β -casein. *Journal of membran science*, Band 88, pp. 263-270.

Le Magnen, C. & Maugas, J.-J., 1995. *Method for obtaining beta-casein*. Patentnr. 5397577.

Lorenzen, P. C., Neve, H., Mautner, A. & Scrimme, E., 2002. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), pp. 152-157.

Lucey, J. A., Munro, P. A. & Singh, H., 1999. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3-6), pp. 275-279.

- Lucey, J. A. et al., 1997. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological Properties. 7(6-7), pp. 381-388.
- Matissek, R., Steiner, G. & Fischer, M., 2014. *Lebensmittelanalytik*. 5. Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- McKenzie, H. A., 1971. Whole Casein: isolation, properties and zone electrophoresis. In: *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology*. New York: Academic Press, pp. 87-116.
- McMahon, D. J., Du, H., McManus, W. R. & Larsen, K. M., 2009. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *Journal of Dairy Science*, Band 92, pp. 5854-5867.
- McMeekin, T. L., Hipp, N. J. & Groves, M. L., 1959. The Separation of the Components of α -Casein - I. The Preparation of α_1 -Casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Band 83, pp. 35-43.
- McSweeney, P. L. H. & Fox, P. F., 2013. *Advanced Dairy Chemistry*. New York: Springer Science+Business Media.
- Meisel, H., 1990. Stickstoffverbindungen: Aminosäuren, Proteine, Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen. In: E. Schlimme, Hrsg. *Kompendium zur milchwirtschaftlichen Chemie*. München: VV-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag, pp. 79-94.
- Melin, T. & Rautenbach, R., 2007. *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. 3. Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Menéndez, O., Schwarzenbolz, U., Rohm, H. & Henle, T., 2004. Casein gelation under simultaneous action of transglutaminase and glucono-d-lactone. *Nahrung/Food*, 48(3), pp. 165-168.
- Menter, P., 2000. *Acrylamide Polymerization - A Practical Approach*, http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf [Zugriff am 22-12-2016].
- Mounsey, J. S., O'Kennedy, B. T. & Kelly, P. M., 2005. Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Lait*, Band 85, pp. 405-418.
- Murphy, J. M. & Fox, P. F., 1991. Fractionation of sodium caseinate by ultrafiltration. *Food Chemistry*, Band 39, pp. 27-38.
- Myllärinen, P., Buchert, J. & Autio, K., 2007. Effect of transglutaminase on rheological properties and microstructure of chemically acidified sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, 17(7), pp. 800-807.
- O'Connell, E. J., Kelly, A. L., Fox, P. F. & de Kruif, K. G., 2001. Mechanism for the Ethanol-Dependent Heat-Induced Dissociation of Casein Micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), pp. 4424-4428.

O'Mahony, J. A., Smith, K. E. & Lucey, J. A., 2007. *Purification of β -casein from milk*. s.l. Patentnr. US20070104847 A1.

Partanen, R. et al., 2008. Effect of transglutaminase on structure and syneresis of neutral and acidic sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, Band 18, pp. 414-421.

Partschefeld, C., 2012. *Enzymatisch vernetzte Milchproteine: Reaktionsorte und funktionelle Konsequenzen*. Dresden: Technische Universität Dresden.

Pelegri, D. H. G. & Gasparetto, C. A., 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lebensmittelwissenschaft- und technologie*, Band 38, pp. 77-80.

Phadungath, C., 2005. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), pp. 201-212.

Post, A. E., Arnold, B., Weiss, J. & Hinrichs, J., 2012. Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of α - and β -casein. *Journal of Dairy Science*, Band 95, pp. 1603-1616.

Post, A. E., Ebert, M. & Hinrichs, J., 2009. β -casein as a bioactive precursor - processing for purification. *Australian Journal of Dairy Technology*, Band 64, pp. 84-88.

Post, A. E. & Hinrichs, J., 2010. Suitability of commercial caseinates in comparison to micellar casein as raw material for isolation of food-grade β -Casein. *Milchwissenschaft*, Band 65.

Post, A. E. & Hinrichs, J., 2011. Large-scale Isolation of food-grade β -Casein. *Milchwissenschaft*, Band 66, pp. 361-364.

Qi, P. X., 2007. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait - Dairy Science and Technology*, Band 87, pp. 363-383.

Raak, N., 2013. *Diplomarbeit*. Dresden: Technische Universität Dresden.

Raak, N., Gehrich, S., Rohm, H. & Jaros, D., 2015. Rotational Thromboelastometry for Characterising Acid-Induced Gelation of Cross-Linked Casein. *Food Biophysics*, 10(1), pp. 25-29.

Raak, N., Jaros, D. & Rohm, H., 2017. Cross-linking with microbial transglutaminase: Isopeptide bonds and polymer size as drivers for acid casein gel stiffness. *International Dairy Journal*, Band 66, pp. 49-55.

Ram, S., Loh, D. W., Love, D. C. & Dudley, D. P., 1994. *A process for producing beta-casein enriched products*. Patentnr. WO Patent 006306.

Rickwood, D., Ford, T. & Steensgaard, J., 1994. *Centrifugation: essential data*. New York, USA: Wiley.

Sauermost, R. & Freudig, D., 1999. *Spektrum der Wissenschaft*
<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinkristallisation/54154>
 [Zugriff am 10.01.2017].

Schmidt, D. G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure.
Developments in Dairy Chemistry, Band 1, pp. 61-86.

Siegl, T., 2003. *Studien zur Quervernetzung von Milchproteinen und zur Bildung individueller Crosslink-Aminosäuren*. Dresden: Technische Universität Dresden.

Spreer, E., 2011. *Technologie der Milchverarbeitung*. 10. Hrsg. Hamburg: Behr's Verlag.

Striegel, A., Yau, W. W., Kirkland, J. J. & Bly, D. D., 2009. *Modern size-exclusion liquid chromatography: Practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. Hoboken: Wiley.

Swaigood, H. E., 1992. Chemistry of caseins. *Advanced Dairy Chemistry*, 1(Proteins), pp. 63-110.

Tang, C. et al., 2005. Physicochemical and Structural Characteristics of Sodium Caseinate Biopolymers Induced by Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*, Band 29, pp. 402-421.

Trejo, R. & Harte, F., 2010. The effect of ethanol and heat on the functional hydrophobicity of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, Band 93, pp. 2338-2343.

Tuinier, R. & de Kruif, C. G., 2002. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117(3), pp. 1290-1295.

Udabage, P., McKinnon, I. R. & Augustin, M. A., 2001. Effects of Mineral Salts and Calcium Chelating Agents on the Gelation of Renneted Skim Milk. *Journal of Dairy Science*, 84(7), pp. 1569-1575.

van Hekken, D. L. & Holsinger, V. H., 2000. Use of cold microfiltration to produce unique β -casein enriched milk gels. *Le Lait - Dairy Science and Technology*, Band 80, pp. 69-76.

Vasbinder, A. J., Alting, A. C. & de Kruif, K. G., 2003. Quantification of heat-induced casein–whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1-4), pp. 115-123.

Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*, 9(3-6), pp. 189-192.

Ward, L. S. & Bastian, E. D., 1996. A method for isolating β -casein. *Journal of Dairy Science*, pp. 1332-1339.

Waugh, D. F. & von Hippel, P. H., 1956. κ -Casein and the Stabilization of Casein Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, Band 78, pp. 4576-4582.

West, D. W., 1986. The structure and function of the phosphorylated residues of casein. *Journal of Dairy Research*, Band 53, pp. 333-352.

Winter, R., Noll, F. & Czeslik, C., 2011. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. 2. Hrsg. Wiesbaden: Vieweg + Teubner Verlag.

Yen, C.-H., Lin, Y.-S. & Tu, C.-F., 2015. A Novel Method for Separation of Caseins from Milk by Phosphates Precipitation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), pp. 18-32.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Submicellen-Modells: Im Inneren befinden sich κ -caseinarme und an der Oberfläche κ -caseinreiche Submicellen mit vorstehenden C-Terminal-Segmenten des κ -Caseins (Walstra, 1999).	12
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Nanocluster-Modells. Die fadenähnlichen Gebilde stellen die einzelnen Caseinmonomere und die schwarzen Punkte die Calciumphosphat-Nanocluster dar (de Kruif & Holt, 2003).	13
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Dual-Bonding-Modells nach Horne: Die hydrophoben Regionen (Balken) der einzelnen Caseinmoleküle bilden Protein-Protein-Bindungen, während die hydrophilen Regionen (Fäden) an die Calciumphosphat-Cluster (Dreiecke) binden. κ -Casein bindet sich nicht und ordnet sich an der Oberfläche an (Qi, 2007).	14
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der einzelnen Caseinfraktionen (http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/casein.html ; 02.10.2016)	15
Abbildung 2-5: Die vier Zustände des β -Caseins in wässriger Lösung in Abhängigkeit von Temperatur und Calciumkonzentration (Dauphas et al., 2005). 17	
Abbildung 2-6: Proteinmodifikation durch mikrobielle Transglutaminase: A) Acyl-Transfer-Reaktion. B) Polymerisationsreaktion zwischen Glutamin und Lysin. C) Reaktion mit Wasser (Jaros et al., 2006b).	25
Abbildung 2-7: Inkubation von Magermilch mit mTGase (3 U/g Protein bei 40 °C). Transglutaminase-induzierte Caseinoligomerisation in Abhängigkeit der Inkubationszeit (Lauber et al., 2000).	26
Abbildung 2-8: Synärese von unbehandeltem und mTGase-behandeltem Voll- und Magermilchjoghurt. Die Vollmilch wurde 2 h bei 40 °C mit mTGase behandelt und anschließend bei 80 °C für 1 min inaktiviert. In Magermilch fanden mTGase-Behandlung und bakterielle Fermentation zeitgleich statt (d. h. keine Inaktivierung der mTGase) (Lorenzen et al., 2002b)	27
Abbildung 2-9: Enzymbehandelte Caseinlösungen (27 g/kg) wurden mit 3 U mTGase/g Protein unterschiedlich lang bei 40 °C inkubiert. Die mTGase wurde mit 1g/L N-Ethylmaleinimid inaktiviert. Die Gelbildung wurde mit 40 g/L D-Glucono- δ -lacton bei 30 °C durchgeführt. A: Gelbildungskurven enzymbehandelter Caseinlösungen. Die Nummern stehen für die Inkubationszeit in h. Die gepunktete Linie zeigt den pH-Verlauf. B: Gehalt an monomeren (●), dimeren (●) und trimeren (○) Caseinmolekülen in den Caseinlösungen (Jaros et al., 2010).	28
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Projektablaufes.	29
Abbildung 3-2: Aufbau des Versuchstandes zur Membranfiltration. (1) Retentatauslass; (2) Feedeinlass (in diesem Fall Retentateinlass); (3) Permeatauslass; (4) Membranen	32
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung zur Isolierung von β -Casein	33
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Isolation von α -, β - und κ -Casein. Variierte Parameter sind mit (*) gekennzeichnet (Vgl. Tabelle 3-3).	35
Abbildung 3-5: Berechnung der Zusammensetzung der α - κ -fNCL	42

Abbildung 3-6: Thromboelastogramm: R = Reaktionszeit, MA = Maximale Amplitude.....	45
Abbildung 4-1: Gel einer Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese-Analyse: Am Probeneintritt von α - und κ -Casein sind Molekülansammlungen zu erkennen.....	48
Abbildung 4-2: β -Caseinkonzentration in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen Diafiltrationsmittel: 12 L (Kreise), 30 L (Dreiecke), 50 L (Vierecke).....	49
Abbildung 4-3: Zugabe des Calciumchlorids in kristalliner Form (weiß) oder gelöster Form (schwarz) und die Auswirkung auf Ausbeute (A), Wiederfindung (B) und Reinheit (C) der α -, β - und κ -Caseinfraktion.....	52
Abbildung 4-4: Einfluss der Fällungstemperatur auf Ausbeute (A), Wiederfindung (B) und Reinheit (C) der α -, β - und κ -Caseinfraktion. Versuch 7 bei 20 ± 1 °C gefällt (schwarz), Versuch 7 bei 3,5 °C gefällt (dunkelgrau), Versuch 8 bei 3,5 °C gefällt (hellgrau), Versuch 9 bei 3,5 °C gefällt (weiß).....	53
Abbildung 4-5: Abhängigkeit der Ausbeute (schwarz), Wiederfindung (grau) und Reinheit (weiß) des κ -Caseins vom pH der Fällung.	54
Abbildung 4-6: Einfluss der vorgeschalteten Molkenproteinabtrennung auf den Molkenproteingehalt in der β -Caseinfraktion. Der Molkenproteingehalt bezieht sich auf den Proteinanteil der Caseinfraktion. Dargestellt ist β -Casein, das mittels Mikrofiltration isoliert wurde.....	55
Abbildung 4-7: Abhängigkeit des Molkenproteingehaltes der κ -Caseinfraktion von der vorgeschalteten Molkenproteinabtrennung. Der Molkenproteingehalt bezieht sich auf den Proteinanteil der jeweiligen Caseinfraktion. V6 (ohne Molkenproteinabtrennung), V7 und V8 (mit Molkenproteinabtrennung).	55
Abbildung 4-8: α -Natriumcaseinatlösung aus Versuch 8.....	57
Abbildung 4-9: α -Natriumcaseinatlösung aus Versuch 9	57
Abbildung 4-10: Natriumcaseinatlösungen [27 g/kg] aus Versuch 9.....	61
Abbildung 4-11: Darstellung des pH-Verlaufs unterschiedlich säureinduzierter Gele (20, 30 und 40 g/kg Glucono- δ -Lacton (GDL), 30 °C). Dargestellt sind unbehandelte Magermilch (MM), enzymbehandelte kommerzielle Natriumcaseinatlösung (kNCL), mit enzymbehandelter kNCL angereicherte Magermilch (Milch + kNCL) und mit enzymbehandelter kNCL und Wasser angereicherte MM (MM + kNCL + Wasser). Die kNCL wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C, 3 h) inkubiert.	62
Abbildung 4-12: Darstellung des pH-Verlaufs unterschiedlich säureinduzierter Gele (15 und 40 g/kg Glucono- δ -Lacton (GDL), 30 °C). Dargestellt sind unbehandelte Magermilch (MM), enzymbehandelte fraktionierte Natriumcaseinatlösungen (fNCL, 15 g/kg GDL) und mit enzymbehandelter fNCL angereicherte MM (40 g/kg GDL). Die fNCL sind α -fNCL, α - κ -fNCL und α - β - κ -fNCL. Die fNCL wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C, 3 h) inkubiert.....	62
Abbildung 4-13: Einfluss der Hitzebehandlung auf die Gelsteifigkeit (G') säurinduzierter Milchgele (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Rekonstituierte Magermilch (100 g/kg) wurde für 10 min bei 90 °C erhitzt.	63

Abbildung 4-14: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (20 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg). .65

Abbildung 4-15: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg). .65

Abbildung 4-16: Polymerisierungsgrad enzymbehandelter Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.66

Abbildung 4-17: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von angereicherter Magermilch. Die Magermilch wurde mit unterschiedlich lang enzymbehandelten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen wurden für mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.....67

Abbildung 4-18: Vergleich säureinduzierter (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) Gele unbehandelter Magermilch und mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Protein, 40 °C, 0 h und 3 h) behandelter angereicherter Magermilch. Magermilch wurde jeweils mit kommerzieller Natriumcaseinatlösung (kNCL, 27 g/kg) sowie mit kNCL und Wasser angereichert.....68

Abbildung 4-19: Vergleich der durch dynamische Oszillation (maximaler Speichermodul; G'_{\max} ; geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA; offene Symbole) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten Caseingelen. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die Natriumcaseinatlösungen wurden mit 20 g/kg GDL (Kreise) bzw. 40 g/kg GDL (Vierecke) gesäuert.69

Abbildung 4-20: Vergleich der durch dynamische Oszillation (maximaler Speichermodul; G'_{\max} ; geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA; offene Symbole) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) angereicherten Magermilchgelen. Die Magermilch wurde 2:1 mit unterschiedlich lang enzymbehandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten Natriumcaseinatlösungen wurden für mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.70

Abbildung 4-21: Vergleich der durch dynamische Oszillation (geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (offene Symbole) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten Caseingelen. Die verwendeten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die Natriumcaseinatlösungen wurden mit 20 g/kg GDL (Kreise) bzw. 40 g/kg GDL (Vierecke) gesäuert.71

Abbildung 4-22: Vergleich der durch dynamische Oszillation (geschlossene Symbole) bzw. Thromboelastometrie (offene Symbole) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) angereicherten Magermilchgelen. Die Magermilch wurde 2:1 mit unterschiedlich lang enzymbehandelten kommerziellen Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten Natriumcaseinatlösungen wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert.71

Abbildung 4-23: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung von unterschiedlich lang mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) behandelten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg). Die verwendeten fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL) sind α - β - κ -fNCL (schwarze durchgezogene Linien), α - κ -fNCL (graue durchgezogene Linien) und α -fNCL (schwarze gestrichelte Linien) und wurden mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Als Referenz diente eine kommerzielle Natriumcaseinatlösung (graue gestrichelte Linien), die mit 20 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert wurde. 72

Abbildung 4-24: Vergleich der durch Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten kommerziellen (weiß) und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL, kNCL). Die kNCL wurden mit 20 g/kg Glucono- δ -Lacton und die fNCL mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Die fNCL sind α -fNCL (hellgrau), α - κ -fNCL (dunkelgrau) und α - β - κ -fNCL (schwarz). Die verwendeten Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Anzahl der Messungen je Probe: n = 2. 74

Abbildung 4-25: Verlauf der säureinduzierten Gelbildung (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C) von angereicherter Magermilch. Die Magermilch wurde 2:1 mit enzymbehandelten (schwarze Linien) und unbehandelten (graue Linien) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (kNCL, fNCL) wurden für 3 Stunden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Eingesetzt wurden kNCL (durchgezogene dünne Linien), α -fNCL (gepunktete Linien), α - κ -fNCL (durchgezogene dicke Linien) und α - β - κ -fNCL (lang gestrichelte Linien). 75

Abbildung 4-26: Vergleich der durch Thromboelastometrie (Maximale Amplitude; MA) ermittelten Kenngrößen für die maximale Gelsteifigkeit von säureinduzierten angereicherten Magermilchgelen. Die Magermilch wurde 2:1 mit enzymbehandelten (3 h) und unbehandelten (0 h) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg) versetzt. Die verwendeten kommerziellen und fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (kNCL, fNCL) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die kNCL wurden mit 20 g/kg Glucono- δ -Lacton und die fNCL mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Eingesetzt wurden kNCL (weiß), α -fNCL (hellgrau), α - κ -fNCL (dunkelgrau) und α - β - κ -fNCL (schwarz). Anzahl der Messungen je Probe: n = 2. 76

Abbildung 4-27: Vergleich der durch dynamische Oszillation (schraffiert) bzw. Thromboelastometrie (ausgefüllt) ermittelten Gelbildungsstartzeiten von säureinduzierten Caseingelen (A) bzw. kNCL- oder fNCL-angereicherten Magermilchgelen (B). Kommerzielle Natriumcaseinatlösungen (kNCL) und fraktionierte Natriumcaseinatlösungen (fNCL) wurden mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Die kNCL wurden mit 20 g/kg und die fNCL mit 15 g/kg Glucono- δ -Lacton bei 30 °C gesäuert. Eingesetzt wurden kNCL (gelb), α -fNCL (rot), α - κ -fNCL (grün) und α - β - κ -fNCL (blau). Anzahl der Messungen je Probe: n = 1 (dynamische Oszillation), n = 2 (Thromboelastometrie). 77

Abbildung 4-28: Vergleich der Synäreseneigung von säureinduzierten Magermilchgelen (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Dargestellt sind Magermilch verdünnt mit Wasser 2:1 (M1), Magermilch angereichert mit kNCL und Wasser 2:0,5:0,5 (M2), Magermilch angereichert mit kNCL 2:1 (M3). Die kNCL wurde für 3 h mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Anzahl der Messungen je Probe: n=3. 78

Abbildung 4-29: Vergleich der Synäreseneigung von säureinduzierten Magermilchgelen (40 g/kg Glucono- δ -Lacton, 30 °C). Diese wurden angereichert mit unbehandelten (weiße Balken) und enzymbehandelten (schwarze Balken) Natriumcaseinatlösungen (27 g/kg; fNCL). Die fNCL wurden für 3 h mit mikrobieller Transglutaminase (3 U/g Casein, 40 °C) inkubiert. Dargestellt sind mit kNCL angereicherte Magermilch (M3), mit α -fNCL angereicherte Magermilch (M4), mit α - β -fNCL angereicherte Magermilch (M5), mit α - β - κ -fNCL angereicherte Magermilch (M6). Anzahl der Messungen je Probe: n=3. 79

Abbildung A 1: Anteile an α -Lactalbumin (grau) und β -Lactoglobulin (schwarz) in der β -Casein-fraktion aus der Mikrofiltration. 98

Abbildung A 2: Anteile an α -Lactalbumin (grau) und β -Lactoglobulin (schwarz) in der α -, β - κ -Caseinfraktion aus der Calciumchlorid-Fällung..... 98

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 2-1: Ausgewählte Eigenschaften der einzelnen Caseinfraktionen (Schmidt, 1982; Kersten, 2001).	11
Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien	30
Tabelle 3-2: Versuchsparameter Membranfiltration	34
Tabelle 3-3: Parameter zur Calciumchlorid-Fällung in Versuch 4 - 9	36
Tabelle 3-4: Pipettierschema zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
Tabelle 3-5: Masseverhältnisse der Caseinfraktionen	42
Tabelle 3-6: Zusammensetzung der fraktionierten Natriumcaseinatlösungen (fNCL).....	42
Tabelle 3-7: Versuchsreihen mit kommerzieller Natriumcaseinatlösung	43
Tabelle 3-8: Versuchsreihen mit fraktionierter Natriumcaseinatlösung	43
Tabelle 3-9: GDL-Mengen zur rheologischen Erfassung der Gelbildung	44
Tabelle 4-1: Proteinverteilung in Magermilchpulver bestimmt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
Tabelle 4-2: Ausbeute und Reinheit der mittels Membranfiltration isolierten β -Caseinfraktionen	49
Tabelle 4-3: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der α -Caseinfraktion	56
Tabelle 4-4: Kriterien zur Beurteilung der α -Caseinfraktion sowie Caseinverteilung in den einzelnen Fraktionen.	58
Tabelle 4-5: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der mittels Membranfiltration (MF) bzw. Calciumchlorid-Fällung (CaCl_2) isolierten β -Caseinfraktion	59

Tabelle 4-6: Vergleich Masse Pulver, Masse Fraktion, Reinheit, Ausbeute und Wiederfindung der β -Caseinfraktionen	59
Tabelle 4-7: Vergleich Trockenmasse, Proteingehalt und Aschegehalt der α -Caseinfraktion	60
Tabelle 4-8: Vergleich Masse Pulver, Masse Fraktion, Reinheit, Ausbeute und Wiederfindung der κ -Caseinfraktion	60
Tabelle A 1: Herstellung der Lösungen für die Kjeldahl-Methode	96
Tabelle A 2: Herstellung der Lösungen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	96
Tabelle A 3: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Gelpermeationschromatographie	97
Tabelle A 4: Molkenproteinanteil vom Protein der mittels Calciumchlorid-Fällung gewonnenen α -, β - und κ -Caseinfraktion.	99
Tabelle A 5: Molkenproteinanteil vom Protein der mittels Calciumchlorid-Fällung gewonnenen α -, β - und κ -Caseinfraktion.	99

Anhang

Tabelle A 1: Herstellung der Lösungen für die Kjeldahl-Methode

Bezeichnung der Lösung	Konzentration	Chemikalien	Menge
Borsäurelösung	2 %	Borsäure Entionisiertes Wasser	20 g 1000 mL
Indikatorlösung		Ethanol (96 Vol-%) Methylenblau Methylrot	100 mL 0,1 g 0,2 g
Katalysator		Kaliumsulfat Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	1000 g 25 g
Natronlauge	33 %	Natriumhydroxid Bromthymolblau (Indikator) Entionisiertes Wasser	330 g 100 mg 670 mL
Waschlösung Scrubber	15 %	Natriumhydroxid Entionisiertes Wasser	450 g 1550 mL

Tabelle A 2: Herstellung der Lösungen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bezeichnung der Lösung	Konzentration	Chemikalie	Menge
Acrylamid-Stammlösung	18 %	Acrylamid Methylenbisacrylamid Entionisiertes Wasser	4,365 g 0,135 g 25 mL
Ammoniumperoxidsulfat-Lösung	100 g/L	Ammoniumperoxidsulfat Entioniertes Wasser	500 mg 500 µL
Coomassie-Brilliantblau-Lösung	0,6 g/L	Coomassie-Brilliantblau Essigsäure Ethanol Entionisiertes Wasser	0,6 g 100 mL 400 mL 500 mL
Dithiothreitol-Lösung	150 g/L	Dithiothreitol Entionisiertes Wasser	0,075 g 500 µL
Entfärbelösung		Essigsäure Methanol Entionisiertes Wasser	100 mL 500 mL 1400 mL
Harnstofflösung	8 mol/L 480 g/L	Harnstoff Entionisiertes Wasser	

Fortsetzung von Tabelle A-2

Laufpuffer	Glycin (0,38 mol/L)	28,83 g
	Natriumazid	0,30 g
	Natriumdodecylsulfat	2,00 g
	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,05 mol/L)	6,06 g
	Entionisiertes Wasser	1000 mL
Probenpuffer (pH 8,0)	Ethylendiamintetraacetat (2 mmol/L)	0,15 g
	Glycerin (4 mol/L)	86,94 g
	Natriumdodecylsulfat	5 g
	Orange G	0,05 g
	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,8 mol/L)	24,2 g
	Entionisiertes Wasser	250 mL
	Salzsäure	zur pH-Einstellung
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,33 mol/L)	9,85 g
	Entionisiertes Wasser	250 mL
	Salzsäure	zur pH-Einstellung
Natriumdodecylsulfat - Lösung	100 g/L	
Tetramethylethylen-diamin-Lösung	10 mol/L	
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (2 mol/L)	59,1 g
	Entionisiertes Wasser	250 mL
	Salzsäure	zur pH-Einstellung

Tabelle A 3: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Gelpermeationschromatographie

Chemikalie	Massenkonzentration [g/L]
Harnstoff	360,36
Natriumchlorid	5,84
Dinatriumhydrogenphosphat	17,80
3-([3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio)-1-propansulfonat	1,00

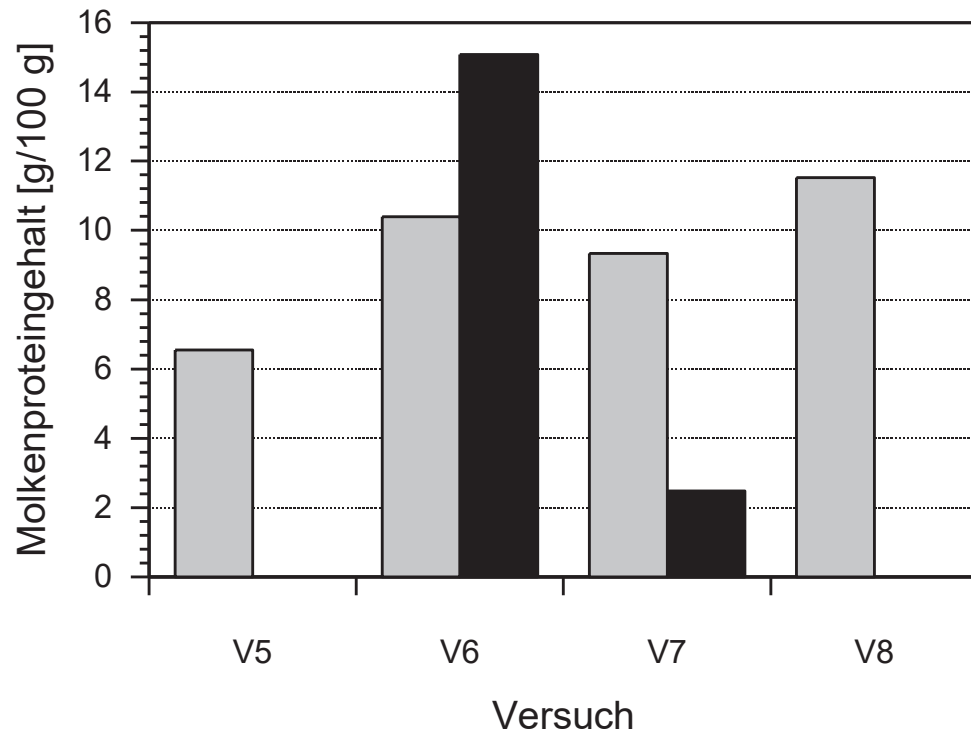


Abbildung A 1: Anteile an α -Lactalbumin (grau) und β -Lactoglobulin (schwarz) in der β -Caseinfraktion aus der Mikrofiltration.

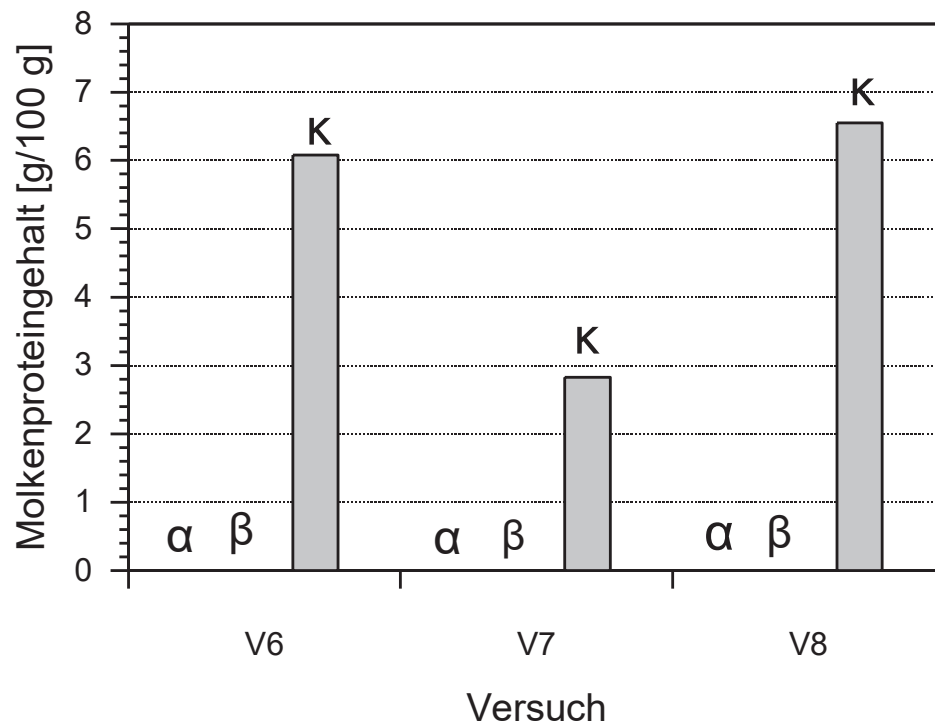


Abbildung A 2: Anteile an α -Lactalbumin (grau) und β -Lactoglobulin (schwarz) in der α -, β - κ -Caseinfraktion aus der Calciumchlorid-Fällung.

Tabelle A 4: Molkenproteinanteil vom Protein der mittels Calciumchlorid-Fällung gewonnenen β -Caseinfraction.

Ver- suc h	Vorgeschaltet e Molkenprotei nabtrennung	Casein - fraktio n	Permeat	α -La [g/ 100 g Fraktion]	β -Lg [g/ 100 g Fraktion]	Molkenprotei n gesamt [g/ 100 Fraktion]
V5	Nein	β	P1	1,17	0	1,17
			P2	1,64	0	1,64
			P3	3,74	0	3,74
V6	Nein	β	P1	2,19	1,84	4,03
			P2	3,60	1,35	4,95
			P3	4,60	1,52	6,10
V7	Ja	β	P1	4,18	0,89	5,07
			P2	5,16	1,08	6,24
			P3	0	0,51	0,51
V8	Ja	β	P1	2,38	0	2,38
			P2	3,76	0	3,76
			P3	5,42	0	5,42

Tabelle A 5: Molkenproteinanteil vom Protein der mittels Calciumchlorid-Fällung gewonnenen α -, β - und κ -Caseinfraction.

Ver- suc h	Vorgeschaltet e Molkenprotei nabtrennung	Casein- fraktion	α -La [g/ 100 g Fraktion]	β -Lg [g/ 100 g Fraktion]	Molkenprotein gesamt [g/ 100 g Fraktion]
V6	Nein	α	0	0	0
		β	0	0	0
		κ	6,08	0	6,08
V7	Ja	α	0	0	0
		β (3,5 °C)	0	0	0
		κ	2,83	0	2,83
V8	Ja	α	0	0	0
		β	0	0	0
		κ	6,55	0	6,55

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir am heutigen Tag beim Prüfungsamt des Fachbereichs Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften der Hochschule Neubrandenburg eingereichte Masterarbeit zum Thema

Alternative Caseinpräparate und deren Wirkung in säureinduzierten Milchgelen

vollkommen selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Verbindung mit Betrieben, Institutionen oder Behörden usw. wurde nur in den in der Arbeit genannten Fällen mit Einverständnis des betreuenden Hochschullehrers aufgenommen.

Dresden, 13.02.2017

Yvonne Penke

Thesen zur Masterarbeit

Alternative Caseinpräparate und deren Wirkung in säureinduzierten Milchgelen

Ziel der Arbeit war die Isolierung von β -Casein aus rekonstituierter Magermilch mittels Membranfiltration sowie α - und κ -Casein mittels nachfolgender Calciumchlorid-Fällung des Retentats. Des Weiteren sollten die Gelbildungseigenschaften dieser Caseinfraktionen untersucht werden. Als Referenz diente kommerzielles Säurecasein.

1. Die Isolierung von β -Casein unter Anwendung der Membranfiltration erwies sich, im Vergleich mit etablierten Methoden, als geeignet.
2. κ -Casein ließ sich mittels Calciumchlorid-Fällung gut isolieren, während α -Casein Probleme bei der Charakterisierung und Natriumcaseinatherstellung bereitete. Unbekannte Substanzen in der α -Caseinfraktion verfälschten die Bestimmung des Protein- und Aschegehaltes und führten zur Gelbildung bei der Herstellung von Natriumcaseinatlösung.
3. Kommerzielle Natriumcaseinatlösung ließ sich bei 3 h Inkubation am stärksten vernetzen.
4. α -Casein ließ sich durch mTGase nur schwach vernetzen. Nicht detektierte Substanzen schienen die Ausbildung eines Gelnetzwerkes einzuschränken.
5. Fraktionierte Natriumcaseinatlösungen, die neben α -Casein noch β - und κ -Casein enthielten, neigten zur Bildung steiferer Gele als reine α -Natriumcaseinatlösungen. Bei höherem β -Caseinanteil in der Natriumcaseinatlösung nahm die Gelsteifigkeit zu. Dies lässt auf eine höhere Verknüpfbarkeit von β -Casein schließen. Die Gelsteifigkeit von kommerzieller Natriumcaseinatlösung konnte mit den fraktionierten Natriumcaseinatlösungen nicht erreicht werden.