



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Bestimmung von Furosin und anderen Erhitzungsindikatoren
in Milch mittels HPLC

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Anita Schmid
Matrikel-Nummer:	0202727
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A474 Diplomstudium Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao.Univ.Prof. DI Dr. Helmut Mayer Universität für Bodenkultur DLWT, Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, im Mai 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturüberblick	2
2.1 Allgemeines über Milch.....	2
2.2 Konsummilch	2
2.3 Rohe Konsummilch.....	2
2.4 Wärmebehandelte Konsummilch	2
2.5 Pasteurisierte Milch.....	3
2.6 Extended-Shelf-Life (ESL) Milch.....	3
2.6.1 Direkte Erhitzung	4
2.6.2 Indirekte Erhitzung in Röhren.....	5
2.6.3 Modifizierte Pasteurisation	7
2.6.4 Mikrofiltration.....	8
2.6.5 Tiefenfiltration	8
2.6.6 Richtwerte für ESL-Milch guter Qualität	10
2.7 Ultrahocherhitzte Milch (UHT-Milch)	10
2.8 Sterilisierte Milch.....	11
2.9 Zusammensetzung der Milch	11
2.10 Indikatorstoffe zur Beurteilung wärmebehandelter Milch.....	13
2.10.1 Typ I der Hitzeindikatoren	15
2.10.2 Typ II der Hitzeindikatoren.....	19
2.11 Maillard-Reaktion	21
2.12 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	23
2.12.1 Mobile Phase	23
2.12.2 Pumpe.....	23
2.12.3 Injektor	23
2.12.4 Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie.....	24
2.12.5 Detektor.....	24

3. Material und Methoden	25
3.1 Probenmaterial	25
3.2 Bestimmung von Furosin als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC..	30
3.2.1 Material und Herstellung von Lösungen.....	30
3.2.2 Ablauf der Furosinbestimmung	33
3.2.3 Laufmittel und Gradienten	36
3.2.4 Herstellung der Kalibrationsstandards	42
3.2.5 Überprüfung der Wiederholbarkeit.....	44
3.2.6 Kontrollprobe des Furosinpeaks	45
3.3 Gesamtproteingehalt in Milch.....	46
3.3.1 Material	46
3.3.2 Herstellung der Lösungen	47
3.3.3 Durchführung	47
3.4 Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin in Milch mittels RP-HPLC	49
3.4.1 Material	49
3.4.2 Ablauf der Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin in Milch	52
3.4.3 Laufmittel und Gradienten	53
3.4.4 Kalibration für β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin.....	55
4. Ergebnisse und Diskussion	57
4.1 Furosin als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC	57
4.1.1 Kalibration	57
4.1.2 Furosin Methodenoptimierung.....	61
4.1.3 Überprüfung der Wiederholbarkeit.....	64
4.1.4 Berechnung des Furosingehaltes in verschiedenen Milchproben	67
4.1.5 Bestimmung des Furosingehaltes als Erhitzungsindikator in Milchproben..	69
4.1.5.1 Rohmilch.....	75
4.1.5.2 Pasteurisierte Milch.....	76
4.1.5.3 ESL-Milch.....	77
4.1.5.4 UHT-Milch.....	79
4.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in Milch (nach Kjeldahl).....	80
4.2.1 Berechnung des Gesamtproteingehalt in verschiedenen Milchproben	80

4.3 Natives β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin als Erhitzungsindikatoren in Milch mittels RP-HPLC	81
4.3.1 Kalibration.....	81
4.3.2 Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Milchproben	86
4.3.2.1 Rohmilch	90
4.3.2.2 Pasteurisierte Milch.....	91
4.3.2.3 ESL-Milch.....	92
4.3.2.4 UHT- Milch.....	93
4.4 Vergleich von Furosin mit nativem β -Lactoglobulin.....	94
4.4.1 Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin in ESL-Milchproben	97
4.4.2 Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin (in RM, pasteurisierter Milch und UHT-Milch).....	102
5. Schlussbetrachtung	122
6. Zusammenfassung.....	124
7. Abstract.....	125
8. Literaturverzeichnis	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Säulendiagramm zur Haltbarkeit von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]	3
Abbildung 2.2 Injektion und Infusion [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].....	4
Abbildung 2.3 Blockdiagramme für die Prozessvarianten zur Direkterhitzung von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].....	5
Abbildung 2.4 Blockdiagramme für die Prozessvarianten zur Indirekterhitzung von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].....	6
Abbildung 2.5 Blockdiagramm der modifizierten Pasteurisation von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].....	7
Abbildung 2.6 Blockdiagramme zum Prozessablauf der Mikrofiltration und Tiefenfiltration von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]	9
Abbildung 2.7 Bestandteile der Milch [TÖPEL, 2004]	12
Abbildung 2.8 β -Lactoglobulin [mg/l] in direkt und indirekt erhitzter hochpasteurisierter ESL-Milch [EBERHARD et al., 2003]	18
Abbildung 2.9 Bildung von Melanoidinen [TÖPEL, 2004]	21
Abbildung 2.10 Produkte der Säurehydrolyse von Lactuloselysin: Furosin (a), Lysin (b), Pyridosin (c) [MULSOW, 2008].....	22
Abbildung 2.11 Prinzip des Ablaufs einer HPLC [MÜLLER, 2006].....	23
Abbildung 3.1 Hydrolyse I.....	33
Abbildung 3.2 Hydrolyse II	33
Abbildung 3.3 Aktivieren der Sep-Pak Säulen	34
Abbildung 3.4 Eintrocknete Proben in Verdünnlösung	35
Abbildung 3.5 Probenaufteilung	44
Abbildung 3.6 Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.1 bis 3	44
Abbildung 3.7 Teil I, Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.4	45
Abbildung 3.8 Teil II, Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.4	45
Abbildung 4.1 Furosinkalibrationsgerade.....	58
Abbildung 4.2 Furosin Standardlösung I (5 pmol/20 μ l).....	58
Abbildung 4.3 Furosin Standardlösung II (10 pmol/20 μ l)	59

Abbildung 4.4 Furosin Standardlösung III (20 pmol/20 µl)	59
Abbildung 4.5 Furosin Standardlösung IV (40 pmol/20 µl)	60
Abbildung 4.6 Furosin Standardlösung V (80 pmol/20 µl)	60
Abbildung 4.7 Furosin Standardlösung VI (160 pmol/20 µl)	61
Abbildung 4.8 Probe Nr.22 (Probengradient + Spülschritt FM 4)	62
Abbildung 4.9 Overlay (gleiche Probe unterschiedlicher Acetonitrilanteil)	63
Abbildung 4.10 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.122.3)	64
Abbildung 4.11 Überprüfung der Furosinmethoden-Genauigkeit	66
Abbildung 4.12 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.123)	69
Abbildung 4.13 Chromatogramm einer Rohmilch (Ausschnitt Nr.123)	69
Abbildung 4.14 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.125)	70
Abbildung 4.15 Chromatogramm einer Rohmilch (Ausschnitt Nr.125)	70
Abbildung 4.16 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Nr.130)	71
Abbildung 4.17 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Ausschnitt Nr.130)	71
Abbildung 4.18 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.127)	72
Abbildung 4.19 Chromatogramm einer ESL-Milch (Ausschnitt Nr.127)	72
Abbildung 4.20 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.124)	73
Abbildung 4.21 Chromatogramm einer UHT-Milch (Nr.38)	74
Abbildung 4.22 Chromatogramm einer UHT-Milch (1:4 verdünnt, Nr.38)	74
Abbildung 4.23 Mittelwerte der Furosingehalte der untersuchten Milchproben	75
Abbildung 4.24 Zusammenfassung aller untersuchten Rohmilchproben	76
Abbildung 4.25 Zusammenfassung aller pasteurisierten Milchproben	77
Abbildung 4.26 Verteilung der Furosinwerte in ESL-Milch (n=71)	78
Abbildung 4.27 Verteilung der Furosinwerte in UHT-Milch (n=16)	79
Abbildung 4.28 α -Lactalbuminkalibrationsgerade	82
Abbildung 4.29 β -Lactoglobulinkalibrationsgerade	83
Abbildung 4.30 Standardlösung I (0,1 µg α -La/10 µl, 0,2 µg β -Lg/10 µl)	83
Abbildung 4.31 Standardlösung II (0,2 µg α -La/10 µl, 0,4 µg β -Lg/10 µl)	84
Abbildung 4.32 Standardlösung III (0,4 µg α -La/10 µl, 0,8 µg β -Lg/10 µl)	84
Abbildung 4.33 Standardlösung IV (0,8 µg α -La/10 µl, 1,6 µg β -Lg/10 µl)	85
Abbildung 4.34 Standardlösung V (1,2 µg α -La/10 µl, 2,4 µg β -Lg/10 µl)	85

Abbildung 4.35 Standardlösung VI (1,6 µg α -La/10 µl, 3,2 µg β -Lg/10 µl)	86
Abbildung 4.36 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.123).....	87
Abbildung 4.37 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Nr.130)	87
Abbildung 4.38 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.127)	88
Abbildung 4.39 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.124)	88
Abbildung 4.40 Mittelwerte des nativen β -Lactoglobulins aller Milchproben.....	90
Abbildung 4.41 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen pasteurisierten Milchproben.....	91
Abbildung 4.42 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen ESL- Milchproben	92
Abbildung 4.43 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen UHT- Milchproben	93
Abbildung 4.44 Mittelwerte (Furosin und β -Lactoglobulin) der untersuchten Milchproben	94
Abbildung 4.45 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 125 Milchproben ...	95
Abbildung 4.46 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in RM, pasteurisierte, ESL- und UHT-Milch (ohne der 7 lactosefreien und der 8 proteinangereicherten Proben)	96
Abbildung 4.47 Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 4.42	96
Abbildung 4.48 Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin in ESL-Milchproben	98
Abbildung 4.49 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 71 untersuchten ESL-Milchproben.....	99
Abbildung 4.50 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Milchproben (ohne der 3 lactosefreien und der 8 proteinangereicherten Proben)	99
Abbildung 4.51 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 37 ESL- Vollmilchproben	100
Abbildung 4.52 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Vollmilch- proben (ohne der 3 proteinangereicherten Proben).....	100
Abbildung 4.53 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 34 ESL- Leichtmilchproben	101

Abbildung 4.54 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Leichtmilch-	
proben (ohne der 3 lactosefreien und der 5 proteinangereicherten Proben)	101
Abbildung 4.55 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in RM und	
UHT-Milch.....	102
Abbildung 4.56 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in RM, past. Milch	
und UHT-Milch.....	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Einteilung nach der angewandten Wärmebehandlung [Österreichischer Lebensmittel CODEX, B32 Konsummilch 2003]	11
Tabelle 2.2 Bestandteile der Kuhmilch [EBERMANN und ELMADFA, 2008]	12
Tabelle 2.3 Durchschnittliche Hitzebelastung der gängigen Konsummilcharten [GALMANN et al., 2001].....	13
Tabelle 2.4 Indikatoren zur Beurteilung wärmebehandelter Milch Teil I [CLAEYS et al., 2002].....	14
Tabelle 2.5 Indikatoren zur Beurteilung wärmebehandelter Milch Teil II [CLAEYS et al., 2002].....	15
Tabelle 2.6 Gehalt an β -Lactoglobulin bei unterschiedlichen Hitzebelastungen [GALMANN et al., 2001].....	17
Tabelle 2.7 HMF-Gehalt in der Milch [TÖPEL, 2004]	19
Tabelle 2.8 Furosingehalt in Milch [KRAUSE, 2005]	20
Tabelle 3.1 Probenmaterial	25
Tabelle 3.2 Furosin Startgradient [MEIER, 2009].....	36
Tabelle 3.3 Probengradient [MEIER, 2009]	37
Tabelle 3.4 Furosin Endgradient [MEIER, 2009].....	37
Tabelle 3.5 Probengradient (+ Spülschritt FM 1)	38
Tabelle 3.6 Probengradient (+ Spülschritt FM 2)	39
Tabelle 3.7 Probengradient (+ Spülschritt FM 3)	39
Tabelle 3.8 Probengradient (+ Spülschritt FM 4)	39
Tabelle 3.9 Furosin Startgradient 13 (für Probengradient mit 11% LM B).....	40
Tabelle 3.10 Probengradient (LM B 12%).....	41
Tabelle 3.11 Endgültiger Probengradient (LM B 11%).....	41
Tabelle 3.12 Probengradient (LM B 10%).....	41
Tabelle 3.13 Furosin Endgradient 14 (für Probengradient mit 11% LM B).....	41
Tabelle 3.14 Kalibrations-Standardlösung.....	43
Tabelle 3.15 Probenmaterial β -Lg	52
Tabelle 3.16 β -Lactoglobulin Startgradient [NUßBAUMER, 2006]	54
Tabelle 3.17 Probengradient [NUßBAUMER, 2006].....	54

Tabelle 3.18 β -Lactoglobulin Endgradient [NUßBAUMER, 2006].....	54
Tabelle 3.19 Kalibrationsstandardlösung.....	56
Tabelle 4.1 Werte der Furosinkalibrierung	57
Tabelle 4.2 Endgültiger Probengradient (LM B 11%).....	63
Tabelle 4.3 Wiederholbarkeitsüberprüfung einer ESL-Milch (Nr.122).....	65
Tabelle 4.4 Erklärung der Furosinberechnung.....	68
Tabelle 4.5 Erklärung der Gesamtproteinberechnung [MATISSEK und STEINER, 2006]	80
Tabelle 4.6 Werte der α -Lactalbuminkalibrierung	81
Tabelle 4.7 Werte der β -Lactoglobulinkalibrierung	82
Tabelle 4.8 Ergebnistabelle (α -Lactalbumingehalt und β -Lactoglobulingehalt).....	89
Tabelle 4.9 Gesamtergebnistabelle (nach Firmennamen sortiert).....	103
Tabelle 4.10 Rohmilch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert).....	112
Tabelle 4.11 Pasteurisierte Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert).....	112
Tabelle 4.12 ESL-Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert).....	113
Tabelle 4.13 UHT-Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert)	116
Tabelle 4.14 Rohmilch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert).....	117
Tabelle 4.15 Pasteurisierte Milch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert).....	117
Tabelle 4.16 ESL-Milch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert).....	118
Tabelle 4.17 UHT-Milch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert).....	121

Abkürzungsverzeichnis

α -La	α -Lactalbumin
β -Lg	β -Lactoglobulin
ALP	alkalische Phosphatase
DIN	Deutsches Institut für Normung
ESL	Extended-Shelf-Life
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDF	International Dairy Federation
Inj.	Injektion
ISO	International Organization for Standardization
KBE	koloniebildende Einheit
LM	Laufmittel
LPO	Lactoperoxidase
MF	Mikrofiltration
RM	Rohmilch
RP	Reverse Phase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SL	Standardlösung
UHQ	Ultra High Quality
UHT	Ultra High Temperature
VM	Vollmilch

1. Einleitung und Fragestellung

Der Handel und die Konsumenten erwarten Lebensmittel mit möglichst langer Haltbarkeit, ohne dass der Geschmack oder die Inhaltsstoffe der Lebensmittel negativ beeinflusst werden. In den letzten Jahren eroberte die ESL-Milch (Extended-Shelf-Life) die Kühlregale der Supermärkte. Es gibt bis jetzt noch keine gesetzliche Definition für die Bezeichnung Extended Shelf Life. Die Hersteller werben mit der längeren Haltbarkeit ohne Verlust des Frischecharakters auf der Verpackung („länger frisch“, „extra lange frisch“ oder ähnliche Bezeichnungen). Sie ist im geschlossenen Zustand bei Einhalten der Kühlkette durchschnittlich drei Wochen haltbar (vom Verfahren abhängig).

Die Hitzebelastung bei der Herstellung von ESL-Milch liegt zwischen der pasteurisierten und der UHT-Milch (Ultra High Temperature). Je höher die Milch erhitzt wird, umso mehr verändern sich die Inhaltsstoffe (z. B. Verlust von Vitaminen) und es kann zu sensorischen Veränderungen (z. B. Maillard-Reaktion) kommen. Es gibt zahlreiche Erhitzungsindikatoren, die es ermöglichen, wärmebehandelte Milch zu beurteilen. Für ESL-Milch gibt es in der Literatur bereits einen Grenzwert von 12 mg Furosin/100 g Protein, der nicht überschritten werden soll, und einen Grenzwert für das native β -Lactoglobulin von 1800 mg/l, der nicht unterschritten werden soll.

Das Ziel dieser Diplomarbeit besteht darin, unterschiedliche frische als auch gefrorene Milchproben (Rohmilch, pasteurisierte Milch, ESL-Milch und UHT-Milch) auf ihren Furosin- und nativen β -Lactoglobulingehalt zu untersuchen und festzustellen, ob der Furosingehalt und der native β -Lactoglobulingehalt miteinander in Verbindung stehen. Eine besondere Bedeutung in der Arbeit haben die Furosin- und β -Lactoglobulingehalte der ESL-Milchproben, da sie einen wichtigen Hinweis auf den beworbenen Frischecharakter geben. Die Analyse Methoden mittels RP-HPLC (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography) waren bereits entwickelt. Die RP-HPLC Methode zur Bestimmung des Furosingehaltes musste noch optimiert und beide Methoden auf Grund eines neuen Detektors neu kalibriert werden.

2. Literaturüberblick

2.1 Allgemeines über Milch

Unter Milch versteht man das durchmischte, unveränderte Gesamtgemelk (Eutersekret), das durch ein- oder mehrmaligem täglichen Melken von zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen gewonnen wird. Handelt es sich um Milch anderer Säugetiere (Ziegenmilch, Schafsmilch, Büffelmilch u. a.), so muss diese Tierart gekennzeichnet sein [SPREER, 2005].

Bei Kühen beträgt die Laktationsperiode durchschnittlich 270 bis 300 Tage. Die erste Milch (eine Woche nach der Geburt des Kalbes) wird als Kolostralmilch bezeichnet. Diese Milch hat eine rötliche Farbe und eine andere Zusammensetzung (z. B. Gehalt an Colostrinin, einem Gemisch an Peptiden) und darf daher nicht in den Handel gebracht werden. Während der Laktationsperiode geben die Kühe durchschnittlich 15 bis 20 Liter Milch pro Tag [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

2.2 Konsummilch

Als Konsummilch bezeichnet man wärmebehandelte oder Rohmilch, die an den Verbraucher abgegeben wird. Sie wird auch als Trinkmilch bezeichnet [SPREER, 2005].

2.3 Rohe Konsummilch

Unter roher Konsummilch versteht man die gereinigte, molkereimäßig unbehandelte Milch. Sie darf nicht über 40 °C erwärmt werden. Sie ist für den unmittelbaren Verzehr bestimmt. Aufgrund des hygienischen Risikos wird Rohmilch mit dem Hinweis „Rohmilch, vor dem Verzehr abkochen“ gekennzeichnet [SPREER, 2005].

2.4 Wärmebehandelte Konsummilch

Die Wärmebehandlung ist in erster Linie eine hygienische Maßnahme, um Mikroorganismen möglichst vollständig abzutöten und dient hauptsächlich der Haltbarkeitsverlängerung.

2.5 Pasteurisierte Milch

Die Haltbarkeit der pasteurisierten Milch, im ungeöffneten, gekühlten Zustand bei 8 °C beträgt durchschnittlich 5 bis 6 Tage. In der Tabelle 2.1 sind die Bedingungen der Wärmebehandlung angegeben. Es wird meistens die Kurzzeiterhitzung angewandt. Bei der Pasteurisation werden pathogene Keime abgetötet und die meisten vegetativen, vermehrungsfähigen Mikro-Organismen vernichtet [SPREER, 2005].

2.6 Extended-Shelf-Life (ESL) Milch

Frischmilch mit verlängerter Haltbarkeit wird Extended-Shelf-Life (ESL) Milch genannt. Die gesamte ESL-Milch Prozesstechnik steht für einen hohen hygienischen Standard. Es gibt bis jetzt noch keine genaue Definition bezüglich der Haltbarkeit und der Bezeichnung für den Begriff ESL-Milch. Sie liegt als Produkt zwischen pasteurisierter Milch und UHT-Milch. Im Vergleich zur pasteurisierten Milch hat ESL-Milch eine längere Haltbarkeit. Der Geschmack der ESL-Milch wird im Vergleich zu UHT-Milch nicht beeinträchtigt [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

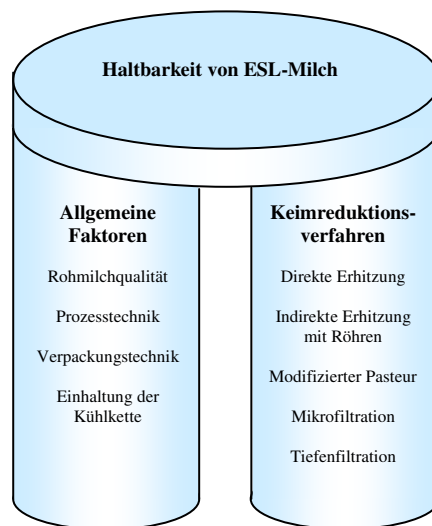


Abbildung 2.1 Säulendiagramm zur Haltbarkeit von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

Die haltbarkeitsverlängernden Faktoren für ESL-Milch werden in der Abbildung 2.1 in zwei Säulen eingeteilt. In der ersten Säule werden die allgemeinen Faktoren zusammengefasst.

Eine wichtige Rolle dabei spielt die Rohmilchqualität, insbesondere die Ausgangs-keimzahl der Rohmilch. Diese darf einen Keimgehalt von 100.000 KBE /ml (koloniebildende Einheit) nicht überschreiten.

Die zweite Säule beinhaltet Erhitzungsverfahren (direkte Erhitzung, indirekte Erhitzung mit Röhren, modifizierter Pasteur) und Filtrationsverfahren (Mikrofiltration, Tiefenfiltration) zur Keimreduktion. Die Haltbarkeit kann durch eine Kombination der verschiedenen Herstellungsschritte deutlich verlängert werden [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

2.6.1 Direkte Erhitzung

Abbildung 2.3 zeigt zwei mögliche Abläufe der direkten Erhitzung von ESL-Milch. Das Vermischen der Milch mit Dampf kann bei beiden Prozessen der Direkterhitzung über eine Injektion oder eine Infusion erfolgen. Bei der Injektion wird der Dampf über einen Injektor in den Milchstrom injiziert. Dagegen gelangt die Milch bei der Infusion über ein Ventil, in vielen dünnen Strahlen in den Dampfraum. Das Infusionsprinzip ist das produktschonendste thermische Verfahren. Eine schematische Darstellung der Injektion und Infusion zeigt die Abbildung 2.2.

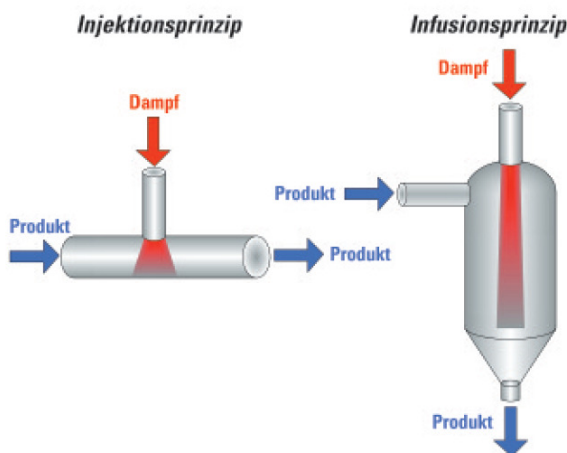


Abbildung 2.2 Injektion und Infusion [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

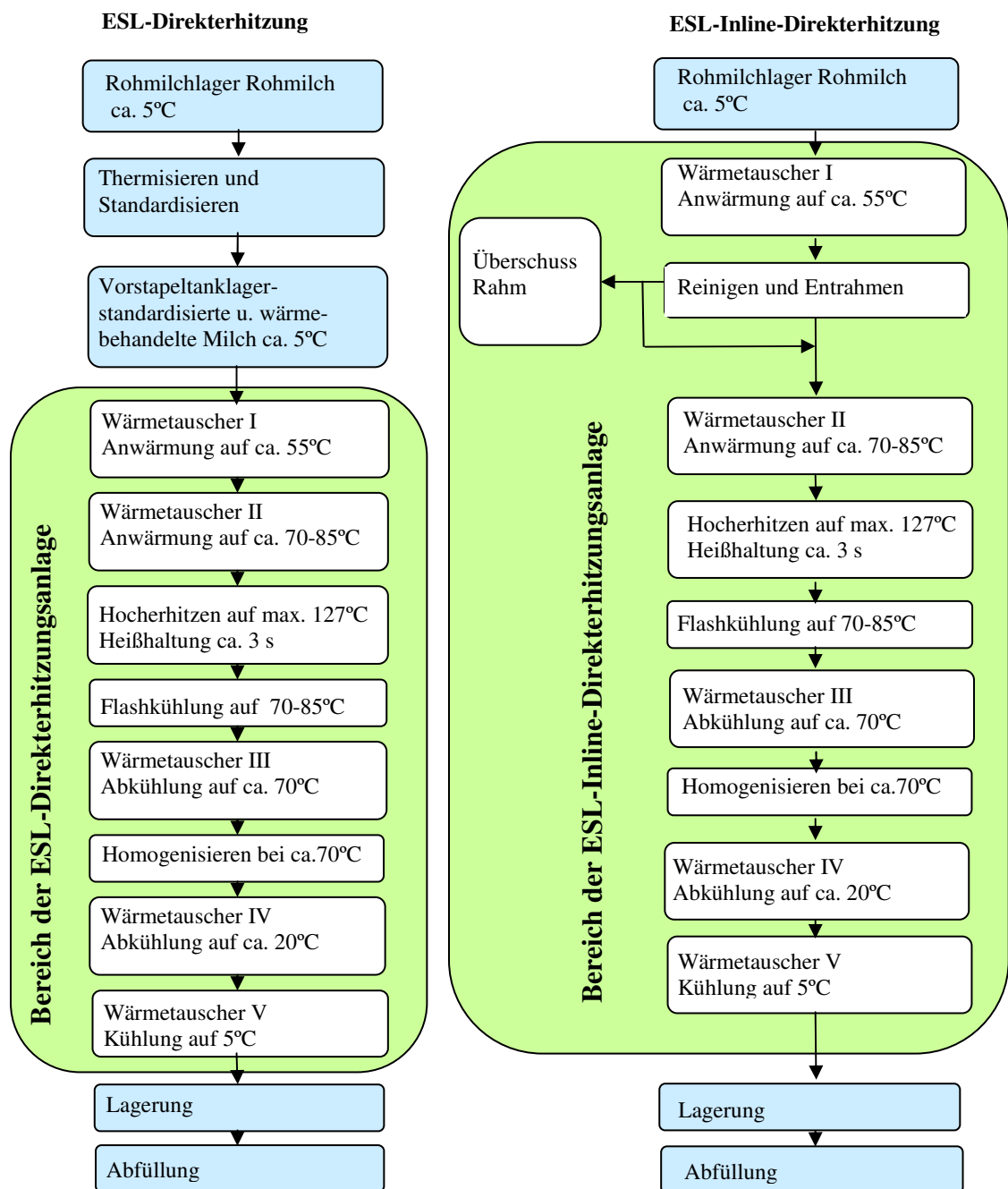


Abbildung 2.3 Blockdiagramme für die Prozessvarianten zur Direkterhitzung von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

2.6.2 Indirekte Erhitzung in Röhren

Bei der indirekten Erhitzung mit Röhren (Wärmetausch durch Doppelrohrschlangen) erfolgt keine Vermischung von Produkt und Heizmedium, was eine längere Aufheizzeit

und eine stärkere thermische Belastung zur Folge hat. Allerdings ist die indirekte Erhitzung energetisch günstiger, die Wärmerückgewinnung ist deutlich höher als bei der direkten Erhitzung. Die Blockdiagramme der Abbildung 2.4 zeigen eine genaue Übersicht dieser Indirekterhitzungsmethoden.

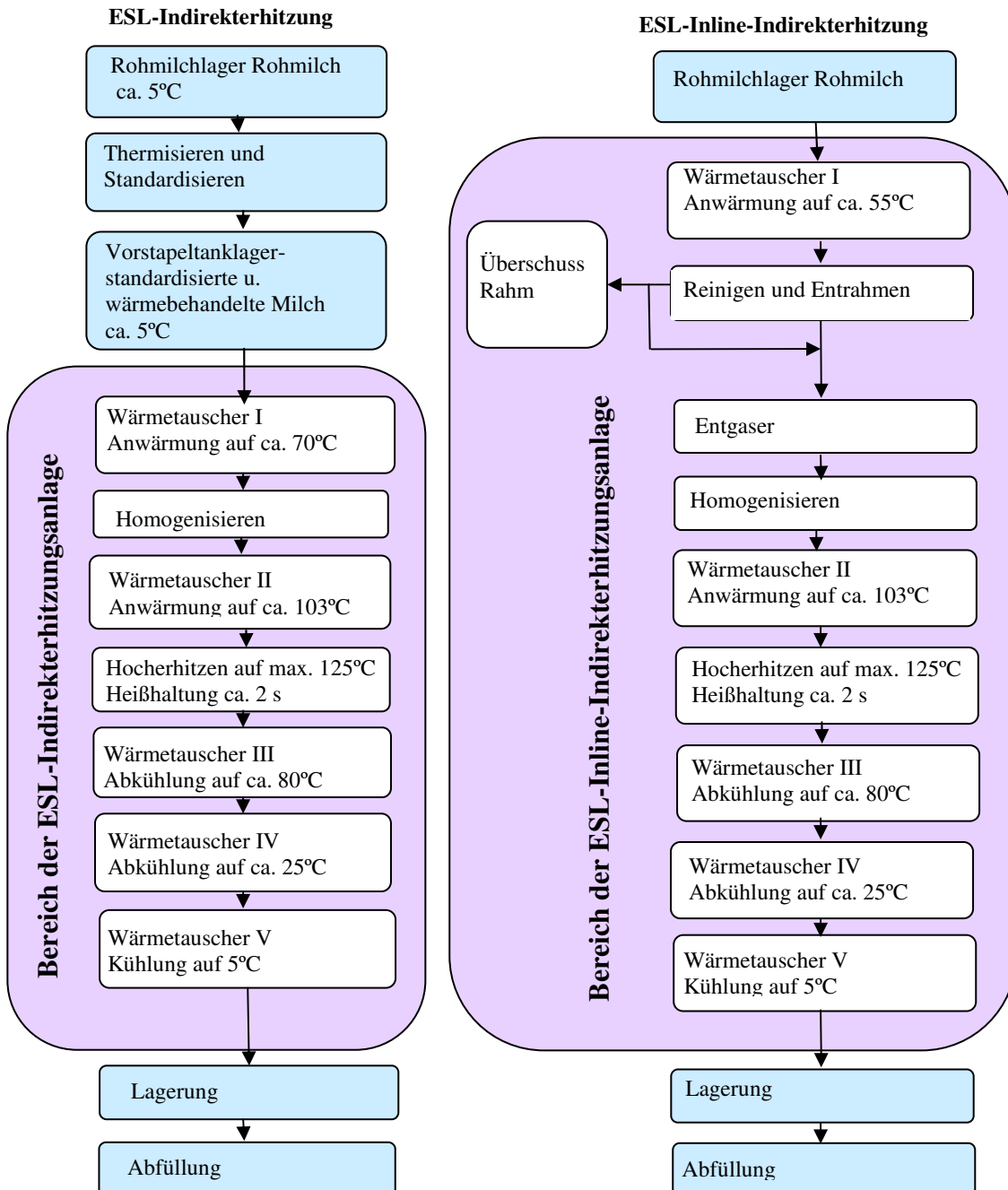


Abbildung 2.4 Blockdiagramme für die Prozessvarianten zur Indirekterhitzung von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

2.6.3 Modifizierte Pasteurisation

Eine Alternative zu den bereits genannten thermischen Verfahren ist die modifizierte Pasteurisation. In diesem Verfahren wird ein konventioneller Milchpasteur mit einem zusätzlichen Röhrenpaket ausgestattet. Dieses Verfahrenskonzept wurde von der Firma GEA TDS und der Fachhochschule Hannover (Fachbereich Bioverfahrenstechnik) entwickelt. Abbildung 2.5 zeigt den Ablauf der modifizierten Pasteurisation.

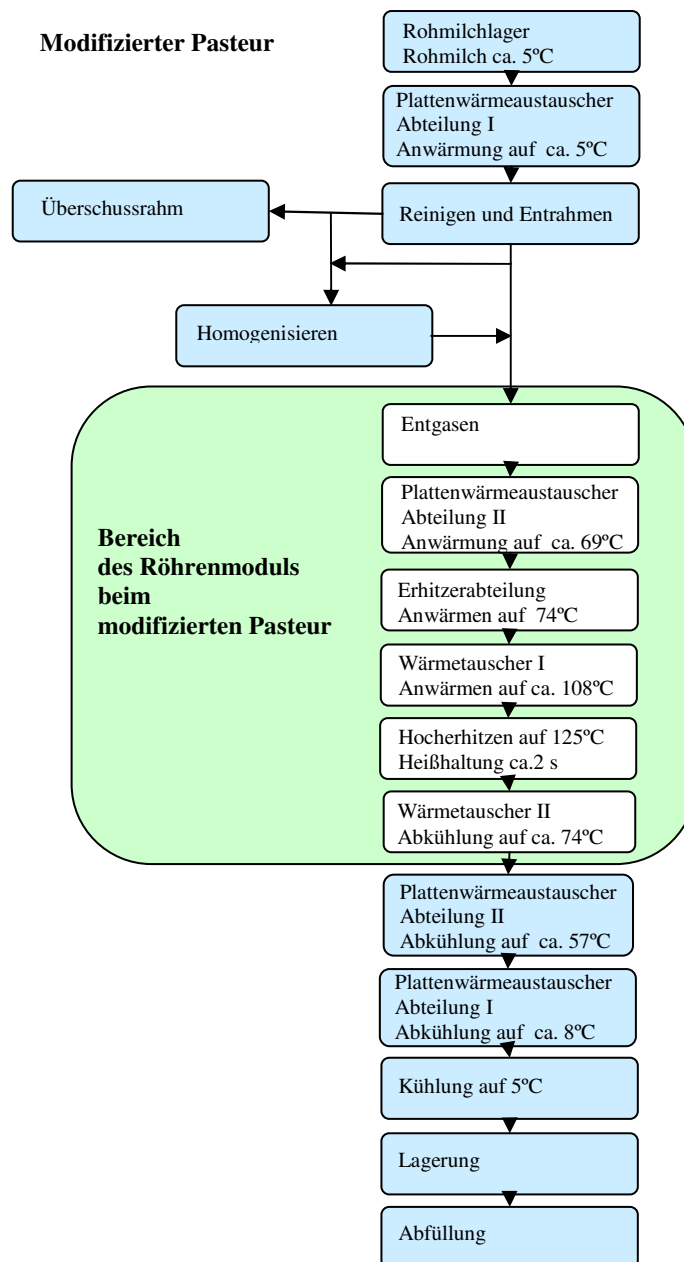


Abbildung 2.5 Blockdiagramm der modifizierten Pasteurisation von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

2.6.4 Mikrofiltration

Bereits in den achtziger Jahren wurde die Mikrofiltration für die Entkeimung von Kesselmilch zur Herstellung von Käse angewendet. Heute wird dieses Verfahren auch bei der Herstellung von Konsummilch verwendet. Durch die Filtration wird die Ausgangskeimzahl stark reduziert. Die Keimrückhaltung beträgt bei der Mikrofiltration mehr als 99,5 %. Es handelt sich um eine „Cross-Flow“ Filtration, die Porengröße der Keramikmembranen beträgt 0,8 μm bis 1,4 μm . Bei der Mikrofiltration entsteht keimarmes Permeat und keimreiches Retentat [KIESNER et al., 2006; HENKE, 2009].

2.6.5 Tiefenfiltration

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine „Dead-End“ Tiefenfiltration. Es werden Filterkerzen aus Polypropylen eingesetzt, die Porengröße des Vorfilters beträgt 0,3 μm , der Hauptfilter hat eine Porenweite von 0,2 μm . Die Mikroorganismen werden auf und in den Filtern zurückgehalten. Im Unterschied zur „Cross-Flow“ Filtration entsteht bei der Tiefenfiltration kein Retentat [HENKE, 2009].

Die Blockdiagramme der Abbildung 2.6 zeigen eine Übersicht der Mikrofiltration und der Tiefenfiltration.

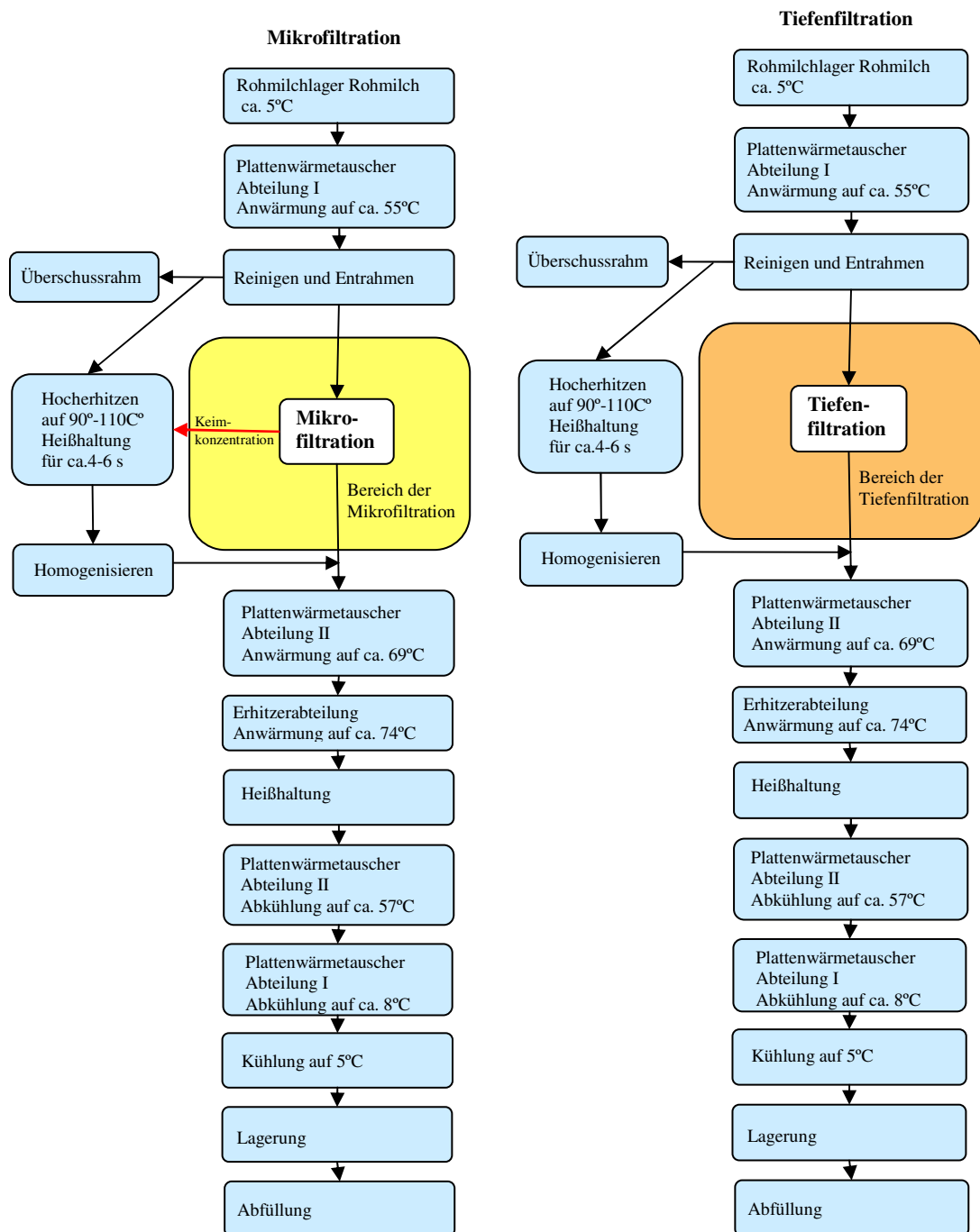


Abbildung 2.6 Blockdiagramme zum Prozessablauf der Mikrofiltration und Tiefenfiltration von ESL-Milch [SWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

2.6.6 Richtwerte für ESL-Milch guter Qualität

Richtwerte für ESL-Milch [DYCK, 2004]:

- | | |
|--|---------------------|
| - Lactulose | < 30 mg/l |
| - Furosin | 12 mg/100 g Protein |
| - β -Lactoglobulin (nativ) | > 1800 mg/l |
| - Gesamtkeimzahl nach der Erhitzung | < 10 KBE/ml |
| - Sporenbildung nach 21 Tagen | 0-10 KBE/ml |
| - Erhaltung des Frischecharakters bis 21 Tage | |
| - Kein signifikanter Geschmacksunterschied zur pasteurisierten Milch | |

2.7 Ultrahecherhitzte Milch (UHT-Milch)

Ultrahecherhitzte Milch wird als H-Milch (haltbare Milch) bezeichnet. Durch die Erhitzung auf mindestens 135 °C für eine Sekunde werden vermehrungsfähige Keime und Sporen von Bazillen abgetötet. Die Abfüllung und Verpackung erfolgt unter sterilen Bedingungen. UHT-Milch kann im geschlossenen Zustand bis zu 6 Monaten bei Raumtemperatur gelagert werden. Die geöffnete Packung sollte innerhalb von 2 bis 3 Tagen verbraucht werden und ist im Kühlschrank aufzubewahren. Durch die Wärmebehandlung kann die UHT-Milch einen leichten Kochgeschmack entwickeln. Anhand der Wärmeübertragung können zwei Verfahren unterschieden werden, das Direkte (Injektion oder Infusion) und das Indirekte (Platten oder Röhren). Produktschonender ist die Infusion von Milch in Dampf [SPREER, 2005].

Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht von verschiedenen Wärmebehandlungen.

**Tabelle 2.1 Einteilung nach der angewandten Wärmebehandlung
[Österreichischer Lebensmittel CODEX, B32 Konsummilch 2003]**

Bezeichnung	Wärmebehandlung	Zeit / Temperatur
Pasteurisiert	Dauerpasteurisation	30-32 Minuten bei 62-65°C
Pasteurisiert	Kurzzeiterhitzung	mind. 15 Sekunden bei 71,7°C ^b
Hoherhitzt	Hoherhitzung	einige Sekunden bei mind. 85°C ^b
Ultrahocherhitzt ^a	Ultrahocherhitzung	mind. 1 Sekunde bei mind. 135°C ^b

^a auch Haltbarmilch oder H-Milch

^b oder einer Zeit/Temperaturkombination mit gleicher Wirkung

2.8 Sterilisierte Milch

Die Milch wird in der verschlossenen Verpackung (meistens Flaschen) für mindestens 3 Minuten auf mindestens 121 °C erhitzt. Es kommt zu Vitaminreduktion und einer geschmacklichen Veränderung der Milch. Ungeöffnet ist die sterilisierte Milch bei Raumtemperatur bis zu einem Jahr haltbar [SPREER, 2005].

2.9 Zusammensetzung der Milch

Milch besteht aus einem Gemisch vieler anorganischer und überwiegend organischer Komponenten. Es wurden 200 Milchinhaltsstoffe bereits um 1950 benannt, heute spricht man von über 2000 natürlichen Milchinhaltsstoffen. Die Zusammensetzung der Milch ist von der Tierart abhängig. In der Abbildung 2.7 und der Tabelle 2.2 werden einige Inhaltsstoffe der Kuhmilch zusammengefasst [TÖPEL, 2004].

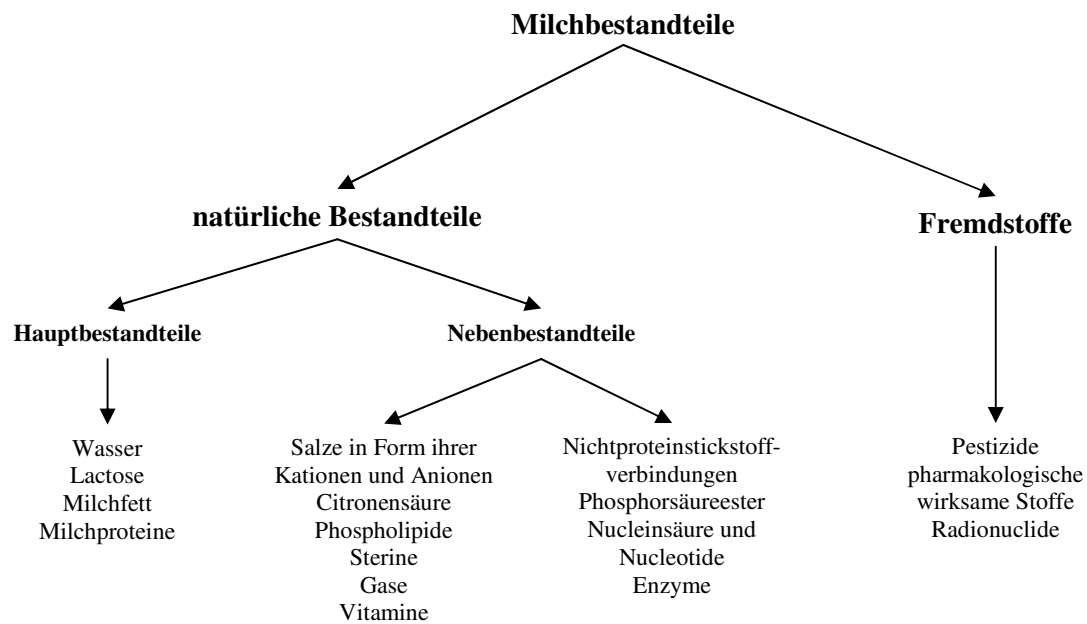


Abbildung 2.7 Bestandteile der Milch [TÖPEL, 2004]

Tabelle 2.2 Bestandteile der Kuhmilch [EBERMANN und ELMADFA, 2008]

Hauptbestandteile	%
Wasser	83-87
Kohlenhydrate (vorwiegend Lactose)	4-5
Fett (abhängig von Rasse, Futter und Haltung)	3-5
Eiweiß (teilweise mit enzymatischer Aktivität)	3-3,5
Weitere Bestandteile	ca. 1
Mineralstoffe, Vitamine, Citronensäure, Diacetyl, Phospholipide, Mono- und Difettsäureester des Glycerins, Steroide und niedermolekulare Stickstoffsubstanzen, wie z. B. das Pyrimidinderivat Orotsäure	

2.10 Indikatorstoffe zur Beurteilung wärmebehandelter Milch

Die Hitzebelastung der gängigen Milcharten und der ESL-Varianten wird in Tabelle 2.3 dargestellt. Die traditionelle pasteurisierte Milch ist am geringsten belastet gefolgt von der Baktofugation [GALMANN et al., 2001].

Tabelle 2.3 Durchschnittliche Hitzebelastung der gängigen Konsummilcharten [GALMANN et al., 2001]

Indikator	Einheit	pasteu- risiert	Bakto- fugation	Mikro- filtration	Hoch- erhitzung	UHT direkt	UHT indirekt
Furosin	mg/kg	35	40	100	200	400	1200
	Protein						
Lactulose	mg/kg	<10	<10	10	20	150	300
Lösliches β-Lg	mg/l	3100	2700	2500	1600	700	150

Lebensmittelrechtlich sind zurzeit nur zwei Hitzeindikatoren anerkannt, die alkalische Phosphatase (ALP) und die Lactoperoxidase (LPO). Es gibt aber noch eine Vielzahl weiterer Erhitzungsindikatoren (Tabelle 2.4 und 2.5). Die Indikatoren werden in zwei Gruppen eingeteilt: Beim Typ I handelt es sich um die Denaturierung von Molkenproteinen und den Abbau oder die Inaktivierung von hitzelabilen Komponenten wie z. B. Enzyme. Bei Typ II handelt es sich um die Bildung von ursprünglich nicht vorhandenen Verbindungen [TÖPEL, 2004].

Tabelle 2.4 Indikatoren zur Beurteilung wärmebehandelter Milch Teil I
[CLAEYS et al., 2002]

	Kinetics	Analysis	Remarks	Ref.
Type I indicators				
Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)	1st order $D_{100^{\circ}\text{C}} = 4.8\text{--}45\text{s}$ $z = 6.6\text{--}27.6^{\circ}\text{C}$ ($Q_{10} = 10.5$)	- Spectrophotometric (p-nitrophenol phosphate) - Fluorometric (Fluorophos)	Quick loss of activity at room temperature (60% after 3 days at 17°C).	Balci and Wilbey, 1999; Griffiths, 1986; Walstra et al., 1999
Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4)	1st order (between 82 and 90°C) $D_{84^{\circ}\text{C}} = 93\text{s}$ $z = 9.2^{\circ}\text{C}$	HPLC (oxidative deamination of adenosine to inosine)	Activity increases up to 75°C, whereas at 85°C the enzyme is inactive.	Martin, Kiesner, Lorenzen, and Schlimme, 1989; Martin et al., 1999
Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	1st order $D_{60^{\circ}\text{C}} = 24.6\text{ min}$ $z = 5.3^{\circ}\text{C}$	- Spectrophotometric (p-nitrophenyl dinatriumphosphate) - Fluorometric (Fluorophos)	30–40% of the activity is situated in the cream.	Claeys, Ludikhuyze, Van Loey, and Hendrickx, 2001a
N-Acetyl- β -glucosidase (EC 3.2.1.30)		Spectrophotometric (p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide)	Levels in raw milk are variable, being elevated in cases of mastitis.	Wilbey, 1996
Catalase (EC 1.11.1.6)	1st order $D_{77.5^{\circ}\text{C}} = 15\text{s}$ $z = 7.4^{\circ}\text{C}$ ($Q_{10} = 180$)	- Disk flotation - Polarographic	- Catalase level depends on disease status of the animal. - Reactivation of catalase is possible.	Griffiths, 1986; Walstra et al., 1999
α -Fucosidase (EC 3.2.1.51)	1st order $E_a = 378\text{ kJ/mol}$	Reflectance colorimetry (p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside)	α -fucoside + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ fructose-6-P	McKellar and Piyasena, 2000; Zehetner, Bareuther, Henle, and Klostermeyer, 1996
γ -Glutamyl-transferase (EC 2.3.2.2)	1st order $E_a = 457\text{ kJ/mol}$ $z = 4.8^{\circ}\text{C}$ ($Q_{10} = 123$)	Spectrophotometric (γ -glutamyl-p-nitroaniline)	25% of the activity is situated in the cream.	Dos Anjos et al., 1998; Zehetner et al., 1995
α -Lactalbumin	1st order $z = 34.9^{\circ}\text{C}$ $E_a = 89.1\text{ kJ/mol}$	HPLC		Pompei and Rossi, 1994; Morales et al., 2000
β -Lactoglobulin	1st order $D_{75^{\circ}\text{C}} = 49.9\text{ min}$; $z_1 = 7.9^{\circ}\text{C}$ $D_{90^{\circ}\text{C}} = 3.5\text{ min}$; $z_2 = 24.2^{\circ}\text{C}$	HPLC	Shows a marked change in temperature dependence at $\pm 83^{\circ}\text{C}$.	Claeys et al., 2001a
Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7)	1st order $D_{71^{\circ}\text{C}} = 38.6\text{ min}$ $z = 4.3^{\circ}\text{C}$	Spectrophotometric (ABTS and H_2O_2)		Claeys et al., 2001a
Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34)	1st order $D_{70^{\circ}\text{C}} = 20\text{s}$ $Q_{10} = 13$			Walstra et al., 1999
α -Mannosidase (EC 3.2.1.24)	1st order $E_a = 554\text{ kJ/mol}$	Spectrophotometric (p-nitrophenyl- α -D-mannoside)	Hydrolysis of the terminal, non-reducing ends of mannosides	Zehetner et al., 1996
Phosphohexo-isomerase (EC 5.3.1.9)	1st order $E_a = 361\text{ kJ/mol}$		glucose-P $\leftrightarrow$ fructose-P	Zehetner et al., 1996

Tabelle 2.5 Indikatoren zur Beurteilung wärmebehandelter Milch Teil II
[CLAEYS et al., 2002]

	Kinetics	Analysis	Remarks	Ref.
Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1)	1st order $E_a = 490 \text{ kJ/mol}$		Hydrolysis of 5-oligonucleotides.	Zehetner <i>et al.</i> , 1996
Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	1st order $D_{80^\circ\text{C}} = 345\text{s}$ $Q_{10} = 150$			Walstra <i>et al.</i> , 1999
Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22)	1st order $D_{80^\circ\text{C}} = 17\text{s}$ $z = 6.75^\circ\text{C}$ ($Q_{10} = 46$)	Assay based on the oxidation of vanillin	- Activity in raw milk varies - Activated by heating between 60 and 70°C - Milk contains activators and inhibitors of xanthine oxidase	Griffiths, 1986; Zehetner <i>et al.</i> , 1996
Type II indicators				
Epilactose	1st order $E_a = 131.3 \text{ kJ/mol}$	GC	Formation $\approx 10\%$ (lactulose formation)	Calvo and Olano, 1989; Olano and Calvo, 1989
Furosine	Pseudo-0 order $k_{110^\circ\text{C}} = 12.1 \text{ mg /}$ 100 g prot, min $E_a = 83.5 \text{ kJ/mol}$	HPLC	Formed through acid hydrolysis of lactulosyl-lysine	Claeys <i>et al.</i> , 2001b
Hydroxymethylfurfural	Pseudo-0 order $k_{110^\circ\text{C}} = 0.8 \text{ } \mu\text{mol/l,}$ min $E_a = 105.6 \text{ kJ/mol}$	- Spectrophotometric (thiobarbituric acid) - HPLC		Claeys <i>et al.</i> , 2001b
Lactulose	Pseudo-0 order $k_{110^\circ\text{C}} = 30.9 \text{ mg/l,}$ min $E_a = 105.6 \text{ kJ/mol}$	- GC - Spectrophotometric (D-glucose/D-fructose enzymatic kit)	Formed by isomerization of lactose	Claeys <i>et al.</i> , 2001b
N6-Methyl adenosine	1st order $E_a = 125 \text{ kJ/mol}$ $z = 30.5^\circ\text{C}$ ($Q_{10} = 2.13$)	HPLC	Formed from 1-methyladenosine by Dimroth-rearrangement.	Schlimme <i>et al.</i> , 1994

2.10.1 Typ I der Hitzeindikatoren

Inaktivierung von Enzymen

In der Milch sind viele verschiedene Enzyme enthalten. Die thermische Inaktivierung dieser Enzyme verläuft unterschiedlich und ermöglicht daher eine Differenzierung der angewandten Erhitzung. Im Anschluss werden einige dieser Enzyme erläutert.

Fukosidase

Die Fukosidase dient zum Nachweis der Thermisierung und wird bei Temperaturen von 55 °C bis 65 °C inaktiviert [TÖPEL, 2004].

N-Acetyl- β -Glucosaminidase

N-Acetyl- β -Glucosaminidase wird bei Temperaturen von 65 °C bis 75 °C inaktiviert und dient zum Nachweis der Thermisierung. Die analytische Ermittlung erfolgt mittels Aktivitätsbestimmung [TÖPEL, 2004].

Adenosindesaminase

Die Adenosindesaminase spaltet die Aminogruppe von Adenosin ab, es entsteht Inosin. Über die Inosin-Gehaltszunahme kann die Enzymaktivität der Adenosindesaminase bestimmt werden. Es kann zwischen hoch- und kurzzeiterhitzter Milch unterschieden werden, die Inaktivierung erfolgt bei 82 °C bis 90 °C [MARTIN, 2004; TÖPEL, 2004].

Alkalische Phosphatase (ALP)

Die ALP konnte erstmals 1925 von DEMUTH in Rohmilch nachgewiesen werden. Sie wird bei einer ordnungsgemäßen Pasteurisation inaktiviert. Der Nachweis der ALP erfolgt spektrometrisch oder fluorometrisch (Aktivitätsbestimmung nach IDF, DIN, ISO). Wird die ALP in Milch nachgewiesen, so wurde entweder die Pasteurisierung nicht ordnungsgemäß durchgeführt oder es handelt sich um Rohmilch [TÖPEL, 2004].

 γ -Glutamyltransferase

Es handelt sich bei der γ -Glutamyltransferase um ein relativ hitzestabiles Enzym, das als Hitzeindikator für den Bereich von 75 °C bis 80 °C diskutiert wird. Die Aktivität des Enzyms wird bei einer Temperatur bis 72 °C nicht wesentlich beeinflusst. Erhöht man die Temperatur auf 75 °C, so sind noch 80% der Aktivität vorhanden. Bei 85 °C wird die γ -Glutamyltransferase inaktiviert [TÖPEL, 2004].

Lactoperoxidase (LPO)

Das Enzym Lactoperoxidase ist ein Glykoprotein (Kohlenhydratanteil 10%) und dient als Indikator für eine ordnungsgemäße Pasteurisation von Konsummilch (Peroxidase positiv) und Rahm (Peroxidase negativ). Weiters gibt das Enzym bei einer Erhöhung einen Hinweis auf eine Mastitisinfektion. Die Peroxidase wird nach 10 Sekunden bei einer Temperatur von 85 °C inaktiviert. Die analytische Ermittlung der LPO erfolgt

mittels Aktivitätsbestimmung nach § 35 LMBG mit Traventol, p-Phenylendiamin [TÖPEL, 2004].

Denaturierung von Molkenproteinen

Das Molkenprotein α -Lactalbumin ist am hitzestabilsten, danach folgt das β -Lactoglobulin und das Rinderserumalbumin. Am hitzelabilsten sind die Immunoglobuline.

β -Lactoglobulin (β -Lg)

β -Lactoglobulin ist mengenmäßig gesehen das Hauptmolkenprotein in Milch. Es kann in den genetischen Varianten A, B, C (Jersey Kühen) und D (Montbéliard Kühe) vorkommen. Durch eine Erhitzung kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung des β -Lactoglobulins. Das Molkenprotein wird auch bei einem pH-Wert von mehr als 8,6 und bei hoher Konzentration an Calcium irreversibel denaturiert. Das Molkenprotein liefert einen Richtwert für Erhitzungsprozesse und dient der Unterscheidung zwischen pasteurisierter, ESL-, UHT- und Sterilmilch. Die analytische Ermittlung des nativen β -Lactoglobulins erfolgt mittels RP-HPLC. Der genaue Ablauf der analytischen Untersuchung wird im internationalen IDF Standard (162:1992) beschrieben. Ein Nachweis des nativen β -Lactoglobulins kann auch mittels SDS-PAGE oder nativer PAGE erfolgen. In der Tabelle 2.6 sind einige β -Lactoglobulinwerte bei unterschiedlichen Hitzebelastungen zusammengefasst. Für ESL-Milch gibt es bis jetzt noch keine gesetzliche Definition. In der Literatur ist aber ein Richtwert von > 1800 mg β -Lg/l zu finden [DYCK, 2004; HAVEA et al., 2001; TÖPEL, 2004].

Tabelle 2.6 Gehalt an β -Lactoglobulin bei unterschiedlichen Hitzebelastungen [GALMANN et al., 2001]

Produkt	β-Lactoglobulin [mg/l]
Pasteurisierte Milch	3100
ESL-Milch (MF)	2500
UHT Milch, direkt erhitzt	700
UHT Milch, indirekt erhitzt	150

Anhand des β -Lactoglobulingehaltes kann im Falle von ESL-Milch festgestellt werden, ob ein direktes oder indirektes Verfahren angewandt wurde. Abbildung 2.8 zeigt den Unterschied der beiden Verfahren [EBERHARD et al., 2003].

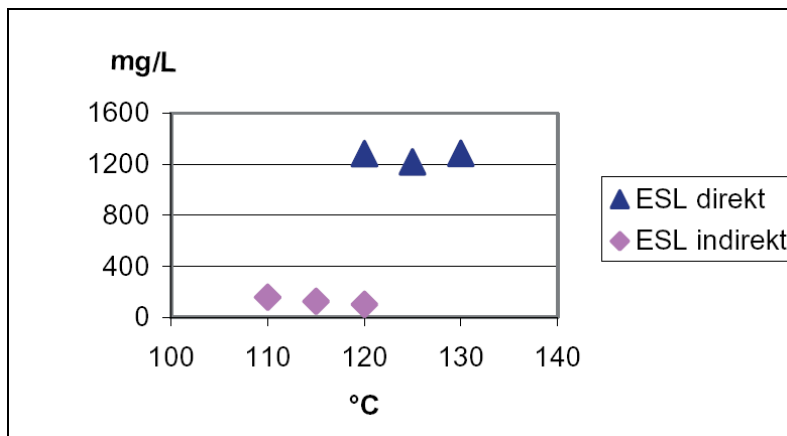


Abbildung 2.8 β -Lactoglobulin [mg/l] in direkt und indirekt erhitzter hochpasteurisierter ESL-Milch [EBERHARD et al., 2003]

α -Lactalbumin (α -La)

Der α -Lactalbumingehalt beträgt ca. 20% der Molkenproteine. Es wird bei 72 °C denaturiert. Man kann anhand des α -Lactalbumingehaltes pasteurisierte Milch von UHT-Milch unterscheiden. Die analytische Ermittlung erfolgt mittels Immunoelktrophorese, ELISA oder HPLC. Der α -Lactalbumingehalt in ESL-Milch beträgt bei indirektem und direktem Verfahren ca. 450-550mg/l. Wird eine Mikrofiltration angewendet, ist ein α -Lactalbumingehalt von ca. 700-800 mg/l zu erwarten [TÖPEL, 2004].

Serumalbumin

Die analytische Ermittlung erfolgt mittels Elektroimmunodiffusion oder mittels HPLC. Es kann zwischen roher, pasteurisierter und UHT-Milch unterschieden werden [TÖPEL, 2004].

Immunoglobuline

Immunoglobuline werden mittels HPLC analysiert. Sie sind hitzeempfindliche Proteine, die Denaturierung beginnt bereits ab 70 °C. Man kann zwischen pasteurisierter, UHT- und Sterilmilch unterscheiden [TÖPEL, 2004].

2.10.2 Typ II der Hitzeindikatoren

Bildung von chemischen Verbindungen

Lactulose

Lactulose ist in Rohmilch nicht vorhanden. Sie wird erst durch die Erhitzung als Isomerisierungsprodukt der Lactose gebildet. Lactulose kann enzymatisch oder mittels HPLC bestimmt werden. Die Lactulosekonzentration ermöglicht die Unterscheidung zwischen UHT-Milch (100 bis 500 mg/kg) und Sterilmilch (600 bis 1400 mg/kg) [TÖPEL, 2004].

5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

Das Maillardprodukt HMF unterliegt in Rohmilch großen Schwankungen. Wird es zur Beurteilung des Erhitzungsverfahrens herangezogen, so muss der HMF-Gehalt der Rohmilch bekannt sein. Die analytische Ermittlung kann enzymatisch oder spektrometrisch erfolgen. In der Tabelle 2.7 ist der HMF-Gehalt in Konsummilch zusammengefasst [TÖPEL, 2004].

Tabelle 2.7 HMF-Gehalt in der Milch [TÖPEL, 2004]

Produkt	5-Hydroxymethylfurfural [µmol/l]
Rohmilch	2-9
Pasteurisierte Milch	6-8
UHT-Milch	100-500
Sterilisierte Milch	600-1400

Furosin

Furosin entsteht bei der Salzsäurehydrolyse des Zwischenproduktes Lactuloselysin, einem frühen Produkt der Maillard-Reaktion. Der Nachweis von Furosin in Milchprodukten erfolgt mittels einer Ionenpaar-RP-HPLC. Das Hydrolysat wird zuvor an einer C₁₈-Phase gereinigt. Die UV-Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der genaue Ablauf der analytischen Untersuchung wird im internationalen Standard (ISO 18329) zusammengefasst.

Weiters kann die Analyse mittels Gaschromatographie erfolgen. Diese erwies sich aber für Routineanalysen als ungeeignet [KRAUSE, 2005].

Der Furosingehalt steht in Korrelation zum Lactulosegehalt. Große Abweichungen vom Lactulose-Furosin-Verhältnis deuten auf den Einsatz rekonstituierter Milch hin. Furosin ermöglicht den Nachweis von pasteurisierter und rekonstituierter Milch in LPO-positiver Milch [TÖPEL, 2004].

Der Furosingehalt wird in mg/100 g Protein angegeben, daher muss von jeder Probe der Proteingehalt (z. B. nach der Methode von Kjeldahl) ermittelt werden. Die Tabelle 2.8 zeigt eine Zusammenfassung des Furosingehaltes einiger wichtiger Herstellungsverfahren. Der Richtwert für ESL-Milch liegt bei 12 mg/100 g Protein [DYCK, 2004].

Tabelle 2.8 Furosingehalt in Milch [KRAUSE, 2005]

Produkt	Furosingehalt [mg /100 g Protein]
Rohmilch	4-7
Pasteurisierte Milch	5-8
UHT Milch, direkt erhitzt	30-110
UHT Milch, indirekt erhitzt	110-240
Sprühmilchpulver	> 50
Walzenmilchpulver	> 300

6-Methyladenosin

Der Nachweis von 6-Methyladenosin erfolgt mittels HPLC. Es kann zwischen hoch- und kurzzeiterhitzter Milch unterschieden werden [TÖPEL, 2004].

2.11 Maillard-Reaktion

Die nichtenzymatische Bräunung wird als Maillard-Reaktion bezeichnet (nach dem Entdecker Louis Camille Maillard, 1912). Sie ist eine chemische Reaktion, die bei höheren Temperaturen, niedrigem Wassergehalt oder längerer Lagerung zwischen Zuckern und Proteinen abläuft. Beim Braten und Backen ist diese Reaktion erwünscht, da die gebildeten Substanzen für den typischen Geschmack und das Aroma verantwortlich sind. Allerdings wirken einige dieser Substanzen *in vitro* toxisch [MULSOW B, 2008; EBERMANN und ELMADFA, 2008].

Die Maillard-Reaktion ist in Milch unerwünscht, man kann sie aber bei der Be- und Verarbeitung kaum verhindern. Die Reaktion benötigt nur minimale Aktivierungsenergie. Es reicht bereits Raumtemperatur, um sie auszulösen. Die Aldehydgruppe am Glucoseteil der Lactose reagiert vor allem mit den ε -Aminogruppen des Lysins zu einer Schiffsbasis. Danach wird durch eine Amadori-Umlagerung ein proteingebundenes Lactuloselysin gebildet. Im weiteren Reaktionsverlauf wird das Lactuloselysin zu einem 1,2-Enaminol oder 2,3-Endiol. Diese Reaktion ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Das 1,2-Enaminol wird nach einer mehrstufigen Reaktion zu HMF und reagiert zu den braunen Melanoidinen. 2,3-Enol bildet Maltol, Hydroxyaceton und C-methylierte Reduktone, die ebenfalls zu Melanoidinen reagieren [TÖPEL, 2004].

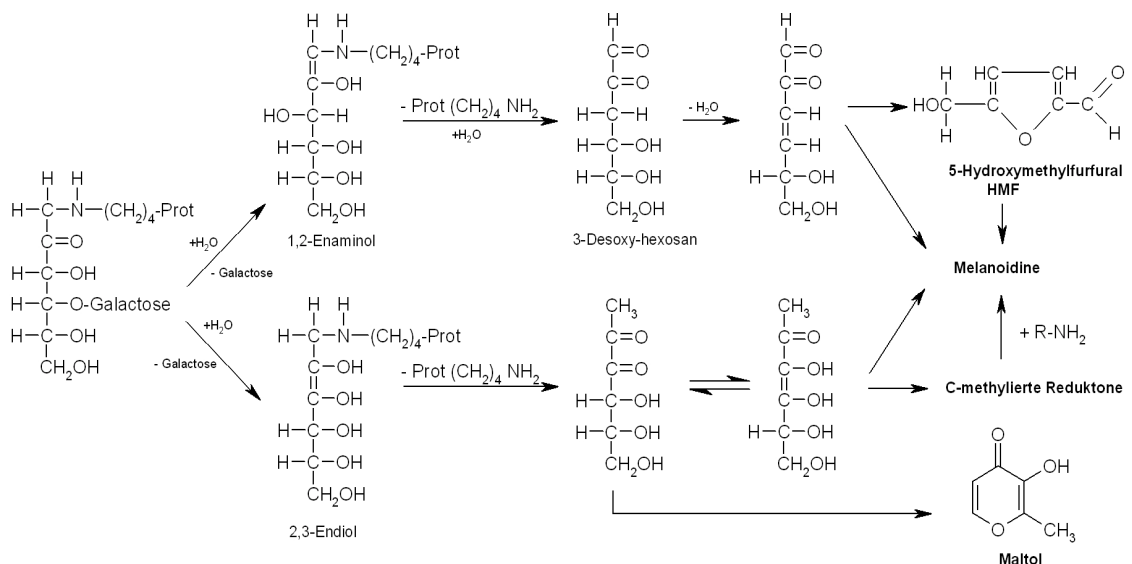


Abbildung 2.9 Bildung von Melanoidinen [TÖPEL, 2004]

Furosin ist ein Indikator für die frühe Maillard-Reaktion. Der Indikator wird durch die Säurehydrolyse (Abbildung 2.10) des Lactuloselysins gebildet. Ein weiteres Produkt der Salzsäurehydrolyse ist das Pyridosin. Ebenso kann auch die Rückbildung des Lysins beobachtet werden [KRAUSE, 2005; MULSOW, 2008].

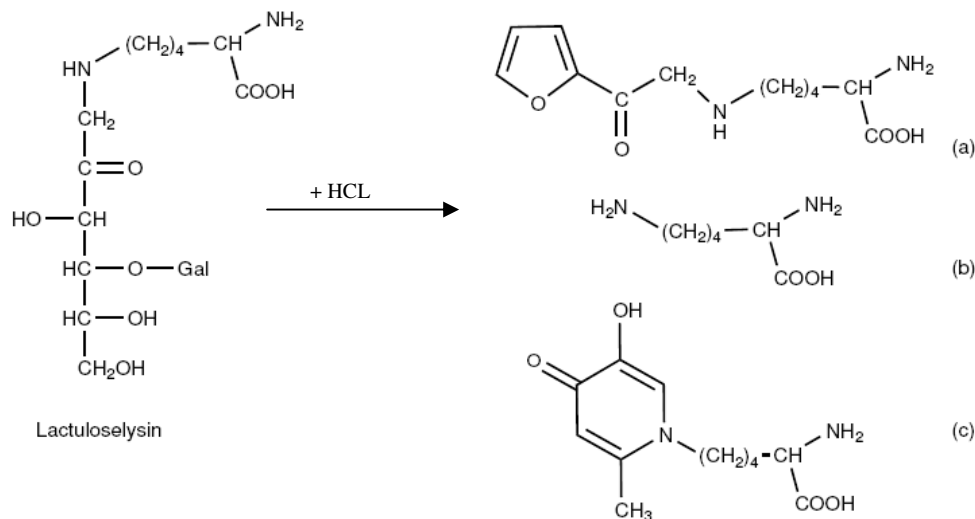


Abbildung 2.10 Produkte der Säurehydrolyse von Lactuloselysin: Furosin (a), Lysin (b), Pyridosin (c) [MULSOW, 2008]

Durch die Bestimmung von Furosin, Pyridosin, HMF, Maltol und optisch über den Bräunungsgrad oder durch Fluoreszenzmessung kann das Ausmaß der nicht-enzymatischen Bräunung festgestellt werden.

Durch die Veränderung der essentiellen Aminosäure Lysin kommt es zur Verringerung des ernährungsphysiologischen Werts. Die Maillard-Reaktion führt in hocherhitzten Milchprodukten zu Farbänderungen (braun gefärbten Melanoiden) und negativen (brandigen) Geschmacksveränderungen [TÖPEL, 2004].

2.12 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ermöglicht die Trennung von Stoffen aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens zwischen mobiler und stationärer Phase. Die Abbildung 2.11 zeigt den allgemeinen Geräteaufbau einer HPLC.

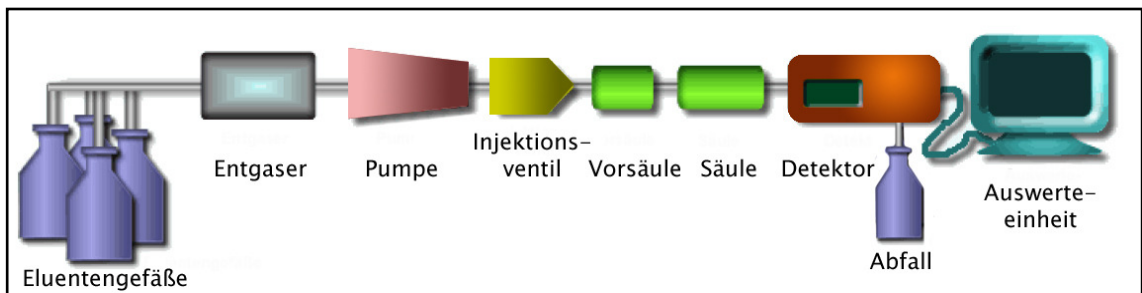


Abbildung 2.11 Prinzip des Ablaufs einer HPLC [MÜLLER, 2006]

2.12.1 Mobile Phase

Die mobile Phase kann Wasser, organische Lösungsmittel oder Puffer enthalten. Die Lösungsmittel (Eluenten) können in reiner Form oder in Mischungen eingesetzt sein. Es ist wichtig, die gelöste Luft im Lösungsmittel zu entfernen, da diese den gleichmäßigen Fluss des Lösungsmittels stören. Die Luftblasen sammeln sich in der Pumpe oder im Detektor und sind häufig die Ursache von Geisterpeaks. Weiters können die Luftblasen das Rauschen im Detektor verstärken. Daher wird das Lösungsmittel mit Helium entgast [MÜLLER, 2006; LINDSAY, 1996].

2.12.2 Pumpe

Die Pumpe dient dazu, die Eluenten mit einem gleich bleibenden Fluss durch die Säule zu befördern.

2.12.3 Injektor

Eine herkömmliche HPLC benötigt für die Probenaufgabe Schutzventile. Es wird sehr häufig ein Rheodyne 7125-Ventil verwendet. Die Probe wird bei Atmosphärendruck mit einer Mikroliterspritze (z. B. Hamilton) in die Nadelführung injiziert. Die Probe gelangt in die Probenschleife. Das Ventil wird von der „Load“- auf die „Inject“-Position gedreht. Dadurch wird die Probenschleife mit Hochdruckstrom der mobilen Phase

verbunden und die Probe auf die Säule gebracht. Das Ventil bleibt für ca. 1 Minute auf der „Inject“-Position, wodurch die Probenschleife mit der mobilen Phase gespült wird [LINDSAY, 1996].

2.12.4 Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie

Die Art der Anlagerung (Adsorption) von Stoffen an der Oberfläche der stationären Phase (HPLC-Säule) wird mit den Begriffen Normalphase und Umkehrphase (Reverse Phase) beschrieben.

Ist die Polarität der stationären Phase höher als die der mobilen Phase, spricht man von einer Normalphase (z. B. bei einer Kieselgel-Säule). Hexan, Heptan, Methylenchlorid und Essigester sind Eluenten für die NP-Chromatographie.

Bei der Reverse Phase ist die Polarität der stationären Phase geringer als die der mobilen Phase. Die Eluenten für die RP-Chromatographie sind Methanol, Acetonitril und Wasser. Die Elutionskraft ist umso höher, je mehr organische Lösungsmittel im Verhältnis zum Wasser vorhanden sind [MÜLLER, 2006; LINDSAY, 1996].

2.12.5 Detektor

Mit Hilfe eines Detektors (z. B. UV/Vis-Detektor oder RI-Detektor) können die analytischen Informationen der chromatographischen Trennung in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Das elektrische Signal ist von der Probe im Laufmittelstrom abhängig. Die in der Säule ermittelten Substanzen werden in einem Chromatogramm in Form von Peaks visualisiert [MÜLLER, 2006].

3. Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Bei den Proben 1 bis 121 handelt es sich um eingefrorene Proben (Universal Container, Sterilin® 30 ml) von vorangegangener Diplomarbeit (MEIER, 2009). Bei den Proben 129, 130, 132, 133, 135, 136 handelt es sich ebenfalls um eingefrorene Proben (1Liter), die restlichen Proben waren gekühlt. Alle Proben sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Probenmaterial

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett
11.03.2008	A faire Milch 00:57608211	18	ESL	3,5
08.04.2008	A faire Milch 0801G 12202	49	ESL	3,5
06.06.2008	A faire Milch 16:50G20161	119	ESL	3,5
25.01.2009	A faire Milch 3022GF 01021F	126	ESL	3,5
14.08.2008	Almsana 8157 05:17	90	UHT	0,5
28.07.2008	Almsana 8134 00:24	89	UHT	3,5
13.05.2008	Berchtesgaden	106	Past	1,5
12.05.2008	Berchtesgaden Demmree.	105	Past.	1,5
13.05.2008	Berchtesgaden Bio Frische Alpenmilch	107	Past.	3,8
21.05.2008	BesteBio	102	ESL	3,5
23.04.2008	BesteBio L610005:23	57	ESL	3,5
02.05.2008	Bio + L080097	86	ESL	3,5
13.12.2007	BioBio L0633408:3	7.1	ESL	3,5
13.03.2008	BioBio L5058/1246	11	ESL	3,5
25.04.2008	BioBio L510117:08	52	ESL	3,5
10.12.2007	BionesBio L1.2 17:35/325	7.2	ESL	3,5
29.01.2009	BionesBio L1.1/008/21:25	127	ESL	3,5
20.08.2008	Breisgau lactosefrei 02:52	97	UHT	3,5
22.07.2008	Breisgau lactosefrei 09:52	67	UHT	3,5
11.12.2007	Clever	9	Past.	3,5
09.04.2008	Clever L610205:14	45	Past.	3,5

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett
15.03.2008	Clever L232011:38	48	UHT	0,5
02.05.2008	Demeterhof	100	RM	Nat.
04.04.2008	Demeterhof	47	RM	Nat.
11.04.2008	Demeterhof AT-0-01-BIO	62	RM	Nat.
29.11.2007	Die leichte Muh 11:32 mehr EW, Ca	26	ESL	0,7
10.05.2008	Die leichte Muh 08:30 376L1	50	ESL	0,7
21.06.2008	Die leichte Muh 06:05 888L1	98	ESL	0,7
31.03.2008	Echt Bio 11:52	35	Past.	3,5
09.05.2008	Echt Bio 06:56	104	Past.	3,5
17.05.2008	Gmundner Milch 7465 02:16	38	UHT	1,5
11.01.2009	Goldfuss	125	RM	Nat.
26.12.2007	Himmeltau Kinder 17:56 031L1	17	ESL	3,8
07.05.2008	Himmeltau Kinder 15:33 816L1	42	ESL	3,8
11.06.2008	Himmeltau Kinder 08:24 166L1	81	ESL	3,8
10.12.2007	Ja Natürlich Kinder Frischmilch	55	Past.	3,8
29.02.2008	Ja Natürlich Extra Vollmilch	14	Past.	4,5
05.12.2007	Ja Natürlich L1 16:50	2	ESL	1,0
15.03.2008	Ja Natürlich L1 07:29	12	ESL	1,0
25.04.2008	Ja Natürlich L1 14:20	44	ESL	1,0
07.06.2008	Ja Natürlich L1 10:06	110	ESL	1,0
08.01.2009	Ja Natürlich L1 12:53	135	ESL	1,0
25.01.2009	Ja Natürlich L1 12:40	136	ESL	1,0
25.01.2009	Ja Natürlich L1 16:38	137	ESL	1,0
16.03.2008	Ja Natürlich L1 13:38	13	ESL	3,5
02.06.2008	Ja Natürlich L1 20:25	112	ESL	3,6
18.01.2009	Ja Natürlich L1 15:58	122	ESL	3,6
09.01.2009	Ja Natürlich L1 14:17	132	ESL	3,6
26.01.2009	Ja Natürlich L1 09:46	133	ESL	3,6
08.02.2009	Ja Natürlich L1 08:50	134	ESL	3,6
10.12.2007	Ja Natürlich L1 12:17	54	Past.	1,6
16.05.2008	Ja Natürlich L1 09:00	111	Past.	1,6

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett
19.12.2008	Ja Natürlich frische VM L2 16:34	129	Past.	3,6
11.01.2009	Ja Natürlich frische VM L1 12:32	130	Past.	3,6
19.01.2009	Ja Natürlich frische VM L2 16:00	131	Past.	3,6
23.05.2008	Ja Natürlich Kinder Frischmilch L2	115	Past.	Nat.
12.04.2008	Lembacher Bio Frischmilch	58	Past.	3,5
06.06.2008	Maresi	66	UHT	3,8
23.03.2008	Maresi L66991	39	UHT	0,1
13.04.2008	Melktaler AT-No1 Bio 0166-31M-N-23	59	RM	3,6
11.05.2008	Melktaler	101	RM	3,6
20.12.2007	Milbona 01:42	21	ESL	1,5
06.05.2008	Milbona 22:37	93	Past.	3,5
13.12.2008	Milchkanne L63340659	15	ESL	1,5
16.04.2008	Milchkanne L509211:21	34	ESL	1,5
16.05.2008	Milchkanne L51222 0:34	84.2	ESL	1,5
03.06.2008	Milchkanne L614022:33	109	ESL	1,5
31.03.2008	Milchkanne 6604220:03	33	Past.	3,5
29.04.2008	Milchkanne L6123 06:15	84.3	Past.	3,5
14.06.2008	Minus L lactosefrei RWM023:25	43	UHT	1,5
14.12.2007	Natur aktiv Bio 2023447232	1	ESL	3,5
18.03.2008	NÖM Schulmilch	24	ESL	1,8
26.03.2008	NÖM Guten Morgen	25	ESL	1,8
23.04.2008	NÖM 210615:01	60	ESL	3,5
17.03.2008	NÖM fasten 20620813	19	ESL	0,9
06.05.2008	NÖM fasten 211306:06	76	ESL	0,9
20.02.2008	NÖM 333317:16	3	ESL	1,5
03.12.2007	NÖM 232309:19	23	ESL	1,5
01.05.2008	NÖM 200715:11	72	ESL	1,5
02.02.2009	NÖM 3018 10:58	124	ESL	1,5
04.12.2007	NÖM Guten Morgen 132400:57	4	ESL	1,8
08.05.2008	NÖM Schulmilch 411022:45	77	ESL	1,8
07.05.2008	NÖM Guten Morgen 311318:32	83	ESL	1,8

MHD	Name	Probe	Milchart	% Fett
30.11.2007	NÖM 232003:33	6	ESL	3,5
09.12.2007	NÖM 232623:59	22	ESL	3,5
27.04.2008	NÖM 191111:40	71	ESL	3,5
07.05.2008	NÖM original Waldviertler 611419:19	79	ESL	3,5
16.05.2008	NÖM 16.05.813	108	Past.	3,5
18.04.2008	NÖM lactosefrei 209503:32	41	UHT	1,8
13.12.2007	Schärdinger Die schlanke Linie	31	ESL	0,1
25.04.2008	Schärdinger Die schlanke Linie 25AT02217	51	ESL	0,1
14.08.2008	Schärdinger L4.1/114/14:03	92	ESL	3,5
09.05.2008	Schärdinger L4.2/109/05:49	94	ESL	3,5
19.05.2008	Schärdinger L4.2/119/ 05:25	95	ESL	3,5
09.05.2008	Schärdinger L4.2/109/02:58	96	ESL	3,5
02.03.2008	Schärdinger Formil 09:49 0311	8	UHT	0,5
28.05.2008	Schärdinger Formil 030105:5922	36	UHT	0,5
15.07.2008	Schärdinger Formil 027/0005 L2	117	UHT	0,5
14.07.2008	Schärdinger Formil 031/19:06L	75	UHT	3,5
16.03.2008	Spar Natur pur Bio	28	ESL	3,5
17.03.2008	Spar lactosefrei L080052	20	ESL	1,5
26.04.2008	Spar L08009161/D/02014	61	ESL	1,5
10.05.2008	Spar lactosefrei L080005	82	ESL	1,5
04.05.2008	Spar Natur pur Bio L080099	73	ESL	3,5
27.04.2008	Spar L4.1/108/06:22	84.1	Past.	3,5
09.05.2008	Spar L4./920/01:57	99	Past.	3,5
31.05.2008	Spar mit pur Bio10:52	118	Past.	3,5
22.04.2008	Spar L081104/03	80	Past.	1,8
11.12.2007	Spar L4.1 02:36/334	56	Past.	3,5
10.07.2008	Spar 072 17:39 L1	68	UHT	0,5
09.12.2007	Spar Natur pur Bio L07310	16	ESL	3,5
11.01.2009	Stadler Raxendorf 27	123	RM	Nat.
06.05.2008	Stainzer TM Mi 08:58	88	ESL	0,5
10.05.2008	Stainzer 10:39	87	ESL	3,5

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett
07.06.2008	Täglich Waldviertler	121	Past.	3,5
21.04.2008	Täglich Waldviertler	78	Past.	3,5
23.05.2008	Täglich Waldviertler	116	Past.	3,5
17.04.2008	Tiroler MT10 AF20	69	Past.	3,5
06.06.2008	Tiroler	120	Past.	3,5
12.05.2008	Tiroler VM BT11AG	113	Past.	3,5
22.05.2008	Tiroler VM BT11	114	Past.	3,5
02.04.2008	Viva vital	10	ESL	0,1
20.06.2008	Viva vital	91	ESL	0,1
01.04.2008	Viva vital lactosefrei 14:19	37	UHT	1,5
03.05.2008	Waldviertler 2110 16:55	74	ESL	3,5
27.05.2008	Waldviertler 113302:47	103	ESL	3,5
28.04.2008	Zillertaler 28.04.08 1	85	Past.	3,6

3.2 Bestimmung von Furosin als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC

3.2.1 Material und Herstellung von Lösungen

Chromatographisches System:

UV/Vis Detector, Waters 2489

Pumpe, Waters 600E Multisolvent Delivery System

Bus SAT/IN Module, Waters

Injektor, Rheodyne 7725i

HPLC Säule, Symmetry 300 TM C₁₈ 3,5 µm (2,1x150 mm)

Inline Filter

Helium, Linde, 5.0

Filter, Satorius stedim biotech Minisart RC 4 (0,2 µm)

Einwegspritzen, BRAUN Injekt® 2 ml

Injektionsspritze, Hamilton 702 (25 µl)

Software, Millennium³²

Reagenzien:

HCl 37% rauchend, ROTH®

Stickstoff, Linde, 5.0

Methanol, ROTH® ROTISOLV® HPLC Gradient Grade Art.-Nr.P717.1

Acetonitril, ROTH® ROTISOLV® HPLC Gradient Grade 99,9% Art.-Nr.8825.2

Ameisensäure, ROTH® ROTISOLV® ≥98% Art.-Nr.4724.2

Sodium 1-heptane-sulfonate C₇H₁₅O₃S Na SIGMA H2766 (Mr: 202,24697 g)

Herstellung von Lösungen:

10,6 M HCl:

Ein Teil UHQ-Wasser mit acht Teilen der rauchenden 37%igen HCl mischen.

8 M HCl:

Einen Teil UHQ-Wasser mit zwei Teilen der rauchenden 37%igen HCl mischen.

3 M HCl:

Drei Teile UHQ-Wasser mit einem Teil der rauchenden 37%igen HCl mischen.

Anmerkung: die Säure nach dem Wasser hinzugeben

50 mM Heptansulfonsäure:

Es werden 2,0224 g Sodium 1-heptane-sulfonate ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_3\text{S Na}$) in einen 200 ml Messkolben eingewogen. Anschließend wird der Messkolben mit UHQ-Wasser bis zur Markierung befüllt.

Laufmittel A (5 mM Heptasulfonsäure, + 0,2% (v/v) Ameisensäure):

50 ml der 50 mM Heptansulfonsäure und ca. 100 ml UHQ-Wasser werden in einen 500 ml Messkolben vorgelegt. Danach wird 1 ml Ameisensäure (100%ig) dazupipettiert und mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Im Anschluss wird das Laufmittel durch die Millipore Filteranlage filtriert.

Laufmittel B (nur für Spülschritt im Vorversuch II)

(5 mM Heptansulfonsäure, + 80% (v/v) Acetonitril, + 0,2% (v/v) Ameisensäure):

160 g (200 ml) Acetonitril werden in einen 250 ml Messkolben eingewogen und 25 ml 50 mM Heptasnsulfonsäure werden dazupipettiert. Danach werden 0,5 ml Ameisensäure (100%ig) hinzugefügt und mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Im Anschluss wird das Laufmittel durch die Millipore Filteranlage filtriert.

Laufmittel B (für optimierte, endgültige Methode): 100% Acetonitril**Laufmittel D (20% Acetonitril):**

Es werden 100 ml Acetonitril mit 400 ml UHQ-Wasser gemischt und durch die Millipore Filteranlage filtriert.

Verdünnlösung (UHQ-Wasser, + 5% (v/v) Acetonitril, + 0,2% (v/v) Ameisensäure):

In einen 10 ml Messkolben werden ca. 5 ml UHQ-Wasser vorgelegt. Im Anschluss werden 0,5 ml Acetonitril und 20 μl Ameisensäure zupipettiert. Danach wird mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Anmerkung: Bei dem Kontakt mit Säuren, zersetzt sich Acetonitril. Daher muss die Verdünnlösung täglich frisch hergestellt werden.

Weitere Geräte und Hilfsmittel:

Wasserbad, LHG W16

Glasgefäße pyrolisiert

Pyrex-Röhrchen, Bibby

Magnetrührer, MINI MR Standard, IKA® - WERKE

Universal Container 30 ml, Sterilin®

Bijou Container 7 ml, Sterilin®

VORTEX – GENIE Patent 3.061.280

Trockenschrank, Statvis Gossen Pantatherm D

Faltenfilter, Whatman® 595 ½ Ø 150 mm Ref. No.10311645

Waters Sep-Pak® Vac 3cc (500 mg) C₁₈ Cartridges Part No WAT020805

Assistent Reagenzgläser 6-6,5 mm Ø No2775/0

Reaktionsgefäß mit Verschluss für Pico Tag, SunChrom GmbH Bestell-Nr.715-1163

Pico Tag Workstation, Waters PTS 3142

Pumpe Pico Tag, Model DS5

Tischzentrifuge, Eppendorf, 5415R t 25A, Nr.5426

Saugnutsche Millipore

Saugnutsche Satorius

Millipore LR37697

Laufmittelfilter, MAGNA, Nylon, Supported, Plain, 0,22 µm, 47 mm, No.1213769

Laufmittelfilter, Micron Sep, Cellulose, White, Plain, 0,22 µm, 47 mm, No.1214909

Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml

Reaktionsgefäße Multiply® - Pro 0,5 ml Biosphere

Pipette, VWR 10-100 µl

Pipette, VWR 100-1000 µl

Pipettenspitzen 1000 µl, blau, SARSTEDT No 70.762

Messpipette, Brand, W-Germany, Silberbrand Eterna 5 ml

Pechiny Plastic Packaging Parafilm® PM-996

UHQ Wasseraufbereitungsanlage, USF ELGA, Model UHQ-2-MK3

Analysenwaage, AND Electronic Balance FX 300

Analysenwaage, Mettler AE 163

3.2.2 Ablauf der Furosinbestimmung

Probenvorbereitung

Hydrolyse: (23 Stunden)

Die in einem Universal Container (Sterilin® 30 ml) befindende Milchprobe wird für 10 Minuten ins Wasserbad (bei 40 °C) gestellt. Anschließend wird die Milch in ein Becherglas gefüllt und 2 ml unter leichtem Rühren in ein Pyrex-Röhrchen überführt (siehe Abbildung 3.1.a). Danach werden 6 ml HCl (10,6 mol/l) in das Pyrex-Röhrchen pipettiert (Abbildung 3.1.b), das Röhrchen verschlossen und kurz gevortext (Abbildung 3.1.c). Wenn es sich um eine UHT- oder lactosefreie Milch handelt, ist es erforderlich, die Milchprobe zuerst mit UHQ-Wasser zu verdünnen (1:4) und danach die 2 ml Milch mit HCl zu mischen.

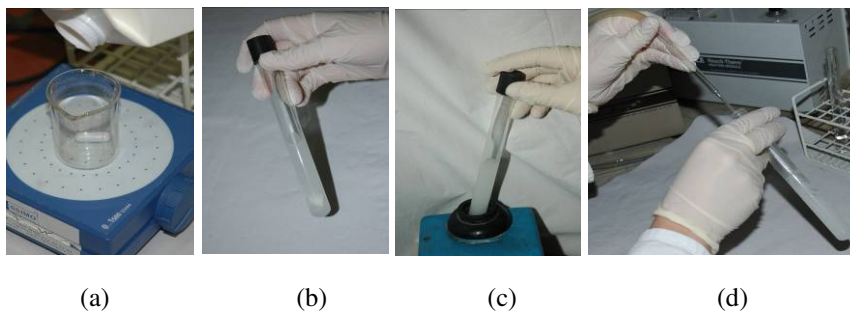


Abbildung 3.1 Hydrolyse I

Zur Entgasung wird die Probe für 2 Minuten mit Stickstoff begast (Abbildung 3.1.d). Danach werden die Pyrex-Röhrchen abgewogen und für 23 Stunden bei 110 °C in den Trockenschrank (nach 1 Stunde vortexen) gestellt (Abbildung 3.2.a, b, c).

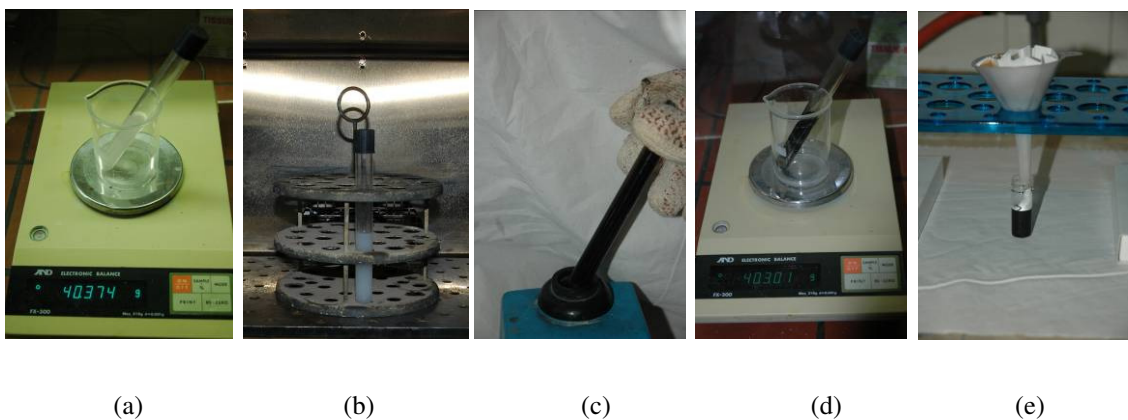


Abbildung 3.2 Hydrolyse II

Nach 23 Stunden wird das Pyrex-Röhrchen aus dem Trockenschrank genommen. Man lässt das Röhrchen für ca. 30 Minuten auskühlen. Anschließend wird das Pyrex-Röhrchen abgewogen (Abbildung 3.2.d) und eventuelle Verluste mit 8 M HCl ausgeglichen. Danach wird die Probe gevortext und durch einen Faltenfilter (595 ½) abfiltriert (Abbildung 3.2.e).

Sep-Pak: (ca. 90-105 Minuten)

Es werden 5 ml Methanol (100%ig) in die Sep-Pak Säule pipettiert (Abbildung 3.3.a) und der Inhalt in einem Becherglas gesammelt - ca. 20-25 Minuten. Anschließend werden 10 ml UHQ-Wasser in die Säule gefüllt und ebenfalls im Becherglas gesammelt - ca. 45 Minuten. Danach werden 0,5 ml Probe in die Säule pipettiert (Abbildung 3.3.b), sobald die Säule aufhört zu tropfen (ca. 5-10 Minuten) wird das Becherglas entfernt. Der Inhalt des Becherglases kann verworfen werden.

Ein kleines Sterilin® (7 ml) wird unter die Säule gestellt (Abbildung 3.3.c). In die Säule werden 3 ml HCl (3 mol/l) pipettiert und die Probentropfen im Sterilin® gesammelt - ca. 20-25 Minuten [DELGADO-ANDRADE et al., 2007; GUERRA-HERNANDEZ und CORZO, 1996; SERRANO et al, 2002; TOKUŞOĞLU et al, 2004].

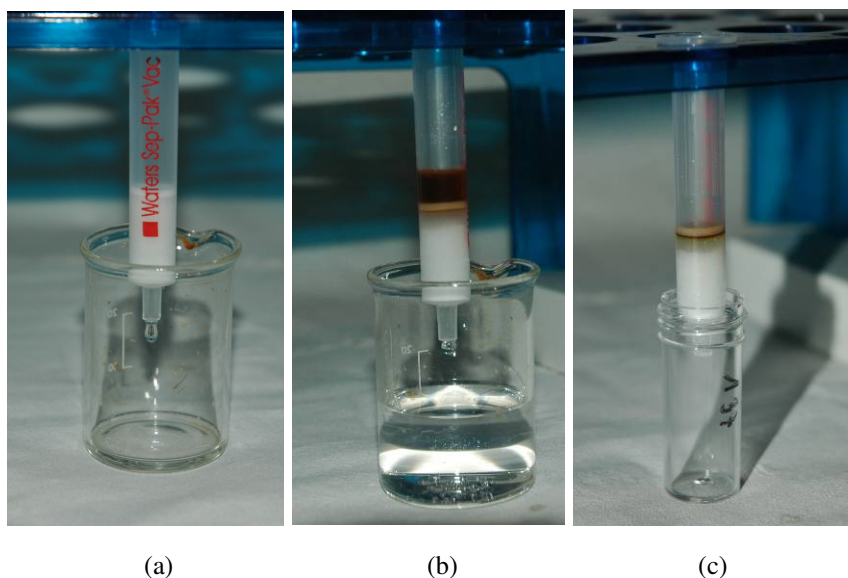


Abbildung 3.3 Aktivieren der Sep-Pak Säulen

Pico-Tag: (ca. 3-4 Stunden)

200 μ l Probe werden in ein Assistent-Reagenzglas (6-6,5 mm $\varnothing$) pipettiert. Das Reagenzglas wird mit einer Pinzette in ein Reaktionsgefäß gestellt und mit einem Verschluss für die Pico Tag verschlossen (Abbildung 3.4.a). Anschließend wird das Reaktionsgefäß in die Pico Tag eingespannt und getrocknet. Es können vier Assistent-Reagenzgläser in ein Reaktionsgefäß gestellt werden, die Eintrocknungszeit beträgt ca. 3-4 Stunden.

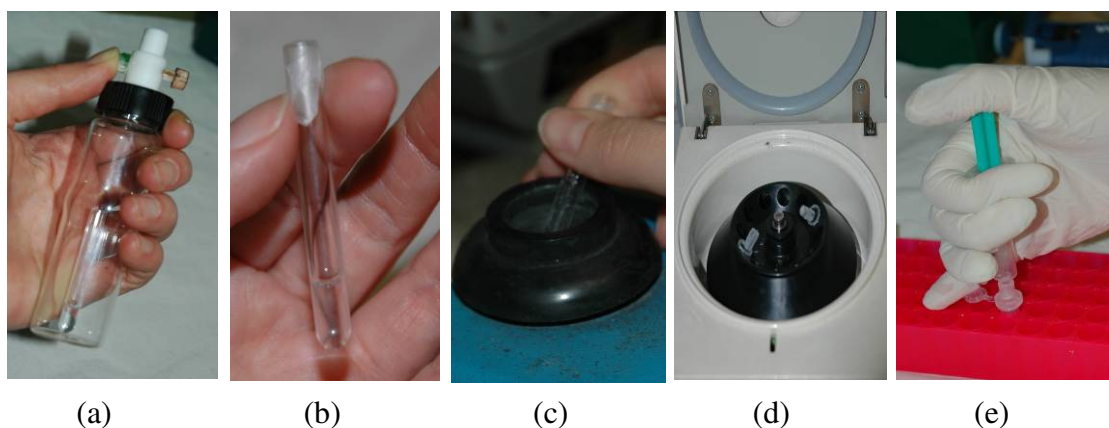


Abbildung 3.4 Eintrocknete Proben in Verdünnlösung

Danach wird die getrocknete Probe in 200 μ l Verdünnlösung (UHQ, + 5% (v/v) ACN, + 0,2% (v/v) Ameisensäure) aufgenommen (Abbildung 3.4.b). Das Assistent-Reagenzglas wird mit einem Parafilm verschlossen und für ca. 10 Sekunden gevortext (Abbildung 3.4.c). Im Anschluss wird die Probe bei 5000 rpm für 10 Sekunden anzentrifugiert (Abbildung 3.4.d) und durch einen 0,2 μ m Filter in ein Eppendorfgefäß überführt (Abbildung 3.4.e).

RP-HPLC: (20 Minuten)

Die Säulentemperatur beträgt 35 °C, der Fluss 0,35 ml/min. Es werden 20 μ l mit einer Hamiltonspritze injiziert, die Probenschleife wird 1 Minute gespült. Nach 20 Minuten kann eine neue Probe injiziert werden.

3.2.3 Laufmittel und Gradienten

Vorversuch I:

Der Vorversuch I wird wie in vorangegangener Diplomarbeit [MEIER, 2009] durchgeführt.

Laufmittel A: 4,878 mM Heptansulfonsäure,

+ 12% (v/v) Acetonitril,

+ 0,2% (v/v) Ameisensäure

Anmerkung: vorgemischtes LM A (mit 12% (v/v) Acetonitril)

Laufmittel C: 100% Acetonitril (Lagerung der Säule ab einer Woche)

Laufmittel D: 20% Acetonitril (Lagerung der Säule über Nacht bzw. Wochenende)

Injektionsvolumen: 20 µl

Laufzeit: 20 Minuten (nächste Injektion erfolgt nach 20 Minuten)

Säulentemperatur: 35°C

Absorption: 280 nm

Trennung: Isokratisch

Tabelle 3.2 Furosin Startgradient [MEIER, 2009]

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
INITIAL	0,0	0	0	0	100	*
20	0,35	0	0	0	100	11
25	0,35	0	0	0	100	6
26	0,35	100	0	0	0	6
56	0,35	100	0	0	0	6
100	0,00	100	0	0	0	11

Tabelle 3.3 Probengradient [MEIER, 2009]

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	100	0	0	0	*
20	0,35	100	0	0	0	6
50	0,00	100	0	0	0	11

Tabelle 3.4 Furosin Endgradient [MEIER, 2009]

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
INITIAL	0,35	100	0	0	0	*
30	0,35	100	0	0	0	6
31	0,35	0	0	0	100	6
75	0,35	0	0	0	100	6
76	0,0	0	0	0	100	11

Anmerkung: Es ergaben sich Probleme in der Retentionszeit, diese führten zu einer Veränderung der Peakform. Daher mussten die Gradienten und Laufmittel neu optimiert werden.

Vorversuch II:**Einführung eines Spülschrittes**

Laufmittel A: 5 mM Heptansulfonsäure,
 +12% (v/v) Acetonitril,
 + 0,2% (v/v) Ameisensäure

Anmerkung: vorgemischtes LM A (mit 12% Acetonitril)

Laufmittel B: 5 mM Heptansulfonsäure,
 + 80% (v/v) Acetonitril,
 + 0,2% (v/v) Ameisensäure

Laufmittel C: 100% Acetonitril (Lagerung der Säule ab einer Woche)

Laufmittel D: 20% Acetonitril (Lagerung der Säule über Nacht bzw. Wochenende)

Injektionsvolumen: 20 µl

Laufzeit: 28 Minuten (nächste Injektion erfolgt nach 40 Minuten)

Säulentemperatur: 35° C

Absorption: 280 nm

Trennung: Isokratisch

Tabelle 3.5 Probengradient (+ Spülschritt FM 1)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	100	0	0	0	*
12	0,35	100	0	0	0	6
13	0,35	20	80	0	0	6
18	0,35	20	80	0	0	6
19	0,35	100	0	0	0	6
29	0,35	100	0	0	0	6
120	0	100	0	0	0	11

Tabelle 3.6 Probengradient (+ Spülschritt FM 2)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	100	0	0	0	*
12	0,35	100	0	0	0	6
13	0,35	40	60	0	0	6
15	0,35	40	60	0	0	6
16	0,35	100	0	0	0	6
26	0,35	100	0	0	0	6
120	0	100	0	0	0	11

Tabelle 3.7 Probengradient (+ Spülschritt FM 3)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	100	0	0	0	*
8	0,35	100	0	0	0	6
9	0,35	50	50	0	0	6
12	0,35	50	50	0	0	6
13	0,35	100	0	0	0	6
28	0,35	100	0	0	0	6
120	0	100	0	0	0	11

Tabelle 3.8 Probengradient (+ Spülschritt FM 4)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	100	0	0	0	*
8	0,35	100	0	0	0	6
9	0,35	0	100	0	0	6
12	0,35	0	100	0	0	6
13	0,35	100	0	0	0	6
28	0,35	100	0	0	0	6
120	0	100	0	0	0	11

Methodenoptimierung:

Laufmittel A: 5 mM Heptansulfonsäure,
0,2% (v/v) Ameisensäure

Laufmittel B: 100% Acetonitril

Laufmittel D: 20% Acetonitril

Anmerkung: Das Laufmittel A besteht nunmehr aus 5 mM Heptansulfonsäure und 0,2% Ameisensäure (ohne Acetonitril).

Durch den Probengradienten wird Laufmittel A mit Laufmittel B (100% Acetonitril) mittels Pumpe auf die gewünschte Zusammensetzung gemischt.

Injektionsvolumen: 20 µl

Laufzeit: 20 Minuten

Säulentemperatur: 35° C

Absorption: 280 nm

Trennung: Isokratisch

Tabelle 3.9 Furosin Startgradient 13 (für Probengradient mit 11% LM B)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
INITIAL	0,00	0	0	0	100	*
20	0,35	0	0	0	100	11
25	0,35	0	0	0	100	6
26	0,35	0	100	0	0	6
45	0,35	0	100	0	0	6
46	0,35	89	11	0	0	6
76	0,35	89	11	0	0	6
160	0,00	89	11	0	0	11

Tabelle 3.10 Probengradient (LM B 12%)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	88	12	0	0	*
20	0,35	88	12	0	0	6
50	0	100	0	0	0	11

Tabelle 3.11 Endgültiger Probengradient (LM B 11%)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	89	11	0	0	*
20	0,35	89	11	0	0	6
50	0	89	11	0	0	11

Tabelle 3.12 Probengradient (LM B 10%)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	90	10	0	0	*
20	0,35	90	10	0	0	6
50	0	100	0	0	0	11

Tabelle 3.13 Furosin Endgradient 14 (für Probengradient mit 11% LM B)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
INITIAL	0,35	89	11	0	0	*
5	0,35	0	100	0	0	6
40	0,35	0	100	0	0	6
45	0,35	0	0	0	100	6
75	0,35	0	0	0	100	6
76	0	0	0	0	100	11

3.2.4 Herstellung der Kalibrationsstandards

Material

HCl 37% rauchend, ROTH®

Acetonitril ROHT® ROTIPURAN® HPLC Gradient Grade 99,9% Art.-Nr.8825.2

Ameisensäure ROHT® ROTIPURAN® ≥98% Art.-Nr.4724.2

Sodium 1-heptane-sulfonate C₇H₁₅O₃S Na SIGMA H2766 (Mr: 202,24697 g)

Furosin Standard, Furosin Dihydrochlorid, 10 mg, Neo MPS (Mr:327,2 g/mol)

Anmerkung: reines Furosin hat eine Mr von 254,28 g/mol

Lösungen

3 M HCl:

Drei Teile UHQ-Wasser mit einen Teil rauchender 37 %iger HCl mischen.

Verdünnlösung (UHQ-Wasser, + 5% (v/v) Acetonitril, + 0,2% (v/v) Ameisensäure):

In einem 100 ml Messkolben werden ca. 50 ml UHQ-Wasser vorgelegt. Im Anschluss werden 5 ml Acetonitril und 200 µl Ameisensäure zupipettiert. Danach wird mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Standardlösungen (SL)

Furosin 2 mmol/l:

In einen 5 ml Messkolben werden 3,40 mg Furosin Dihydrochlorid eingewogen und in 5,196 ml 3 M HCl gelöst ($\triangleq$ 3,27 mg Furosin Dihydrochlorid/5 ml, $\triangleq$ 2,5428 mg Furosin/5 ml).

Anmerkung: In Vorversuchen wurde das Furosin 2 mmol/l in Eppendorf Tubes 2 ml eingefroren.

Furosin 0,1 mmol/l ($\triangleq$ 100 µM):

Es werden ca. 10 ml Verdünnlösung in einen 20 ml Messkolben vorgelegt, danach wird 1 ml Furosin 2 mmol/l zupipettiert und mit Verdünnlösung bis zur Markierung aufgefüllt.

Furosin 8 μ M ($\triangleq$ 8 pmol/ μ l, $\triangleq$ SL VI):

10 ml Verdünnlösung werden in einen 25 ml Messkolben vorgelegt, anschließend werden 2 ml Furosin 0,1 mmol/l hinzugefügt und bis zur Markierung mit Verdünnlösung aufgefüllt.

Ausgehend von der Standardlösung VI werden Standardlösungen II bis V hergestellt. Der Standard I wird ausgehend von Standard III hergestellt (Tabelle 3.14).

Standardlösung V: 500 μ l SL VI werden mit 500 μ l Verdünnlösung vermischt

Standardlösung IV: 250 μ l SL VI mit 750 μ l Verdünnlösung mischen

Standardlösung III: 125 μ l SL VI und 875 μ l Verdünnlösung vermischen

Standardlösung II: 125 μ l SL VI und 1875 μ l Verdünnlösung hinzugeben

Standardlösung I: 250 μ l SL III und 750 ml Verdünnlösung mischen

Jeder Standard wird dreimal injiziert, es handelt sich um eine isokratische Trennung. Die nächste Injektion erfolgt in der 20. Minute, das Injektionsvolumen beträgt 20 μ l.

Tabelle 3.14 Kalibrations-Standardlösung

Standardlösung	Mischungsverhältnis		pmol/ μ l	pmol/20 μ l
I	250 μ l SL III	750 μ l Verdünnlösung	0,25	5
II	125 μ l SL VI	1875 μ l Verdünnlösung	0,5	10
III	125 μ l SL VI	875 μ l Verdünnlösung	1,0	20
IV	250 μ l SL VI	750 μ l Verdünnlösung	2,0	40
V	500 μ l SL VI	500 μ l Verdünnlösung	4,0	80
VI	-	-	8,0	160

3.2.5 Überprüfung der Wiederholbarkeit

Durchführung

Hydrolyse:

Die Hydrolyse (siehe Kapitel 3.2.2) der Milchprobe Nummer 122 wird viermal durchgeführt (Abbildung 3.5)

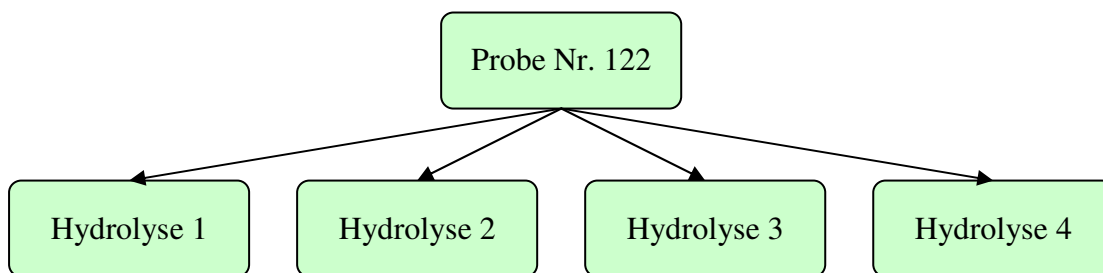


Abbildung 3.5 Probenaufteilung

Nach der Hydrolyse Nr.1 bis 3 wird die Probenaufbereitung wie im Kapitel 3.2.2 durchgeführt und anschließend je zweimal injiziert (siehe Abbildung 3.6).

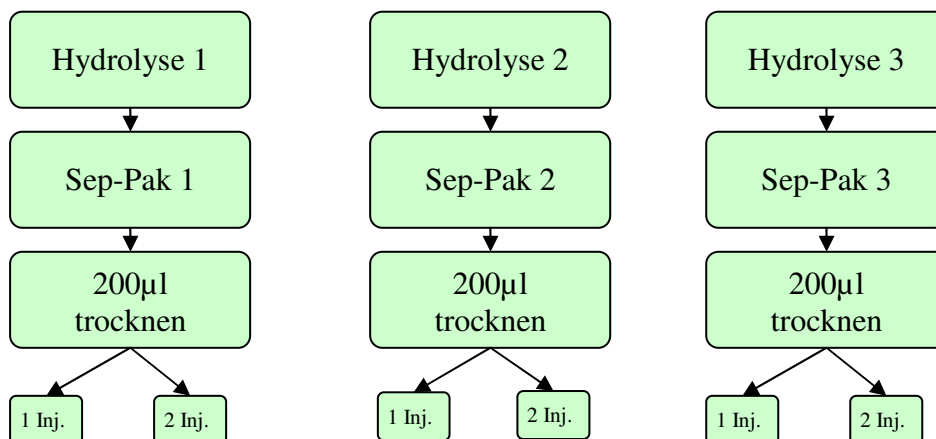


Abbildung 3.6 Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.1 bis 3

Die Hydrolyse Nr. 4 wird wie in Abbildung 3.7 und 3.8 ersichtlich mehrmals getrocknet und injiziert.

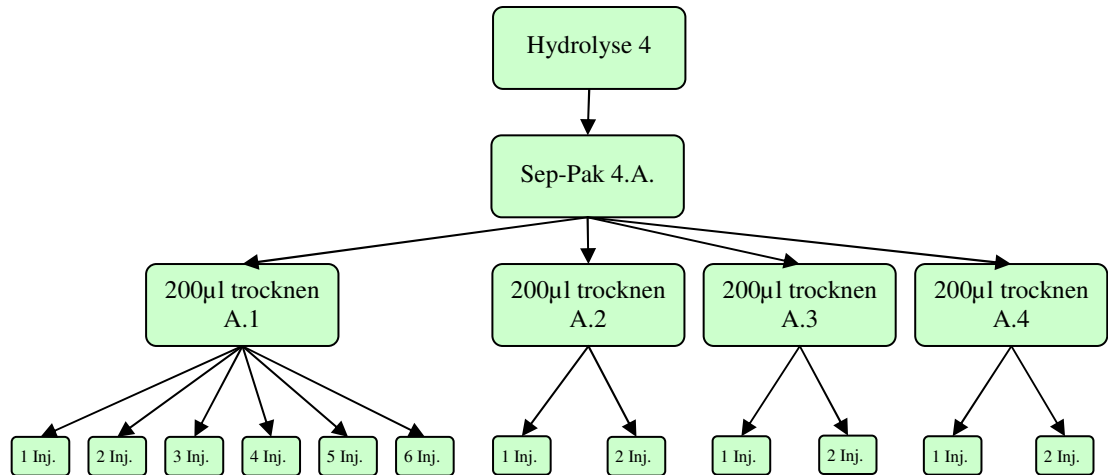


Abbildung 3.7 Teil I, Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.4

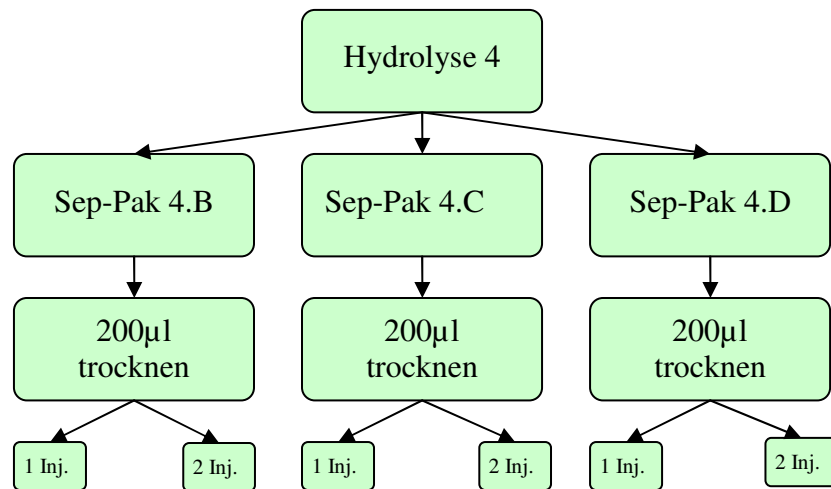


Abbildung 3.8 Teil II, Probenaufbereitung der Hydrolyse Nr.4

3.2.6 Kontrollprobe des Furosinpeaks

Eine Milchprobe wird wie im Kapitel 3.2.2 vorbereitet und 20 µl injiziert. Danach werden 100 µl Probe mit 100 µl Standardlösung IV (siehe Kapitel 3.2.4) in einen Eppendorf-Gefäß vermischt und 40µl injiziert.

3.3 Gesamtproteingehalt in Milch

3.3.1 Material

Destillationsapparatur BÜCHI 315

Heizblock BÜCHI 430

Aufschlusskolben

Tiegelzange

Löffel

Analysenwaage, AND Electronic Balance FX 300

Weithals-Erlenmeyerkolben

Abzugrohr

Wasserstrahlpumpe

Klemmen

Becherglas

Glasstab

1000 ml Messkolben

25 ml Vollpipette

Magnetrührer, MINI MR Standard, IKA® - WERKE

Reagenzien:

Wasser, destilliert

Glasperlen Kalk-Natron-Glas, 10 mm ROTH HH57.1

Mischindikator 5 für Ammoniaktitration, pH 4,4 - 5,8 MERCK 1.06130

Natronlauge $\geq 99\%$ ROTH 9356.2

Kaliumsulfat $\geq 99\%$, p.a. ACS, ISO ROTH P022.2

Kupfer-(II)-sulfat, wasserfrei z.A. MERCK 2791

Schwefelsäure 98 % Rotipuran für N-Bestimmung ROTH X945.2

Borsäure $\geq 99,8\%$ p.A. ACS, ISO ROTH 6943.1

Salzsäure 4 mol/l – 4 N Lösung Maßlösung ROTH N076.1

3.3.2 Herstellung der Lösungen

Natronlauge (35%ige):

In einem Becherglas ca. 1000 ml destilliertes Wasser vorlegen, danach 700 g Natronlauge vorsichtig mit einem Glasstab einrühren und mit destilliertem Wasser auf 2000 ml auffüllen.

Anmerkung: Das Becherglas in einen Behälter mit kaltem Wasser stellen, da sich die Lösung erwärmt.

Borsäure (2%ige):

20 g Borsäure in einen 1000 ml Messkolben einwiegen, danach ca. 500 ml destilliertes Wasser und ein Magnetfischchen hinzugeben und so lange auf den Magnetrührer stellen, bis sich die Borsäure aufgelöst hat. Anschließend den Messkolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen und die Lösung gut mischen.

0,1 M HCl:

In einen 1000 ml Messkolben ca. 500 ml destilliertes Wasser vorlegen. Danach 25 ml Salzsäure (4 mol/l) hinzufügen und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung auffüllen und mischen.

Katalysatorgemisch:

1000 g Kaliumsulfat mit 4 g Kupfersulfat vermischen.

3.3.3 Durchführung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in Milch erfolgt nach der Methode von Kjeldahl in Doppelbestimmung.

Probenaufschluss

Es werden acht Aufschlusskolben beschriftet und mit je einem Löffel Katalysatorgemisch und zwei Glasperlen befüllt. Danach werden in jeden Kolben ca. 2 g Probe eingewogen (genaue Einwaage der Probe notieren). Anschließend werden in jeden Kolben 20 ml 98%ige Schwefelsäure im Abzug hinzugeben, das Abzugsrohr mit Klemmen fixiert, in den Heizblock gestellt und die Wasserstrahlpumpe aufgedreht. Den Heizblock für ca. 1½ Stunden auf Stufe zwei stellen. Das Probengemisch verfärbt sich dunkelbraun. Sobald das Probengemisch nicht mehr schäumt, Heizung auf Stufe vier stellen. Nach ca. zwei Stunden auf Stufe vier wird die Probenmischung leicht grünlich, die Heizung für 1½ Stunden auf Stufe sieben stellen. Anschließend werden die Kolben aus dem Heizblock genommen und ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sobald die Kolben ausgekühlt sind, wird die Wasserstrahlpumpe abgedreht und das Abzugsrohr entfernt. Danach werden 50 ml glasdestilliertes Wasser langsam vom Rand aus in die Kolben hinzugefügt.

Destillation

In einen Weithals-Erlenmeyerkolben werden 20 ml 2%ige Borsäure eingefüllt und zwei Tropfen Mischindikator hinzugefügt (die Lösung ist dunkelrosa). Anschließend wird der Erlenmeyerkolben unter den Kühler gestellt. Das Kühlerende taucht in die Borsäure ein. Der Aufschlusskolben mit dem Probengemisch wird in die Destillationsapparatur einspannt. In den Aufschlusskolben wird vorsichtig Natronlauge zugegeben, die Probenmischung wird braun. Es wird weiter Natronlauge zugeben, sobald die Probenmischung blau ist kann der Kochvorgang gestartet werden. Der Kochvorgang kann beendet werden, wenn der Erlenmeyerkolben bis zu 1/3 gefüllt ist (die Lösung mit der Probe ist grün). Der Inhalt des Aufschlusskolbens kann verworfen werden.

Titration

Die Probenmischung im Erlenmeyerkolben wird mit einer 0,1 M HCl bis zum bestehenden Farbumschlag (von grün zurück auf hellrosa) titrieren.

3.4 Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin in Milch mittels RP-HPLC

3.4.1 Material

Chromatographisches System:

Siehe Kapitel 3.2.1

Reagenzien:

Di-Natriumhydrogenphosphat – Dihydrat, Merck 1.06586.0500 MM 177,99

Natriumdihydrogenphosphat – Monohydrat, Merck 6346.1000 MM137,99

Trifluoressigsäure, >99,5% Fluka 91699

Acetonitril ROHT® ROTISOLV® HPLC Gradient Grade 99,9% Art.-Nr.8825.2

HCl 37 % rauchend, ROTH®

Helium, Linde, 5.0

Standardlösung pH-Meter 4,01, Hanna Instruments HI 70004 $\pm 0,01$ pH bei 25 °C

Standardlösung pH-Meter 7,01, Hanna Instruments HI 70007 $\pm 0,01$ pH bei 25 °C

Herstellung der Lösungen:

2 M HCl

In einem 200 ml Messkolben werden ca. 100 ml UHQ-Wasser vorgelegt. Danach werden 33,12 ml der 37%igen HCl dazupipettiert und mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

2,75979 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat werden in einem 100 ml Messkolben eingewogen. Anschließend werden ca. 50 ml UHQ-Wasser hinzugefügt und für ca. 2 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Sobald sich das Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat aufgelöst hat, wird der Kolben bis zur Markierung mit UHQ-Wasser aufgefüllt.

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Es werden 1,7799 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in einem 50 ml Messkolben eingewogen. Danach werden ca. 30 ml UHQ-Wasser hinzugegeben. Nach ca. 2 Minuten im Ultraschallbad hat sich das Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat gelöst und der Kolben wird mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,7

In einem 200 ml Messkolben werden 57 ml Natriumdihydrogenphosphat (0,2 M) mit 43 ml Dinatriumhydrogenphosphat (0,2 M) vermischt. Anschließend wird der Kolben bis zur Markierung mit UHQ-Wasser aufgefüllt.

Laufmittel A (UHQ-Wasser + 0,1% Trifluoressigsäure)

In einem 500 ml Messkolben werden ca. 350 ml UHQ-Wasser vorgelegt, danach werden 0,5 ml Trifluoressigsäure dazupipettiert und mit UHQ-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Im Anschluss wird das Laufmittel durch Millipore Filteranlage filtriert.

Laufmittel B (Acetonitril + 0,1% Trifluoressigsäure)

200 ml Acetonitril werden in einem 500 ml Messkolben vorgelegt. Anschließend werden 0,5ml Trifluoressigsäure dazupipettiert und bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt

Laufmittel C (100% Acetonitril)**Laufmittel D** (20% Acetonitril)

Es werden 100 ml Acetonitril mit 400 ml UHQ-Wasser gemischt und durch die Millipore Filteranlage filtriert.

Weitere Geräte und Hilfsmittel:

Heißluft-Sterilisator, Heraeus TYP FT 420 F.Nr. 004868

Glasgefäße pyroliert

Vollpipette 10 ml, Witeg Germany Diffico, B Ex 20 °C ± 0,03 ml

Magnetrührer, MINI MR Standard, IKA® - WERKE

pH-Meter, Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor pH-Meter Nr. 510454,
Elektrodencode HI13IR

Pechiny Plastic Packaging Parafilm® PM-996

Zentrifuge, Beckmann J2 – HS, USA, Max 14000 rpm, + Einsätze

Zentrifugenröhrchen, Corex® 15 ml USA, Nr. 8441

Pipette, VWR 100-1000 µl

Pipettenspitzen 1000 µl, blau, SARSTEDT No 70.762

Universal Container 30 ml, Sterilin®

Satorius stedim biotech Minisart RC 4 (0,2µl)

Einwegspritzen, BRAUN Injekt® 2 ml

Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml

Reaktionsgefäße Multiply ® - Pro 0,5 ml Biosphere

Tischzentrifuge, Eppendorf, 5415R T 25A, Nr. 5426, Max min⁻¹ = 13200

Analysenwaage Mettler Toledo, AE 163

VORTEX – GENIE Patent 3.061.280

Laufmittelfilter, MAGNA, Nylon, Supported, Plain, 0,22 µm, 47 mm, No. 1213769

Laufmittelfilter, Micron Sep, Cellulose, White, Plain, 0,22 µm, 47 mm, No.1214909

Saugnutsche Millipore

Pumpe für Saugnutsche, Millipore LR37697

UHQ Wasseraufbereitungsanlage, USF ELGA, Modell UHQ -2- MK3,

Glasdest. Wasseraufbereitungsanlage, Schott Gerät

Probenmaterial

Es handelt sich bei den Proben 129, 130, 132, 133, 135, 136 um eingefrorene Proben (1 Liter), die restlichen Proben waren gekühlt (Tabelle 3.15)

Tabelle 3.15 Probenmaterial β -Lg

MHD	Name	Probe	Milchart	% Fett
25.01.2009	A faire Milch 3022GF 01021F	126	ESL	3,5
29.01.2009	Biones Bio L1.1/008/21:25	127	ESL	3,5
11.01.2009	Goldfuss	125	RM	Nat.
08.01.2009	Ja Natürlich L1 12:53	135	ESL	1,0
25.01.2009	Ja Natürlich L1 12:53	136	ESL	1,0
25.01.2009	Ja Natürlich L1 16:38	137	ESL	1,0
18.01.2009	Ja Natürlich L1 15:58	122	ESL	3,6
09.01.2009	Ja Natürlich L1 14:17	132	ESL	3,6
26.01.2009	Ja Natürlich L1 09:46	133	ESL	3,6
08.02.2009	Ja Natürlich L1 08:50	134	ESL	3,6
19.12.2008	Ja Natürlich L2 16:34	129	Past.	3,6
11.01.2009	Ja Natürlich L1 12:32	130	Past.	3,6
19.01.2009	Ja Natürlich L2 16:00	131	Past.	3,6
02.02.2009	NÖM 3018 10:58	124	ESL	1,5
11.01.2009	Stadler Raxendorf	123	RM	Nat.

3.4.2 Ablauf der Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin in Milch

Probenvorbereitung

10 ml Milch werden mit einer Vollpipette in ein 25 ml Becherglas pipettiert und auf dem Magnetrührer gut durchmischt. Anschließend wird mit einer 2 M HCl der pH-Wert auf 4,5 eingestellt. Dazu werden ca. 250-290 μ l der 2M HCl benötigt. Das Becherglas wird mit einem Parafilm® verschlossen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Inhalt des Becherglases in ein Zentrifugenröhrchen

überführt und mit einem Parafilm® verschlossen. Das ausgeflockte Casein wird bei 8000 rpm und 4 °C abzentrifugiert.

Wenn es sich um Rohmilch, pasteurisierte Milch oder ESL-Milch handelt, wird 1 ml klarer Überstand mit 9 ml Phosphatpuffer in einem Universal Container vermischt. Bei UHT-Milch werden 2 ml klarer Überstand mit 8 ml Phosphatpuffer vermischt. Die Lösung wird mehrmals geschüttelt, danach bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wird die Lösung nochmals geschüttelt, 1 ml entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Eppendorfgefäß wird für 20 Minuten bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 0,5 ml davon werden mit einer 2 ml Spritze durch einen 0,2 µm Filter filtriert [INTERNATIONAL STANDARD, 1992; LIESKE und SENGE, 2005].

RP-HPLC:

Die Säulentemperatur beträgt 40 °C, der Fluss 0,35 ml/min, Absorption bei 205 nm. Es werden 10 µl mit einer Hamiltonspritze injiziert. Die Probenschleife wird 1 Minute gespült, nach 35 Minuten kann eine neue Probe injiziert werden [NUßBAUMER, 2006].

3.4.3 Laufmittel und Gradienten

Die Laufmittel und Gradienten (Tabelle 3.16 bis 3.18) von nativem β -Lactoglobulin in Milch wurden bereits in vorangegangenen Diplomarbeiten optimiert.

Laufmittel A: 0,1% Trifluoressigsäure

Laufmittel B: 99,9% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure

Laufmittel C: 100% Acetonitril (Lagerung der Säule ab einer Woche)

Laufmittel D: 20% Acetonitril (Lagerung der Säule über Nacht bzw. Wochenende)

Trennung: Gradient

Tabelle 3.16 β -Lactoglobulin Startgradient [NUßBAUMER, 2006]

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

Tabelle 3.17 Probengradient [NUßBAUMER, 2006]

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

Tabelle 3.18 β -Lactoglobulin Endgradient [NUßBAUMER, 2006]

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

3.4.4 Kalibration für β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin

Material

β -Lactoglobulin (90%), kristallisiert und lyophilisiert, Sigma 095K7006

α -Lactalbumin (85%), lyophilisiertes Pulver, Sigma L 5385

0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,7 (Herstellung siehe Kapitel 3.4.1)

Trifluoressigsäure, >99,5% Fluka 91699

Acetonitril Roth® Rotisolv® HPLC Gradient Grade 99,9% Art.-Nr.8825.2

Helium, Linde, 5.0

Glasgefäße pyrolisiert

UHQ Wasseraufbereitungsanlage, USF ELGA, Model UHQ-2-MK3

Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml

Analysenwaage, Mettler AE 163

Herstellung der Kalibrationsstandards

Molkeneiweiß besteht aus 50-55% β -Lactoglobulin und 21% α -Lactalbumin.

Dieses Verhältnis muss bei der Herstellung der Kalibrationsstandards berücksichtigt werden.

β -Lactoglobulin-Lösung:

Es werden in einen 10 ml Messkolben 35,55 mg β -Lactoglobulin (90%) eingewogen und mit Phosphatpuffer (pH 6,7) bis zur Markierung aufgefüllt.

Anmerkung: $\triangleq$ 32 mg β -Lactoglobulin (100%)/10 ml

α -Lactalbumin-Lösung

In einen 10 ml Messkolben werden 37,65 mg α -Lactalbumin (85%) eingewogen und bis zur Markierung mit Phosphatpuffer (pH 6,7) aufgefüllt ($\triangleq$ 32 mg α -Lactalbumin (100%)/10 ml) Im Anschluss werden 5 ml dieser Lösung mit 5 ml Phosphatpuffer vermischt.

Anmerkung: $\triangleq$ 16 mg α -Lactalbumin (100%)/10 ml.

Standardlösung VI (SL VI)

Von der 32 mg/10 ml β -Lactoglobulin-Lösung und der 16 mg/10 ml α -Lactalbumin-Lösung ausgehend wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Dazu werden in einem 20 ml Messkolben 2 ml β -Lactoglobulin-Lösung mit 2 ml α -Lactalbumin-Lösung und 16 ml Phosphatpuffer vermischt.

Die restlichen Standards werden wie in der Tabelle 3.19 angegeben hergestellt. Jeder Standard wird dreimal injiziert, es handelt sich um eine Trennung mittels Gradienten. Die nächste Injektion erfolgt in der 35. Minute, das Injektionsvolumen beträgt 10 μ l.

Tabelle 3.19 Kalibrationsstandardlösung

Standardlösung	Mischungsverhältnis		β -Lg μ g/10 μ l	α -La μ g/10 μ l
I	625 μ l SL VI	9375 μ l Phosphatpuffer	0,2	0,1
II	1250 μ l SL VI	8750 μ l Phosphatpuffer	0,4	0,2
III	2500 μ l SL VI	7500 μ l Phosphatpuffer	0,8	0,4
IV	5000 μ l SL VI	5000 μ l Phosphatpuffer	1,6	0,8
V	7500 μ l SL VI	2500 μ l Phosphatpuffer	2,4	1,2
VI	-	-	3,2	1,6

Die Kalibrationsstandardlösungen berücksichtigen den in der Probenaufarbeitung verwendeten Verdünnungsfaktor von 1:10. Das bedeutet, dass der Wert in μ g/10 μ l Injektion mit der Angabe des Werts in mg/ml Milch (d.h. g/l Milch) gleichgesetzt werden kann wobei die Ergebnisse (in der Tabelle 4.9) in mg/l angegeben wurden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Furosin als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC

4.1.1 Kalibration

Zur Ermittlung des Furosingehaltes in den untersuchten Milchproben muss zuerst eine Kalibration durchgeführt werden. Dazu wird ein Furosinstandard benötigt, welcher in sechs unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt wird. Jede Konzentration wird dreimal injiziert, wodurch eine Kalibrationsgerade (Abbildung 4.1) erstellt werden kann, die zur quantitativen Analyse des Furosins herangezogen wird.

Tabelle 4.1 Werte der Furosinkalibrierung

Furosin (pmol/20µl)	Fläche	Furosin (pmol/20µl)	Fläche
5	10443	40	100329
5	10892	40	100285
5	11427	40	100754
10	24258	80	204265
10	23992	80	203940
10	24613	80	199016
20	50269	160	402147
20	50085	160	402677
20	48560	160	401465

Zur Erstellung der Furosinkalibrationsgerade werden die in der Tabelle 4.1 angegebenen Werte herangezogen.

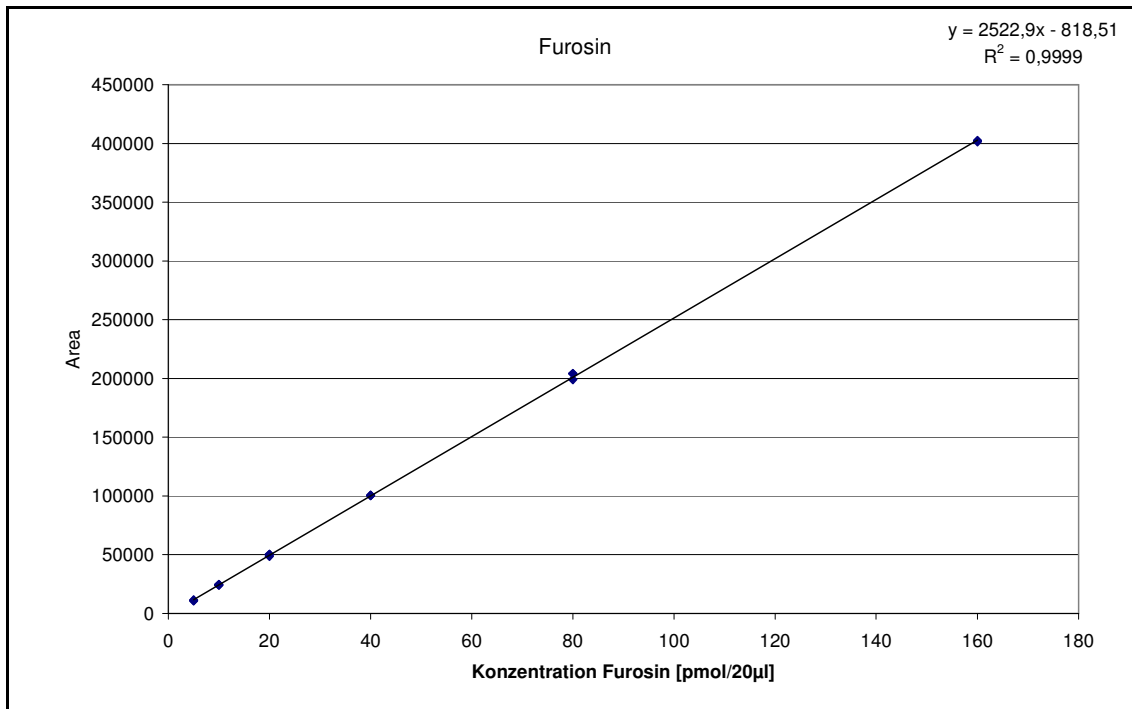


Abbildung 4.1 Furosinkalibrationsgerade

Der Anstieg der sechs unterschiedlichen Furosine-Konzentrationen ist in den Abbildungen 4.2 bis 4.7 deutlich zu erkennen.

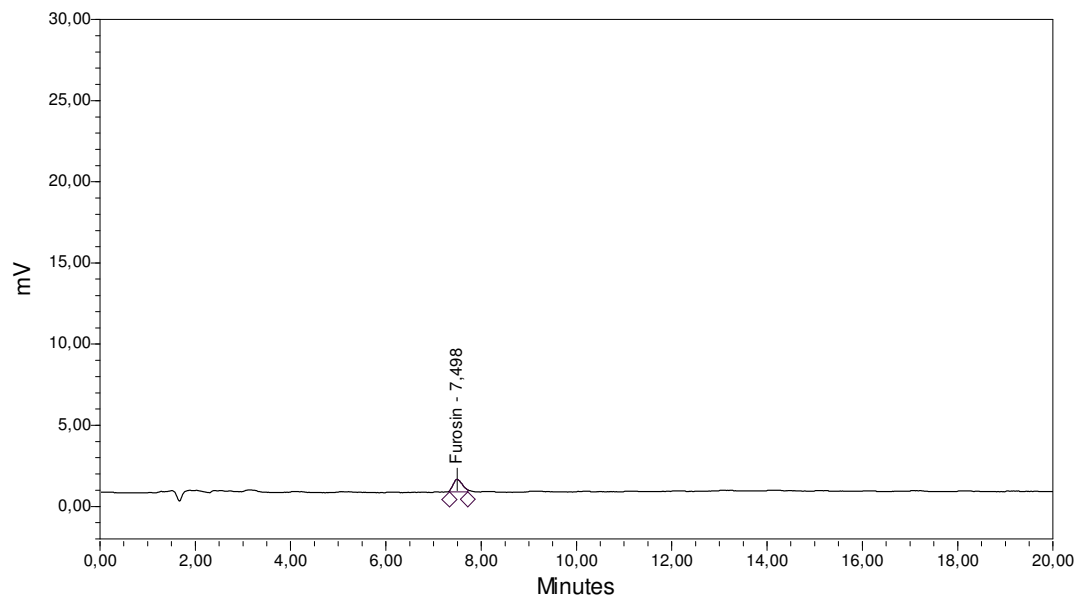


Abbildung 4.2 Furosine Standardlösung I (5 pmol/20 µl)

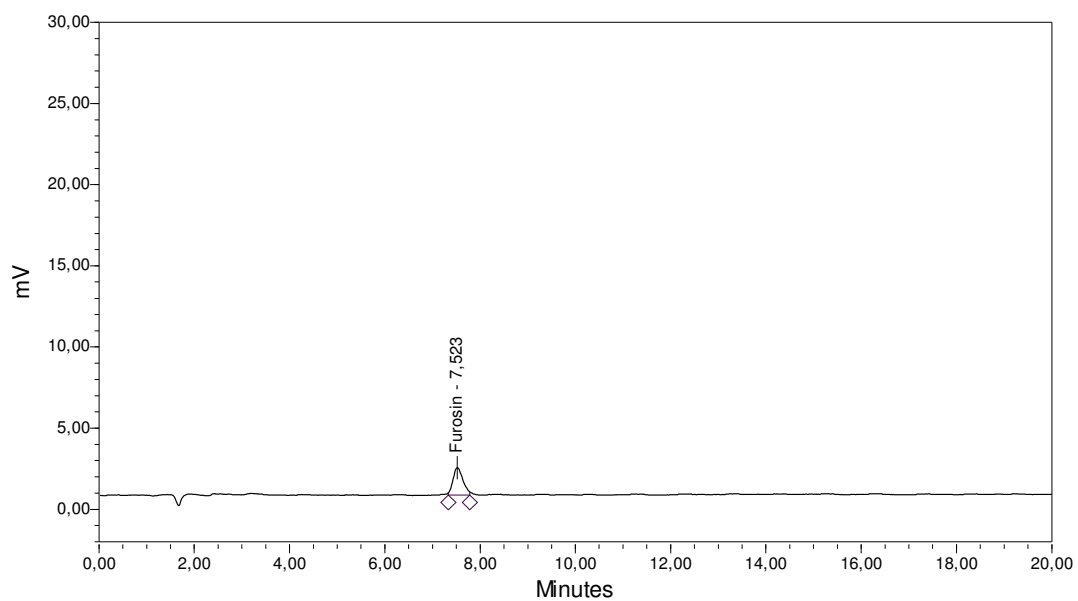


Abbildung 4.3 Furosin Standardlösung II (10 pmol/20 µl)

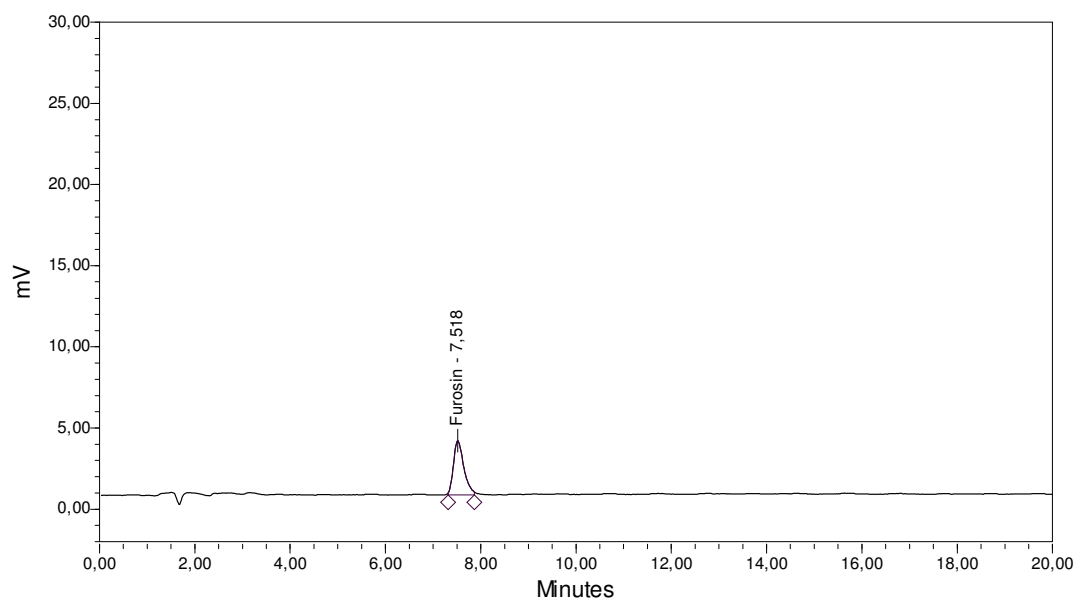


Abbildung 4.4 Furosin Standardlösung III (20 pmol/20 µl)

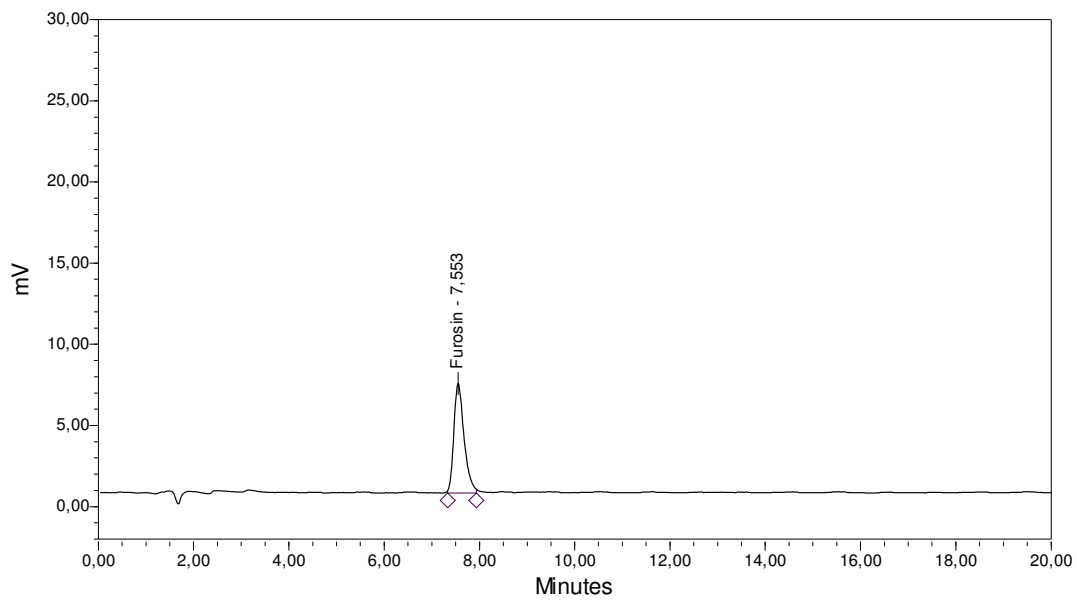


Abbildung 4.5 Furosin Standardlösung IV (40 pmol/20 µl)

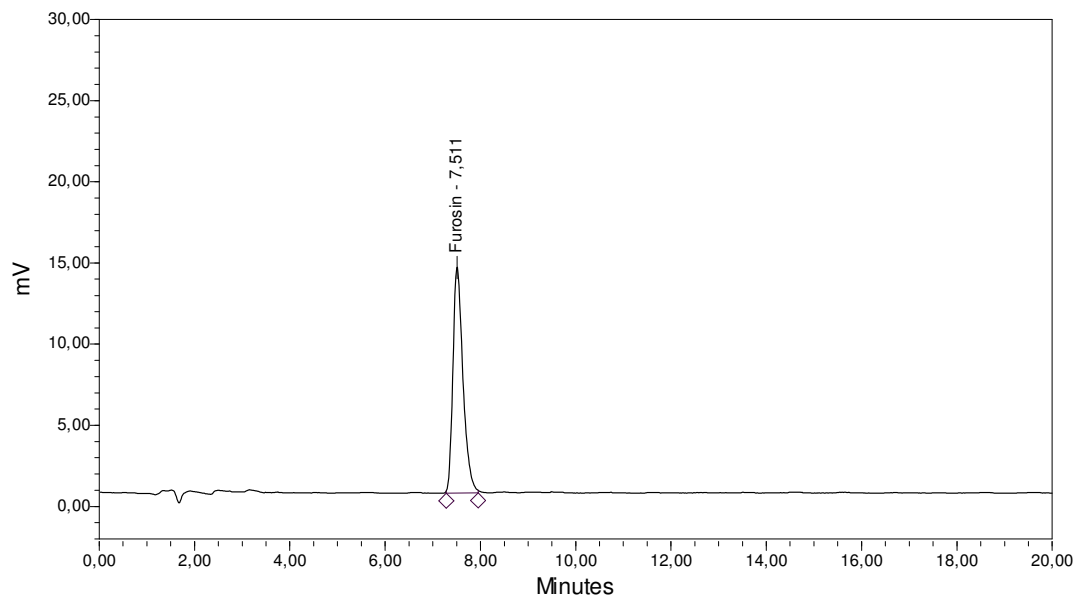


Abbildung 4.6 Furosin Standardlösung V (80 pmol/20 µl)

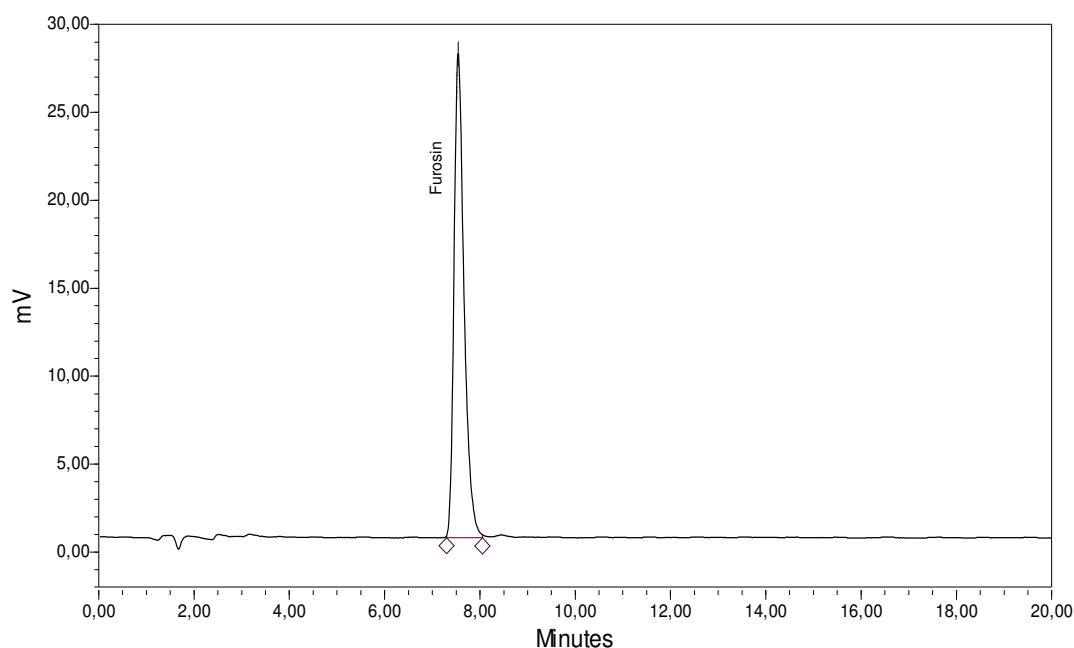


Abbildung 4.7 Furosin Standardlösung VI (160 pmol/20 µl)

4.1.2 Furosin Methodenoptimierung

Die Laufmittelzusammensetzung und der Probengradient aus vorangegangener Diplomarbeit (Vorversuch I) mussten aufgrund schwankender Retentionszeiten neu optimiert werden. Bei gleichem Laufmittel (Laufmittel A: 4,878 mM Heptansulfonsäure, + 12% (v/v) Acetonitril, + 0,2% (v/v) Ameisensäure) und gleicher Probe wanderte die Retentionszeit pro Tag um ca. 30 Sekunden, dadurch veränderte sich auch die Peakform. Zur Reinigung der Säule wurde im Vorversuch II ein Probengradient mit Spülschritt verwendet. Aufgrund eines unbekannten Peaks wurde die Laufzeit dadurch wesentlich verlängert (Abbildung 4.8) und es kam zu keiner Verbesserung der Retentionszeit.

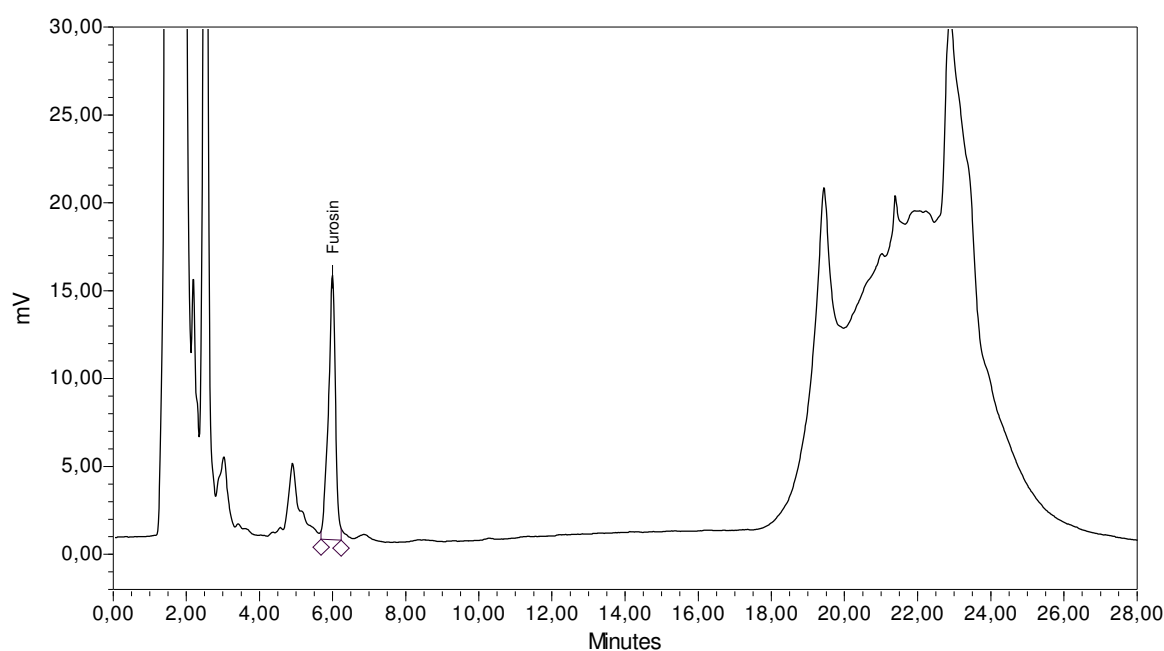


Abbildung 4.8 Probe Nr.22 (Probengradient + Spülschritt FM 4)

Die Laufmittelstabilität konnte deutlich verbessert werden, indem Laufmittel A nunmehr aus 5 mM Heptansulfonsäure und 0,2 % (v/v) Ameisensäure besteht (ohne Acetonitril). Durch den Probengradienten wird Laufmittel A mit Laufmittel B (100% Acetonitril) mittels Pumpe auf die gewünschte Zusammensetzung gemischt. Da sich die Peakform auch bei unterschiedlichem Anteil an Acetonitril verändert, wie man anhand der Abbildung 4.9 erkennen kann, wurde bei der Methodenoptimierung versucht, den optimalen Acetonitril Anteil herauszufinden.

Mischt man Laufmittel A 88% mit Laufmittel B 12%, so erhält man bei ca. 6 Minuten einen Furosinpeak, der allerdings eine leichte Schulter aufweist, und dadurch schlecht zu prozessieren und auszuwerten ist (Abbildung 4.9 gelber Peak). Wenn jedoch 89% Laufmittel A mit 11% Laufmittel B vermischt werden, erhält man einen schlanken hohen Peak, der optimal auszuwerten ist (Abbildung 4.9 grüner Peak). Mischt man 90% Laufmittel A mit 10% Laufmittel B, wird der Peak klein, dick und verbreitert (Abbildung 4.9 roter Peak). Das Schneiden des Peaks ist daher sehr schwierig.

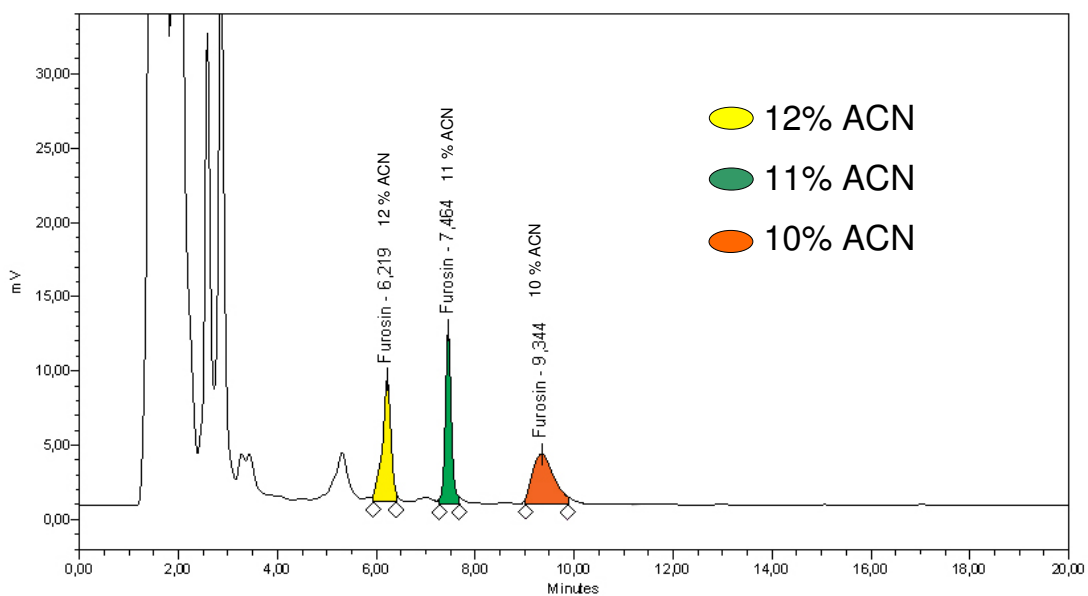


Abbildung 4.9 Overlay (gleiche Probe unterschiedlicher Acetonitrilanteil)

Tabelle 4.2 Endgültiger Probengradient (LM B 11%)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]	LM D [%]	Kurventyp
0	0,35	89	11	0	0	*
20	0,35	89	11	0	0	6
50	0	89	11	0	0	11

Aufgrund der verbesserten Peakform bei 11% Acetonitril wurde die Kalibration und alle Proben mit dem in Tabelle 4.2 angegebenen Probengradienten durchgeführt.

4.1.3 Überprüfung der Wiederholbarkeit

Zur Überprüfung der Furosinmethode auf ihre Wiederholbarkeit und Präzision wurde von einer ESL-Milch (Nr. 122) jeder Schritt der Probenvorbereitung mehrmals wiederholt (siehe Kapitel 3.2.5).

Die Abbildung 4.10 zeigt ein typisches Chromatogramm dieser Milchprobe.

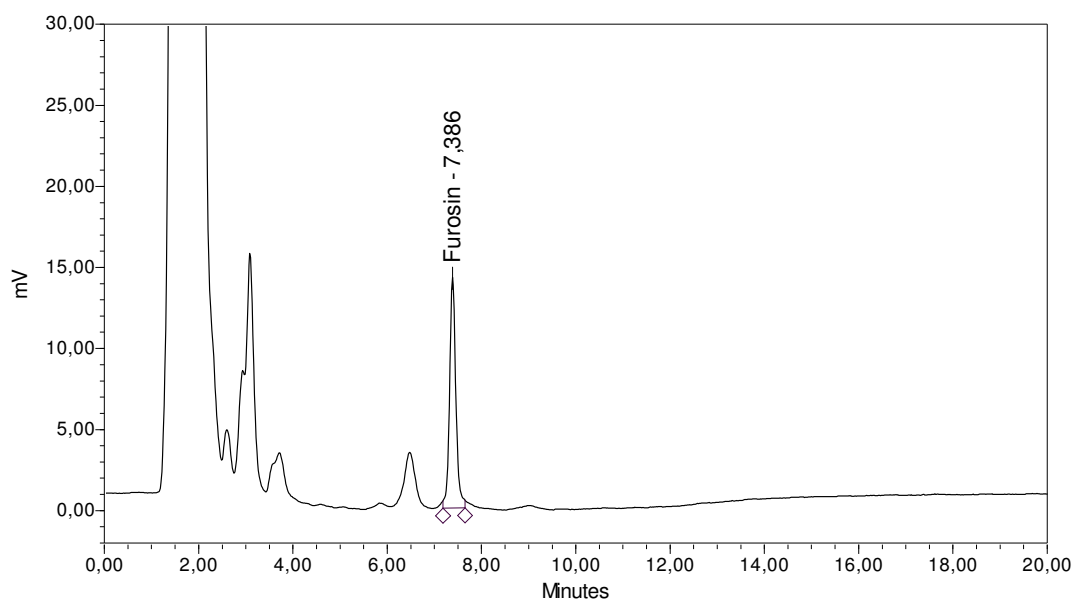


Abbildung 4.10 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.122.3)

In der Tabelle 4.3 sind die einzelnen Ergebnisse der untersuchten Milchprobe aufgelistet. Die Probe wurde insgesamt 24 mal injiziert und ergab einen Mittelwert von 49,867 mg Furosin/100 g Protein und eine Standardabweichung von $\pm 0,549$ mg/100 g (Variationskoeffizient = 1,1%).

Es konnte somit eine sehr gute Wiederholbarkeit der Furosinmethode festgestellt werden.

Tabelle 4.3 Wiederholbarkeitsüberprüfung einer ESL-Milch (Nr.122)

Probe	Furosin mg/100 g Protein		
Nr. 122.1 (1. Injektion)	49,836		
Nr. 122.1 (2. Injektion)	49,769		
Nr. 122.2 (1. Injektion)	49,760		
Nr. 122.2 (2. Injektion)	48,430		
Nr. 122.3 (1. Injektion)	49,846		
Nr. 122.3 (2. Injektion)	49,769		
Nr. 122.4.A.1 (1. Injektion)	49,760		
Nr. 122.4.A.1 (2. Injektion)	49,789		
Nr. 122.4.A.1 (3. Injektion)	49,808		
Nr. 122.4.A.1 (4. Injektion)	49,769		
Nr. 122.4.A.1 (5. Injektion)	49,741		
Nr. 122.4.A.1 (6. Injektion)	49,588		
Nr. 122.4.A.2 (1. Injektion)	49,760		
Nr. 122.4.A.2 (2. Injektion)	49,827		
Nr. 122.4.A.3 (1. Injektion)	49,798		
Nr. 122.4.A.3 (2. Injektion)	49,846		
Nr. 122.4.A.4 (1. Injektion)	49,836		
Nr. 122.4.A.4 (2. Injektion)	49,779		
Nr. 122.4.B (1. Injektion)	51,415		
Nr. 122.4.B (2. Injektion)	51,367		
Nr. 122.4.C (1. Injektion)	49,932		
Nr. 122.4.C (2. Injektion)	49,789		
Nr. 122.4.D (1. Injektion)	49,808		
Nr. 122.4.D (2. Injektion)	49,779		
	Mittelwert	49,867	
	Standardabweichung	0,549	1,10%
	Anzahl	24	

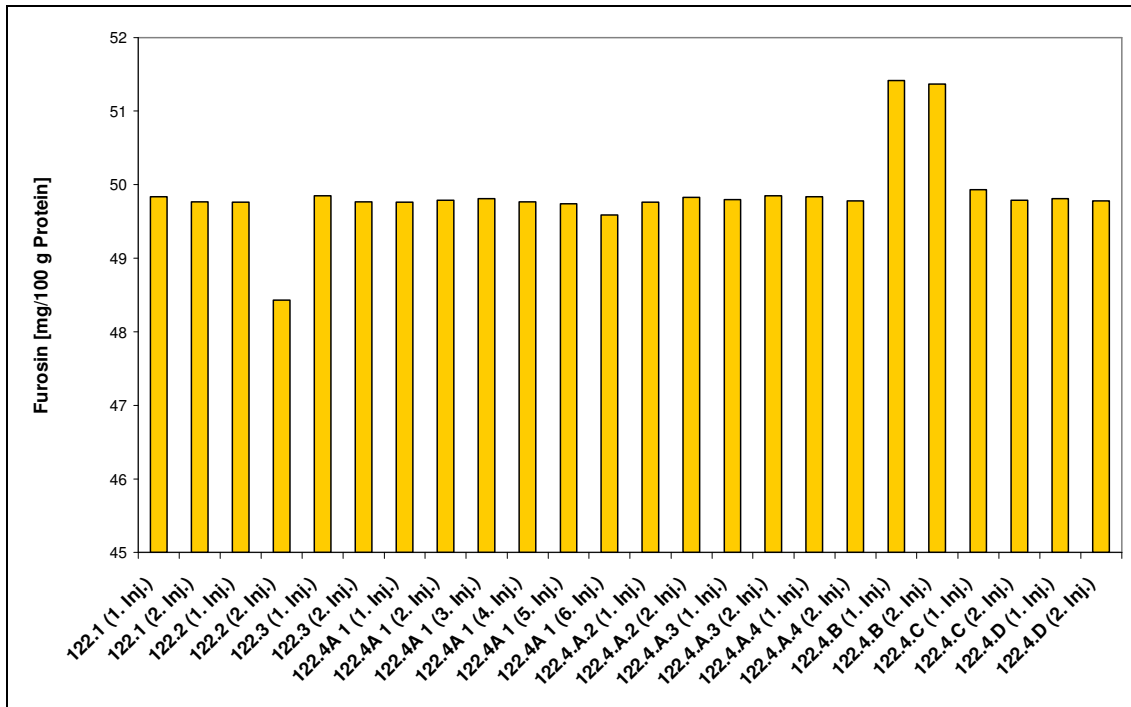


Abbildung 4.11 Überprüfung der Furosinemethoden-Genauigkeit

In der Abbildung 4.11 werden die einzelnen Ergebnisse der Probenaufarbeitung zur Überprüfung der Furosinemethoden-Genauigkeit grafisch dargestellt. Man kann auf dieser Darstellung die sehr gute Wiederholbarkeit der Furosinemethode auf einen Blick erkennen. Nur drei Injektionen weichen etwas stärker vom Mittelwert (49,867 mg Furosine/100 g Protein) ab, das sind die Proben Nr. 122.2 (2 Injektion) und Nr.122.4.B (1. und 2. Injektion). Sie weichen um ca. 3% vom Mittelwert ab.

4.1.4 Berechnung des Furosingehaltes in verschiedenen Milchproben

Furosin wird in mg/100 g Protein angegeben. Daher muss von jeder Milchprobe der Gesamtproteingehalt mittels Kjeldahl bestimmt werden (siehe Kapitel 3.3.2).

Berechnung des Furosingehaltes in Rohmilch, pasteurisierter Milch oder ESL-Milch

$$\begin{aligned}
 \text{mg Furosin/100 g Protein} &= \frac{pM * 50 * 24 * 1000 * 100 * 100 * MM}{P * 10^{12}} \\
 &= \frac{pM * 1200 * 10^7 * MM}{P * 10^{12}} \\
 &= \frac{pM * 0,012 * MM}{P}
 \end{aligned}$$

Berechnung des Furosingehaltes in UHT-Milch und lactosefreier Milch

$$\begin{aligned}
 \text{mg Furosin/100 g Protein} &= \frac{pM * 50 * 96 * 1000 * 100 * 100 * MM}{P * 10^{12}} \\
 &= \frac{pM * 4800 * 10^7 * MM}{P * 10^{12}} \\
 &= \frac{pM * 0,048 * MM}{P}
 \end{aligned}$$

Tabelle 4.4 Erklärung der Furosinberechnung

pM	Mit der Millennium 32 Software wird die Fläche des Peaks berechnet. Die Fläche entspricht pmol/20 µl Injektionsvolumen.
50	Berücksichtigt die Umrechnung von 20 µl Injektionsvolumen auf 1 ml.
24	Bei der Hydrolyse von Rohmilch, pasteurisierter Milch oder ESL-Milch wird die Probe 1:4 verdünnt und bei der weiteren Probenaufbereitung in der Sep-Pak-Säule noch einmal 1:6 verdünnt. Es muss daher ein Verdünnungsfaktor von 24 berücksichtigt werden.
96	Da der Furosingehalt in UHT-Milch und lactosefreier Milch besonders hoch ist, wird die Probe vor der Hydrolyse 1:4 verdünnt. Bei der Hydrolyse wird die Probe ebenfalls 1:4 verdünnt. Bei der weiteren Probenaufbereitung in der Sep-Pak-Säule wird die Probe 1:6 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor ist daher 96 und muss bei der Berechnung berücksichtigt werden.
1000	Umrechnung von g auf mg Furosin.
100	Berechnung von g auf 100g Protein
100	Angabe von g Protein in 1 ml Milch
MM	Die Molmasse von Furosin beträgt 254,28 g/mol
P	Gesamtproteinanteil in %
10^{12}	Umrechnung von pmol auf mol

In der Tabelle 4.4 werden die einzelnen Punkte der Furosinberechnung für die verschiedenen Milchproben im Detail erklärt.

4.1.5 Bestimmung des Furosingehaltes als Erhitzungsindikator in Milchproben

Abbildung 4.12 zeigt ein Chromatogramm einer Rohmilchprobe von einem niederösterreichischen Landwirt (Gemelk von insgesamt 70 Kühen) mit einem Furosingehalt von 5,9 mg Furosin/100 g Protein.

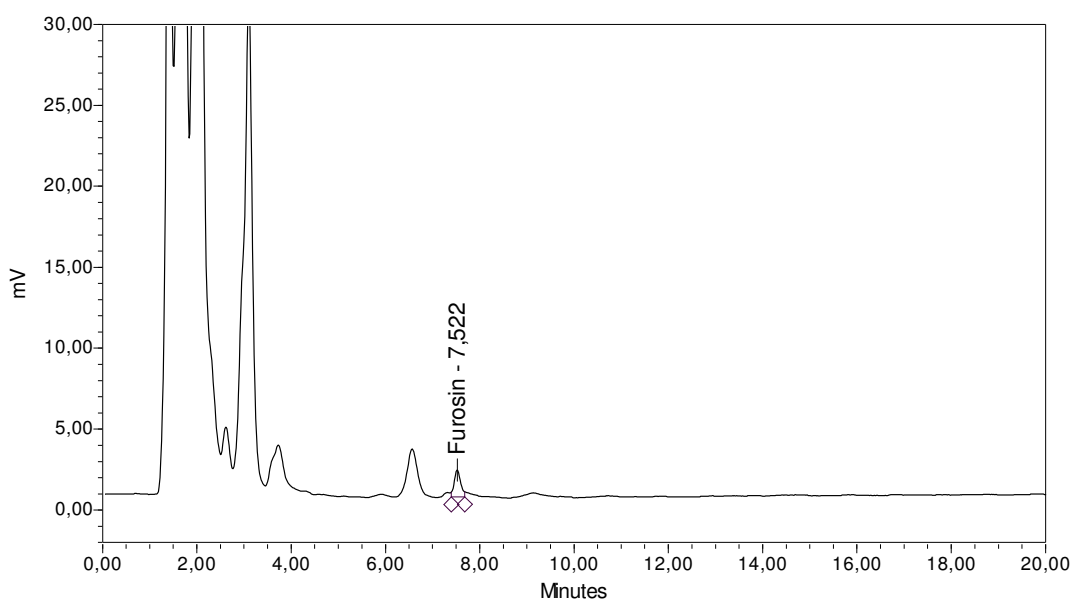


Abbildung 4.12 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.123)

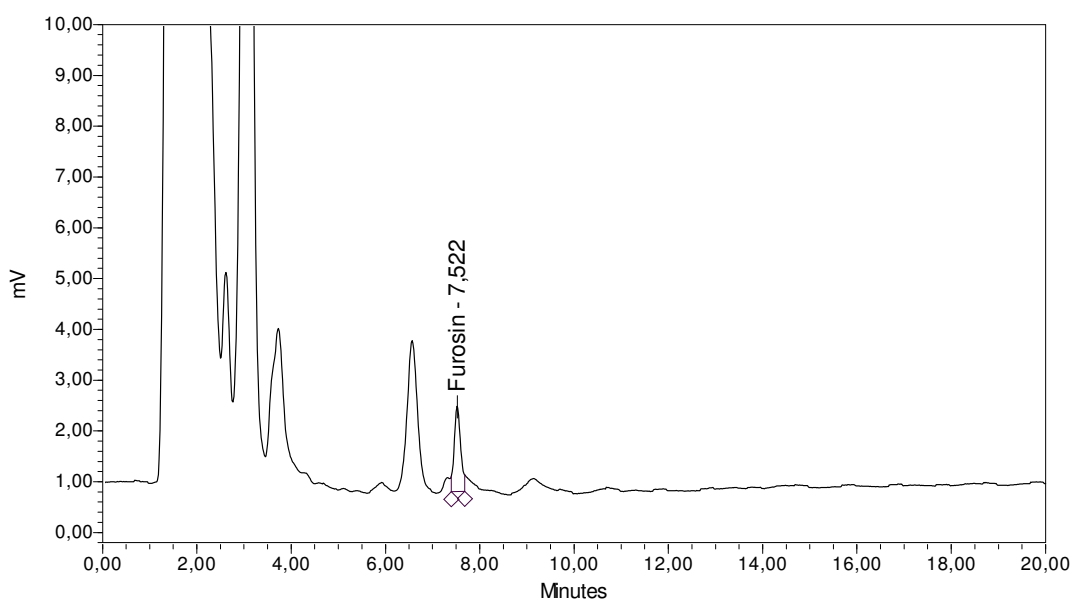


Abbildung 4.13 Chromatogramm einer Rohmilch (Ausschnitt Nr.123)

Die Abbildung 4.14 zeigt eine Rohmilchprobe einer einzelnen Kuh mit einem Furosingehalt von 8,7 mg Furosin /100 g Protein. Die Abbildungen 4.13 und 4.15 zeigen Ausschnitte der Rohmilch-Chromatogramme.

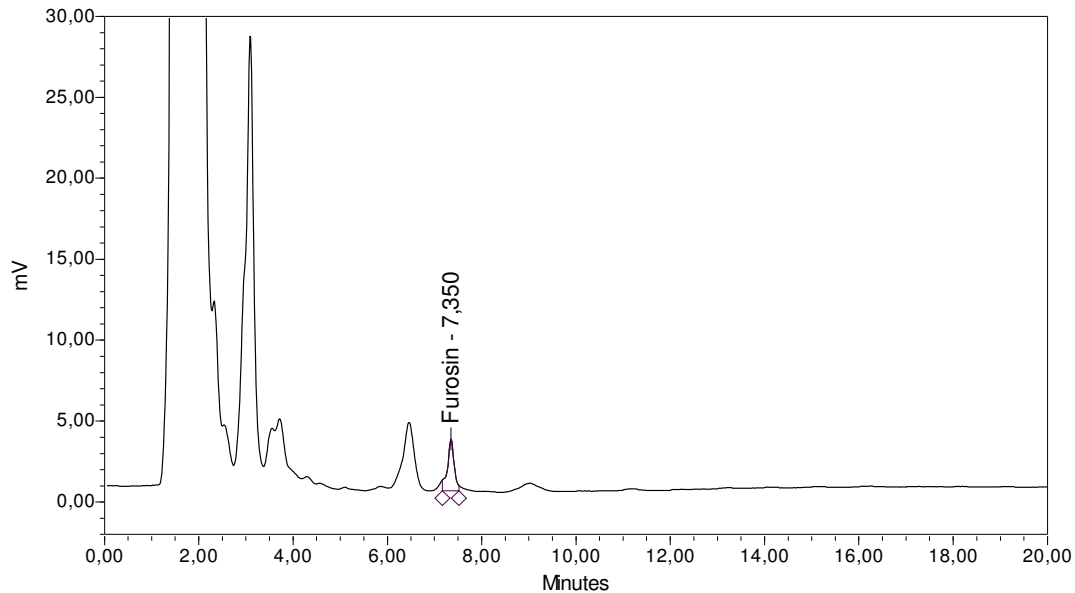


Abbildung 4.14 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.125)

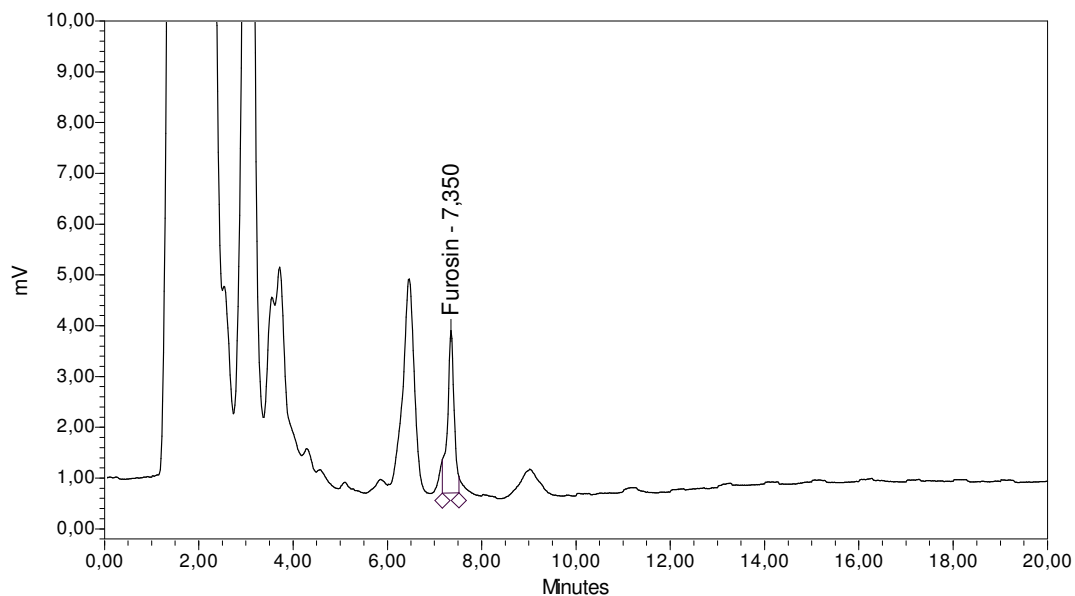


Abbildung 4.15 Chromatogramm einer Rohmilch (Ausschnitt Nr.125)

Abbildung 4.16 zeigt ein typisches Chromatogramm einer pasteurisierten Milch mit 9,9 mg Furosin/100 g Protein. Die Abbildung 4.17 zeigt eine Ausschnittsvergrößerung.

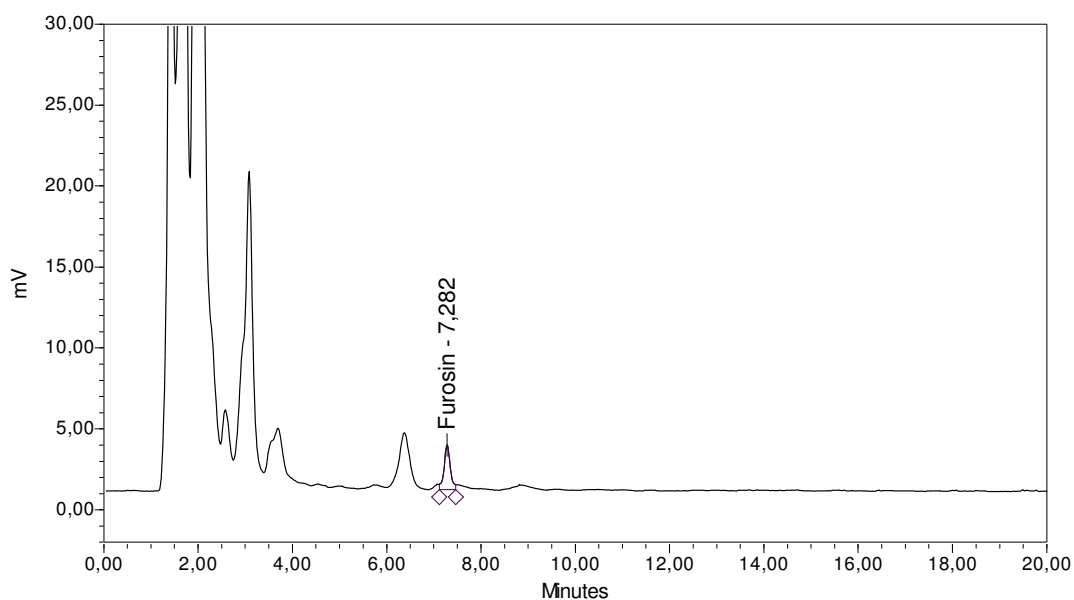


Abbildung 4.16 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Nr.130)

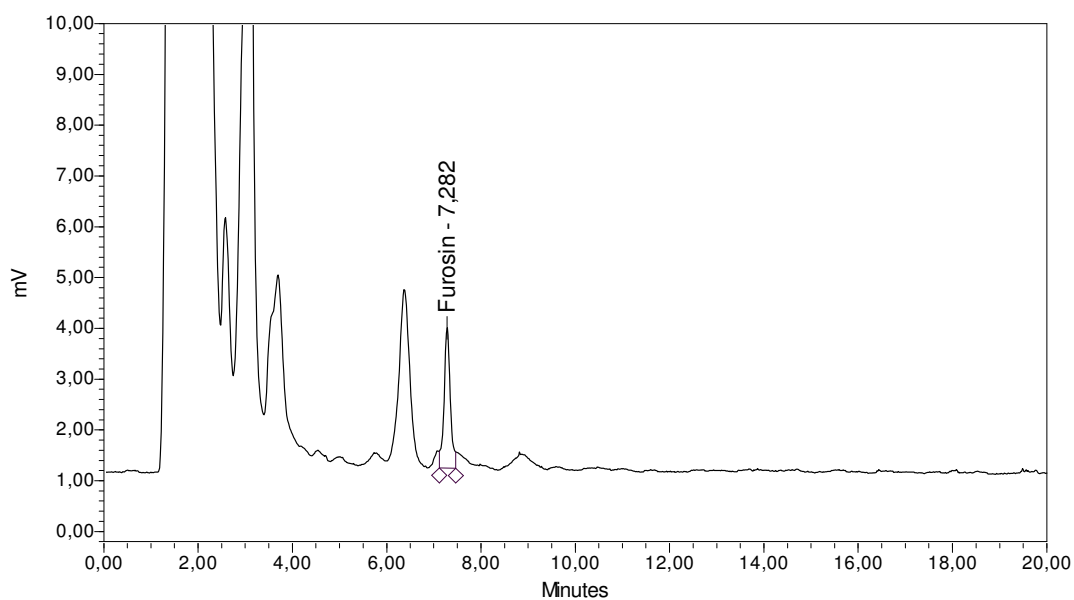


Abbildung 4.17 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Ausschnitt Nr.130)

Bei den ESL-Milchproben gibt es große Unterschiede im Furosingehalt, wie in den Abbildungen 4.18 und 4.20 deutlich zu erkennen ist. Die Milchprobe Nr. 127 hat einen Furosingehalt von 11,6 mg/100 g Protein. Abbildung 4.19 zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der Milchprobe Nr.127.

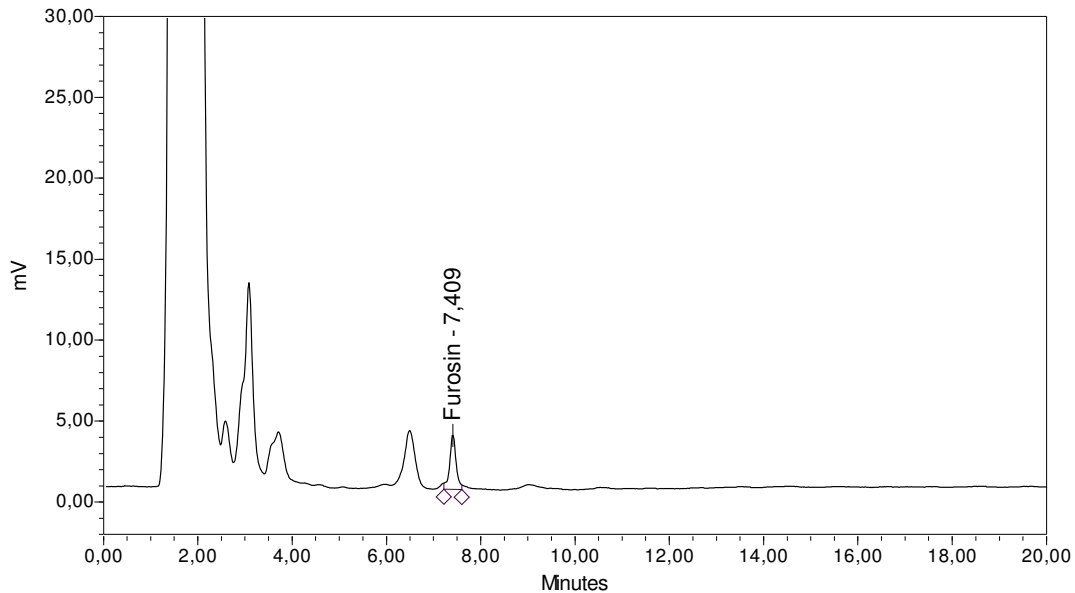


Abbildung 4.18 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.127)

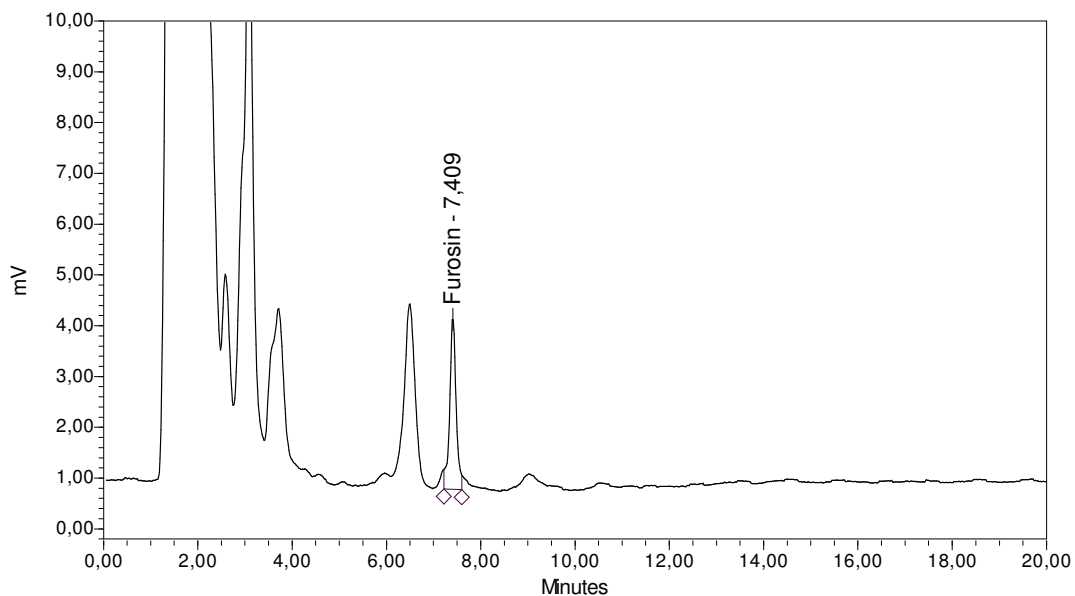


Abbildung 4.19 Chromatogramm einer ESL-Milch (Ausschnitt Nr.127)

Einen erheblich höheren Furosingehalt besitzt die Milchprobe Nr. 124. Wie man an der Abbildung 4.20 erkennen kann, ist der Furosinpeak wesentlich höher als der Furosinpeak der Abbildung 4.18. Der Furosingehalt der Milchprobe Nr. 124 beträgt 81,8 mg Furosin/100 g Protein.

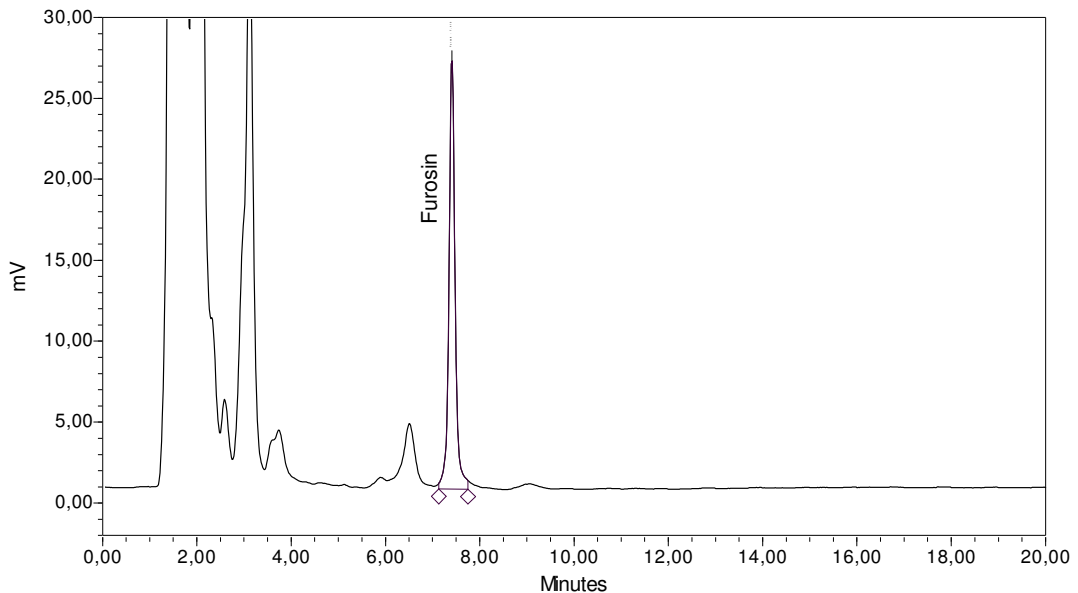


Abbildung 4.20 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.124)

Anhand des Furosingehaltes kann man darauf schließen, dass die Milchprobe Nr. 127 wesentlich schonender erhitzt wurde als die Milchprobe Nr. 124.

Abbildung 4.21 zeigt eine UHT-Milchprobe. Aufgrund des hohen Furosingehaltes der UHT-Milch wurde die Proben noch einmal neu aufgearbeitet und vor der Hydrolyse 1:4 verdünnt (Abbildung 4.22). Es ergab sich ein Furosingehalt von 148,9 mg/100 g Protein. Der Furosinpeak konnte bei der Abbildung 4.22 wesentlich besser ausgewertet werden. Die Probenaufarbeitung aller weiteren UHT-Milchproben und lactosefreien Milchproben erfolgt daher wie in Kapitel 3.2.2.

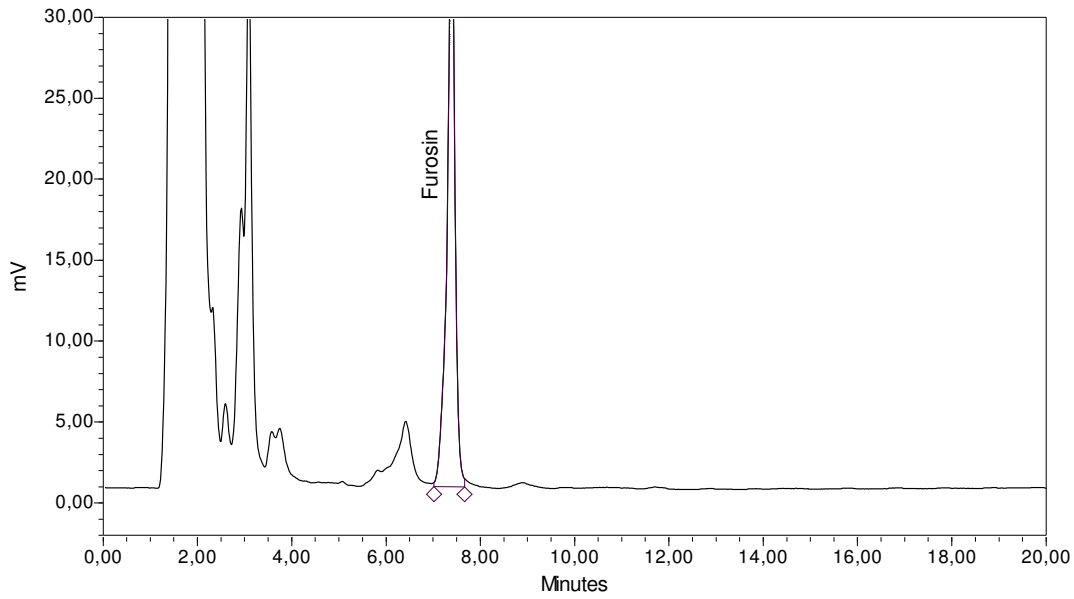


Abbildung 4.21 Chromatogramm einer UHT-Milch (Nr.38)

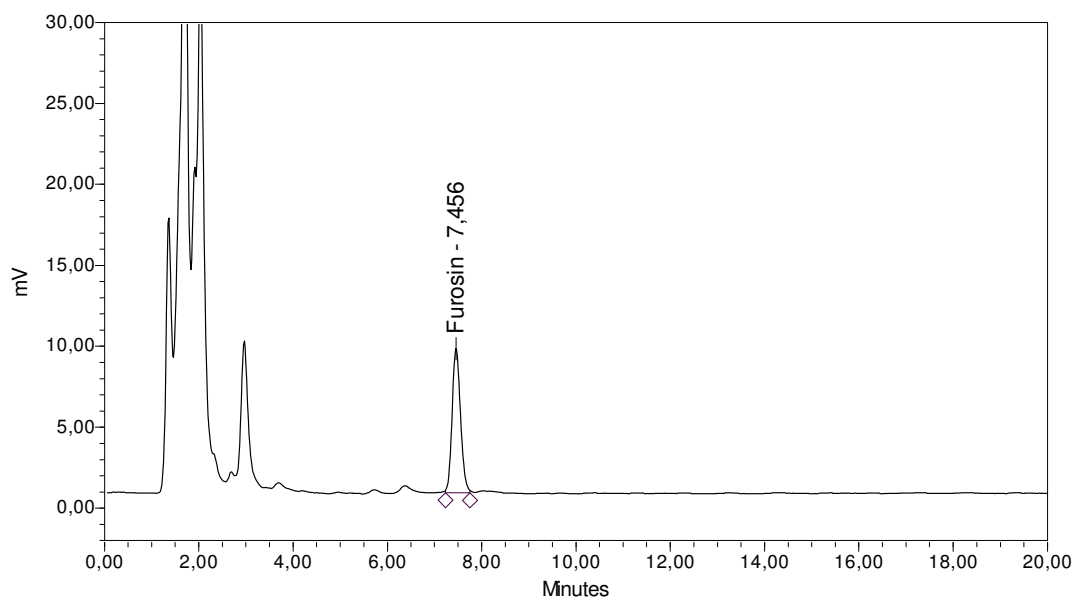


Abbildung 4.22 Chromatogramm einer UHT-Milch (1:4 verdünnt, Nr.38)

In der Abbildung 4.23 wurden alle untersuchten Milchproben in fünf Gruppen zusammengefasst. Von jeder Gruppe wurde der Mittelwert berechnet. Bei ESL-Milch wird zusätzlich differenziert (siehe Kapitel 4.1.5.3).

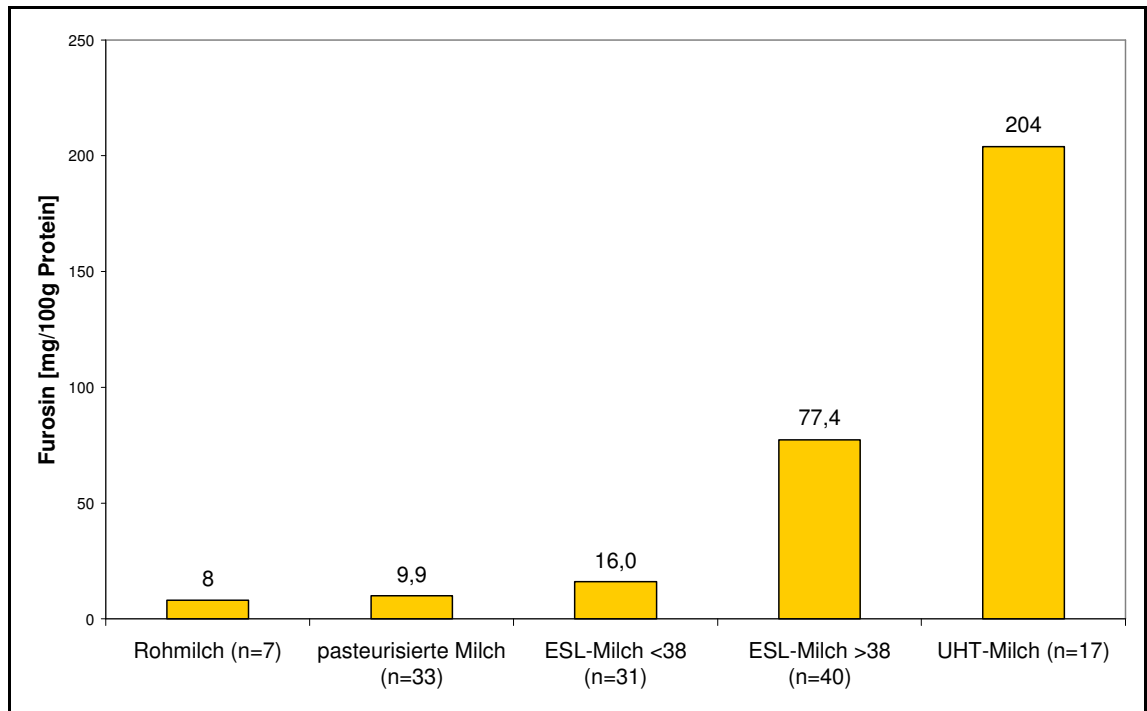


Abbildung 4.23 Mittelwerte der Furosingehalte der untersuchten Milchproben

4.1.5.1 Rohmilch

Der Furosingehalt in Rohmilch soll zwischen 4-7 mg Furosine/100 g Protein liegen [KRAUSE, 2005; CLAWIN-RÄDECKER et. al., 2004]. Die sieben untersuchten Rohmilchproben ergaben einen Mittelwert von 8 mg Furosine/100 g Protein (Abbildung 4.23). Nur eine der untersuchten Rohmilchproben liegt in dem angegebenen Bereich. Diese Probe stammte direkt vom landwirtschaftlichen Betrieb (Gemelk von insgesamt 70 Kühen).

Eine weitere Rohmilchprobe (Gemelk einer einzelnen Kuh) wurde von einem anderen niederösterreichischen Landwirt zur Verfügung gestellt. Diese Milchprobe stammte von einer älteren Kuh, deren Milchproduktion deutlich verringert war. Bei den Proteinmessungen ergab sich ein wesentlich höherer Gehalt als bei den anderen

untersuchten Milchproben. Aufgrund des hohen Proteingehaltes wird auch der Furosingehalt beeinflusst.

Die fünf restlichen Milchproben wurden in Bioläden gekauft und waren als Rohmilch mit dem Aufdruck „vor dem Verzehr abkochen“ gekennzeichnet. Alle Rohmilchproben werden in der Abbildung 4.24 zusammengefasst.

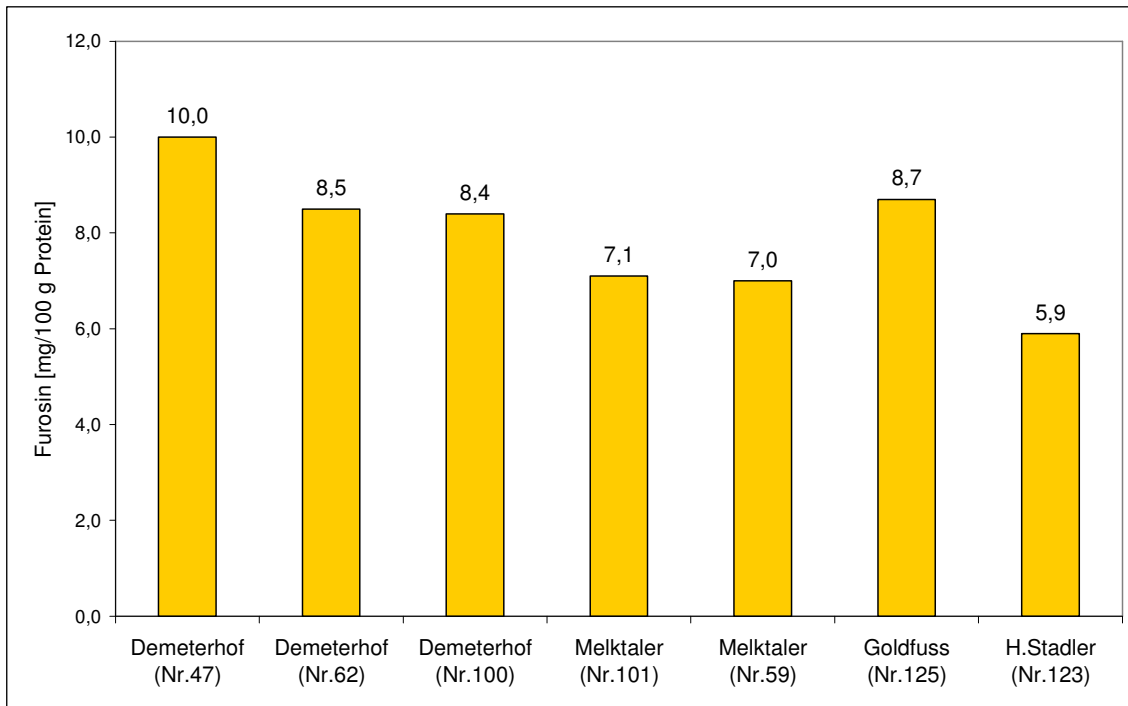


Abbildung 4.24 Zusammenfassung aller untersuchten Rohmilchproben

4.1.5.2 Pasteurisierte Milch

Pasteurisierte Milch sollte einen Furosingehalt zwischen 5-8 mg Furosin/100 g Protein haben [Krause, 2005]. Die untersuchten pasteurisierten Milchproben ergaben einen Mittelwert von 9,9 mg Furosin /100 g Protein (Abbildung 4.23). Keine der untersuchten Proben liegt in dem angegebenen Bereich. Der niedrigste Furosingehalt in pasteurisierter Milch war 8,1 mg Furoin/100 g Protein und der höchste Wert belief sich auf 13,3 mg Furosin/100 g Protein. Die prozentuelle Aufteilung der pasteurisierten Milchproben ist in Abbildung 4.25 zusammengefasst.

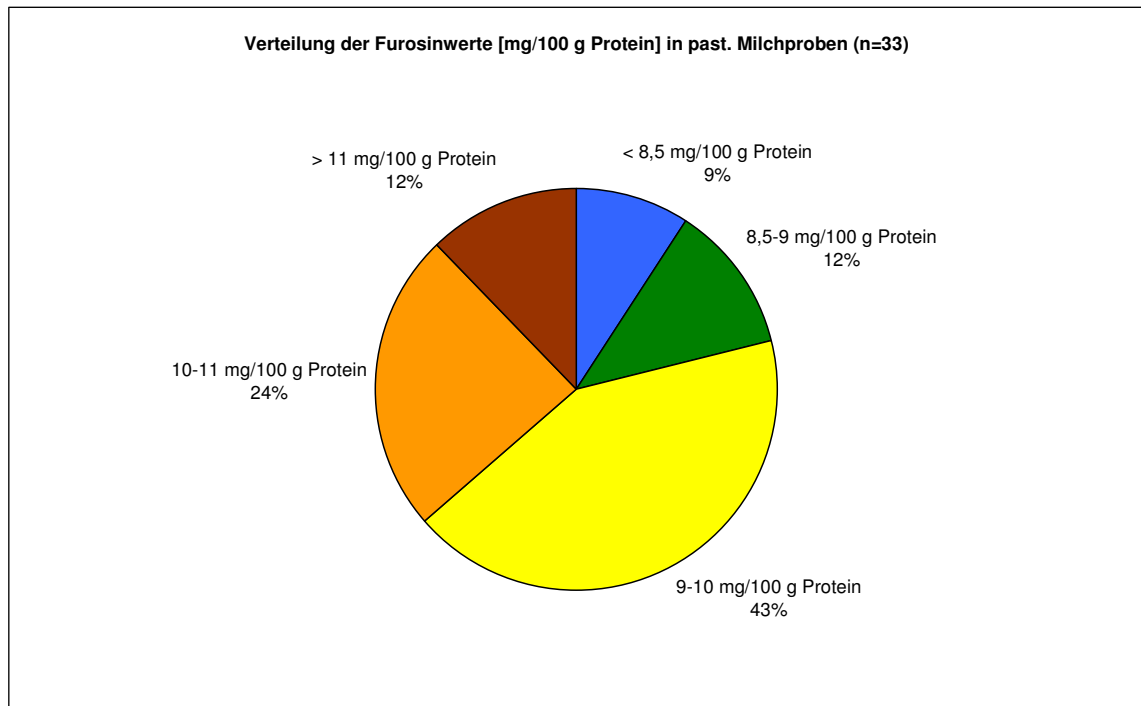


Abbildung 4.25 Zusammenfassung aller pasteurisierten Milchproben

4.1.5.3 ESL-Milch

Aufgrund der großen Unterschiede der Furosingehalte in ESL-Milchproben wurden diese in zwei Gruppen eingeteilt. Es ergab sich als sinnvoll, die Gruppen in „Furosingehalt < 38 mg Furosin/100 g Protein“ und „Furosingehalt > 38 mg Furosin/100 g Protein“ einzuteilen, da Werte über 38 mg/100 g Protein mit einer deutlichen Verringerung des nativen β -Lactoglobulingehaltes in Verbindung stehen (näheres dazu im Kapitel 4.4).

Der Furosingehalt von 12 mg/100 g Protein wird als Richtwert für ESL-Milch diskutiert [DYCK, 2004]. Es wurden insgesamt 71 ESL-Milchproben untersucht und nur neun der Proben hatten einen Furosingehalt von ≤ 12 mg/100 g Protein.

In den lactosefreien oder mit Protein angereicherten Milchproben war der Furosingehalt meist höher. Die Abbildung 4.26 zeigt eine genaue Aufteilung des Furosingehaltes der 71 untersuchten ESL-Milchproben. Der blaue Bereich des Diagramms ist unterhalb des diskutierten Richtwertes für ESL-Milch (12 mg Furosin/100 g Protein). Diese acht Milchproben wurden daher besonders schonend erhitzt.

Zehn der untersuchten Proben haben einen Furosingehalt von 12-15 mg/100 g Protein, sie stellen den grünen Bereich des Diagramms dar.

Der gelbe Teil des Diagramms beinhaltet 13 Milchproben mit einem Furosingehalt von 15-38 mg Furosin/100g Protein. Einen Furosingehalt von 38-50 mg Furosin haben 14 der untersuchten ESL-Milchproben. Der braune Bereich beinhaltet 26 der untersuchten Milchproben. Davon sind drei Proben lactosefrei und sieben mit Protein oder Calcium angereichert.

Man kann anhand dieses Diagramms feststellen, dass der Furosingehalt von mehr als der Hälfte der untersuchten ESL-Milchproben über dem diskutierten Richtwert liegt.

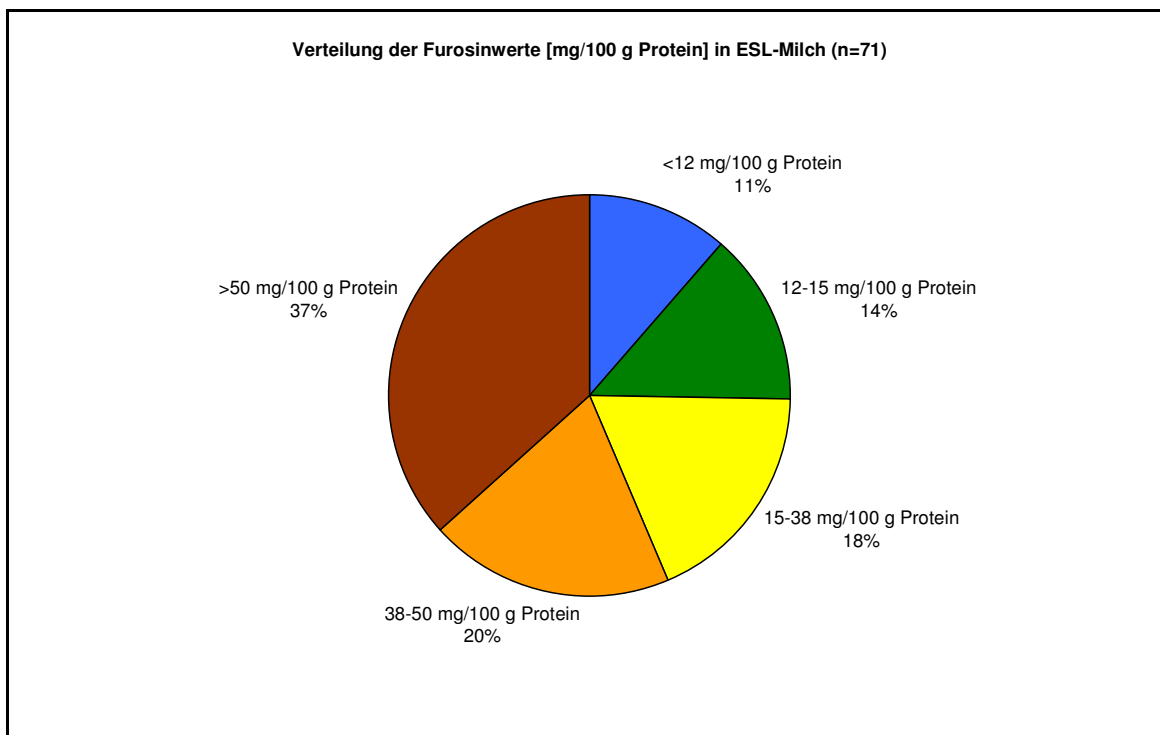


Abbildung 4.26 Verteilung der Furosinwerte in ESL-Milch (n=71)

4.1.5.4 UHT-Milch

Es wurden 16 UHT-Milchproben auf ihren Furosingehalt untersucht. Diese ergaben einen Mittelwert von 204 mg Furosin/100 g Protein. Der Furosingehalt in UHT-Milch ist abhängig vom angewandten Verfahren (direkt oder indirekt) und sollte einen Furosingehalt zwischen 30-240 mg Furosin/100 g Protein haben [KRAUSE, 2005].

Die Abbildung 4.27 zeigt eine genaue Aufteilung des Furosingehaltes der 16 untersuchten UHT-Milchproben. Bei vier der untersuchten UHT-Milchproben überschreitet der Furosingehalt den angegebenen Bereich. Es handelt sich bei diesen um lactosefreie UHT-Milch. Der höchste gemessene Furosingehalt war 485 mg Furosin/100g Protein.

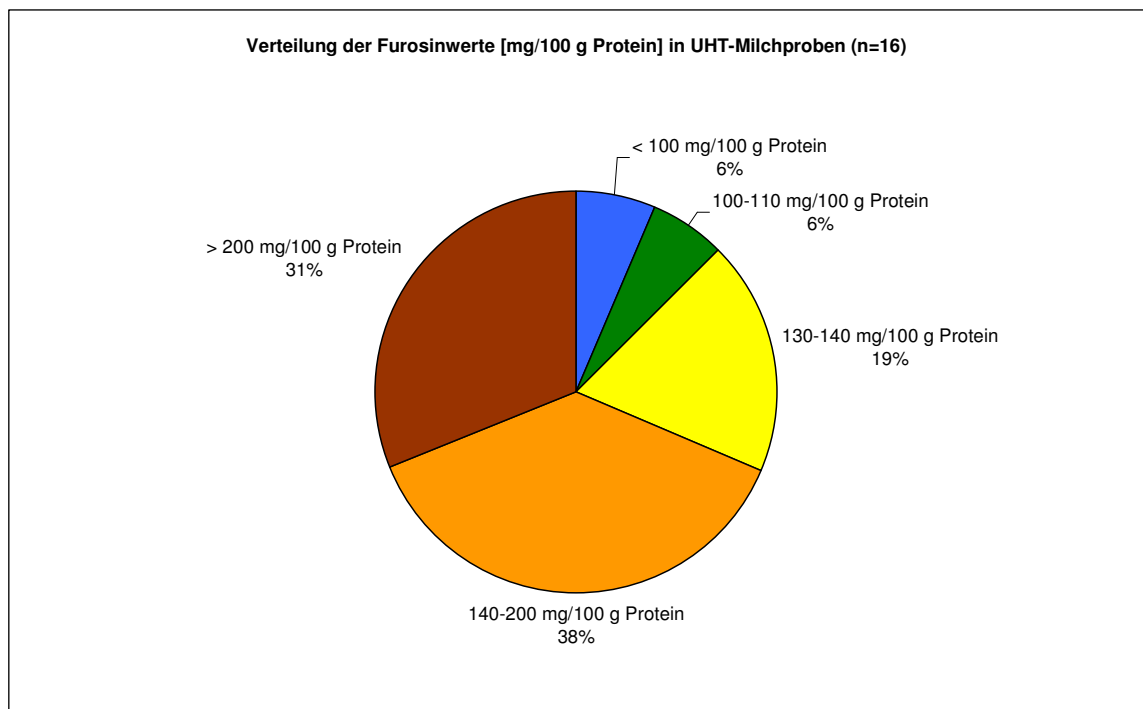


Abbildung 4.27 Verteilung der Furosinwerte in UHT-Milch (n=16)

Die Ergebnisse aller Proben werden in Kapitel 4.4 zusammengefasst.

4.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in Milch (nach Kjeldahl)

4.2.1 Berechnung des Gesamtproteingehalt in verschiedenen Milchproben

Nach dem Aufschluss der organischen Substanzen mit Schwefelsäure (nach der Methode von Kjeldahl) kann der Stickstoffanteil bestimmt werden. Danach kann mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors der Gesamtprotein- oder Rohproteingehalt berechnet werden (MATISSEK und STEINER, 2006).

$$P = \frac{(a - b) * 1,4008 * F}{E}$$

Tabelle 4.5 Erklärung der Gesamtproteinberechnung [MATISSEK und STEINER, 2006]

a	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/l) im Hauptversuch in ml
b	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/l) im Blindversuch in ml
F	Umrechnungsfaktor (bei Milch 6,38) zur Errechnung des Proteingehaltes
E	Probeneinwaage in g
1,4008	1 ml Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/l) entspricht 1,4008 mg Stickstoff
P	Proteingehalt in Prozent

Die Milchproben wurden in Doppelbestimmung untersucht, wobei die Analyse bei Abweichungen von mehr als 5% wiederholt wurde. In der Tabelle 4.9 werden die Gesamtproteinberechnungen aller Milchproben zusammengefasst.

4.3 Natives β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin als Erhitzungsindikatoren in Milch mittels RP-HPLC

4.3.1 Kalibration

Zur Ermittlung von α -Lactalbumin und nativem β -Lactoglobulin in den untersuchten Milchproben muss zuerst eine Kalibration durchgeführt werden. Dazu wird ein Standard benötigt. Der Anteil von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin verhält sich im Standard genauso wie in den Milchproben (Kapitel 3.4.2). Der Standard wird in sechs unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Jede Konzentration wird dreimal injiziert, wodurch zwei Kalibrationsgeraden erstellt werden (eine Kalibrationsgerade für α -Lactalbumin und eine Kalibrationsgerade für β -Lactoglobulin), die zur quantitativen Analyse des α -Lactalbumins und des nativen β -Lactoglobulins herangezogen werden.

Tabelle 4.6 Werte der α -Lactalbuminkalibrierung

α -Lactalbumin ($\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$)	Fläche	α -Lactalbumin ($\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$)	Fläche
0,1	486150	0,8	3469451
0,1	476931	0,8	3526109
0,1	481340	0,8	3320781
0,2	946451	1,2	5249163
0,2	942106	1,2	5351080
0,2	943671	1,2	5273644
0,4	1863801	1,6	6827591
0,4	1864965	1,6	6987076
0,4	1866474	1,6	6915112

Zur Erstellung der α -Lactalbuminkalibrationsgerade (Abbildung 4.28) werden die in der Tabelle 4.6 angegebenen Werte herangezogen.

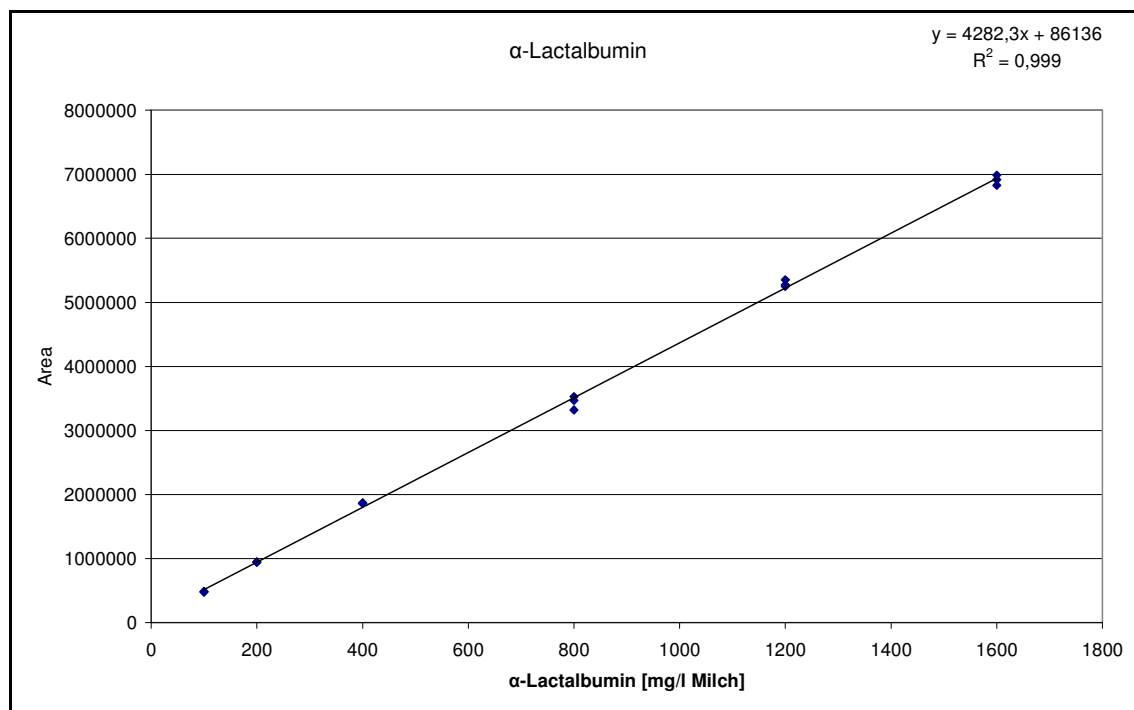


Abbildung 4.28 α -Lactalbuminkalibrationsgerade

Tabelle 4.7 Werte der β -Lactoglobulinkalibrierung

β -Lactoglobulin ($\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$)	Fläche	β -Lactoglobulin ($\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$)	Fläche
0,2	724215	1,6	5967578
0,2	721556	1,6	5981917
0,2	723153	1,6	5521030
0,4	1575923	2,4	8977335
0,4	1547312	2,4	9312336
0,4	1552311	2,4	9019953
0,8	3085755	3,2	11589114
0,8	3088084	3,2	11806432
0,8	3088502	3,2	11751531

Zur Erstellung der β -Lactoglobulinkalibrationsgerade (Abbildung 4.29) werden die in der Tabelle 4.7 angegebenen Werte herangezogen.

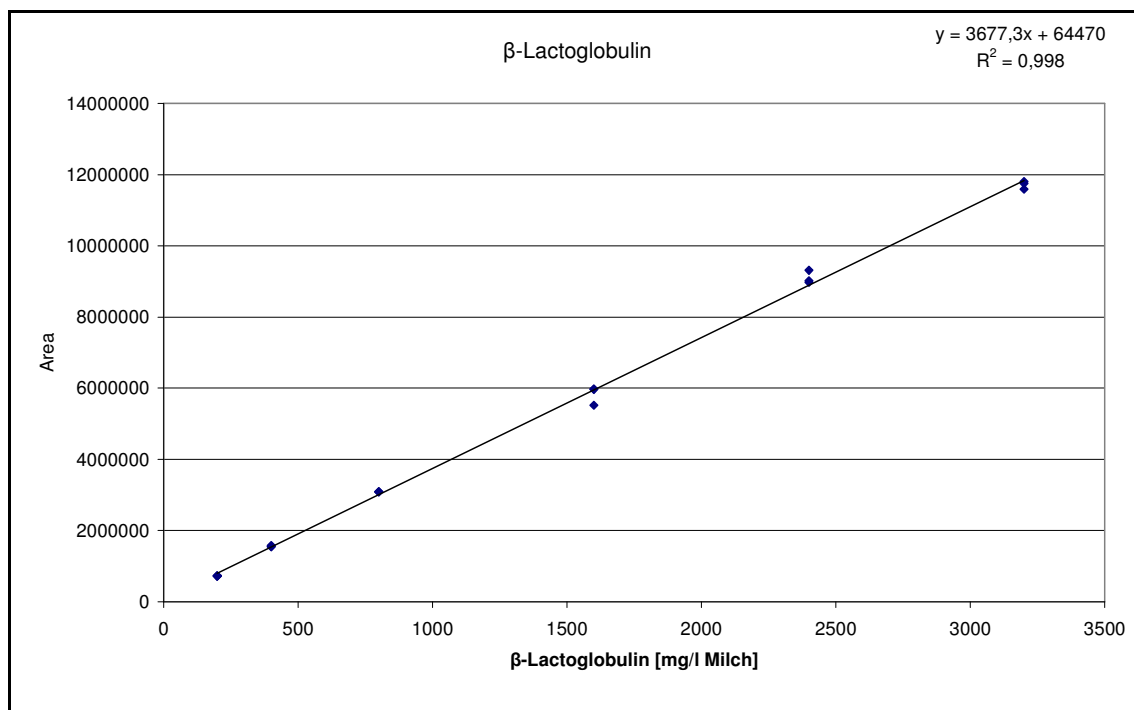


Abbildung 4.29 β -Lactoglobulinkalibrationsgerade

Der Anstieg der sechs unterschiedlichen Standardkonzentrationen ist in den Abbildungen 4.30 bis 4.35 deutlich zu erkennen.

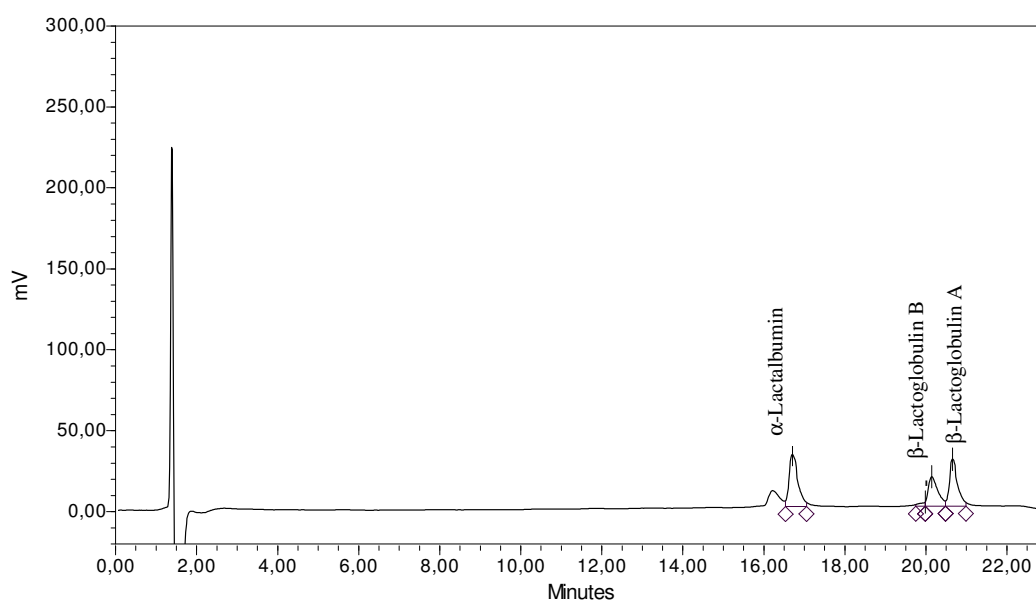


Abbildung 4.30 Standardlösung I (0,1 μ g α -La/10 μ l, 0,2 μ g β -Lg/10 μ l)

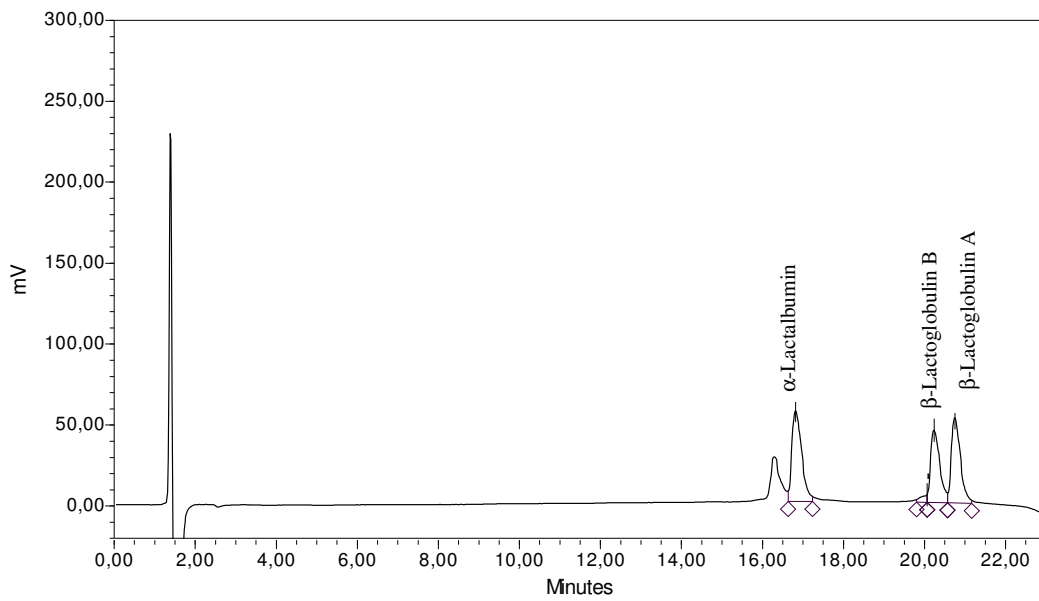


Abbildung 4.31 Standardlösung II (0,2 μ g α -La/10 μ l, 0,4 μ g β -Lg/10 μ l)

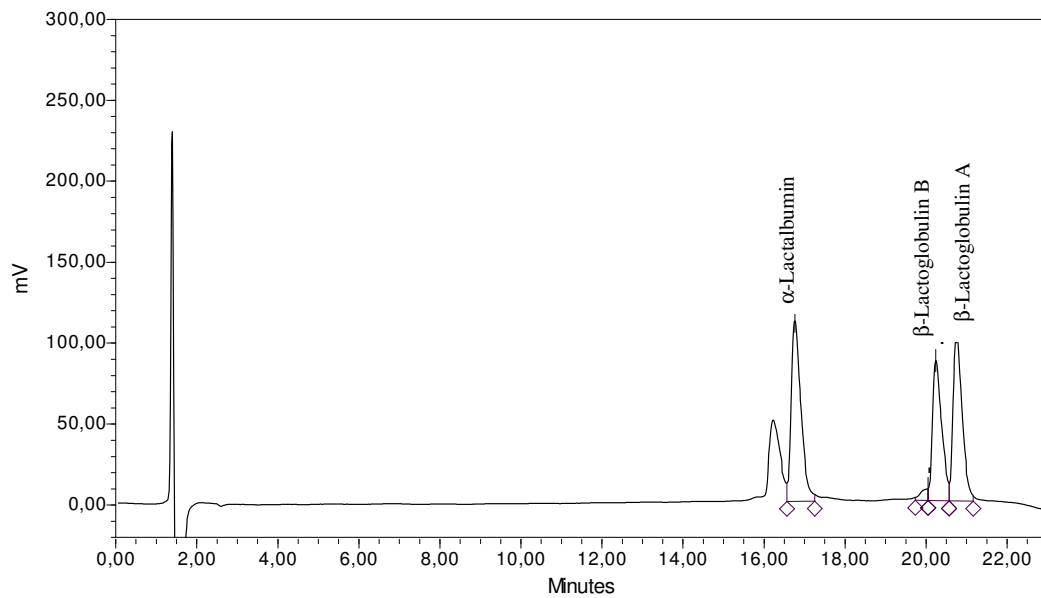


Abbildung 4.32 Standardlösung III (0,4 μ g α -La/10 μ l, 0,8 μ g β -Lg/10 μ l)

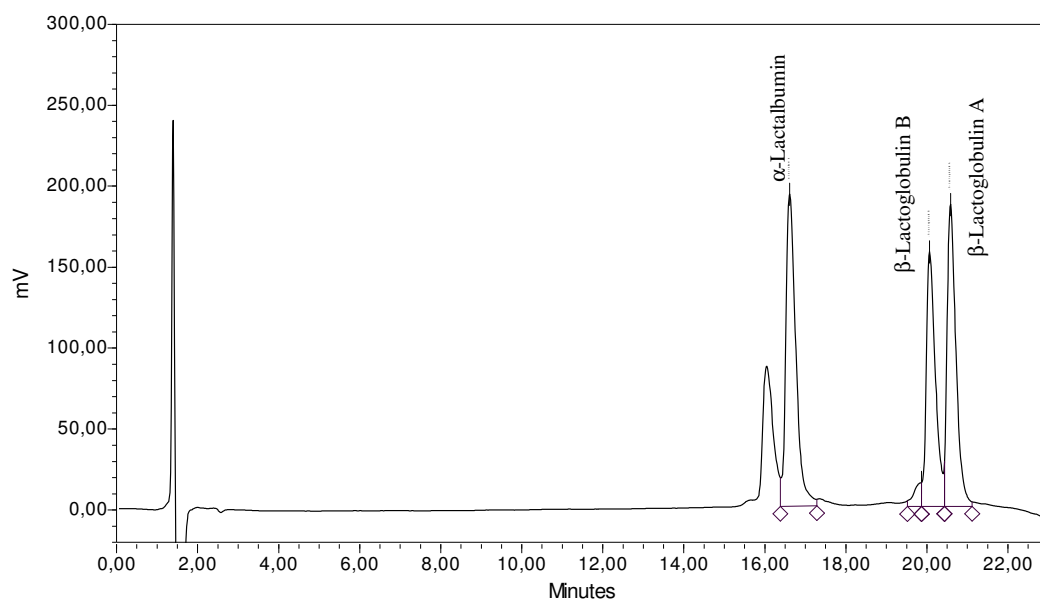


Abbildung 4.33 Standardlösung IV (0,8 μ g α -La/10 μ l, 1,6 μ g β -Lg/10 μ l)

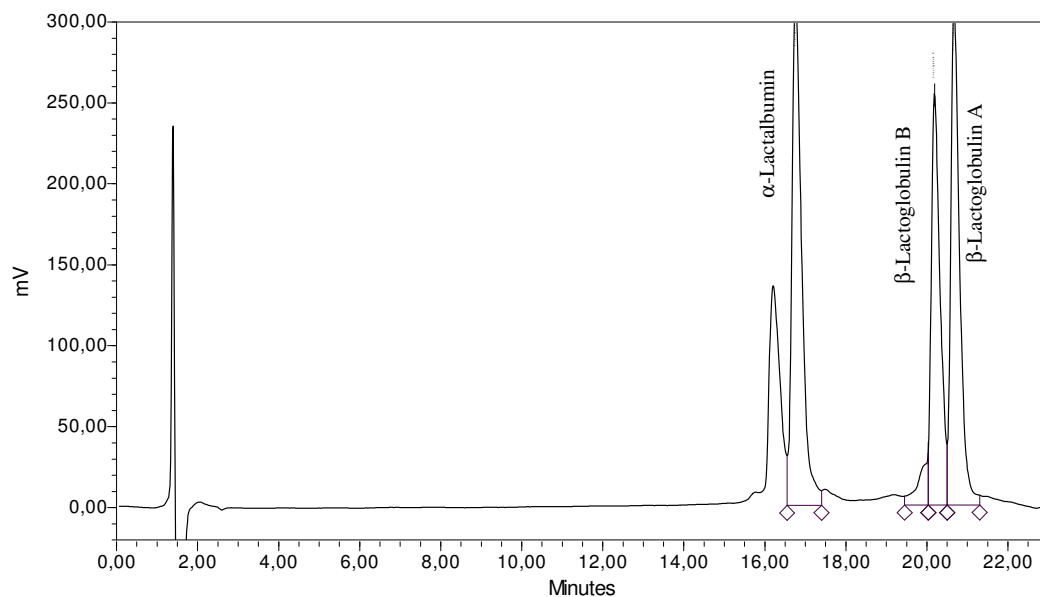


Abbildung 4.34 Standardlösung V (1,2 μ g α -La/10 μ l, 2,4 μ g β -Lg/10 μ l)

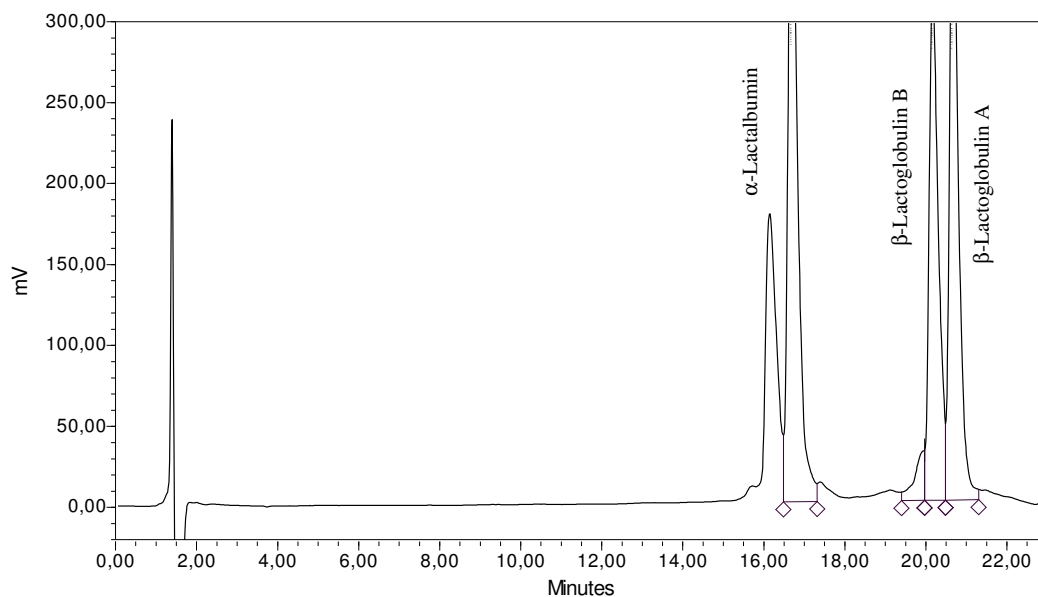


Abbildung 4.35 Standardlösung VI (1,6 µg α -La/10 µl, 3,2 µg β -Lg/10 µl)

4.3.2 Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in Milchproben

Das Chromatogramm der Abbildung 4.36 zeigt eine Rohmilchprobe (Nr. 123, Gemelk von insgesamt 70 Kühen) mit einem β -Lactoglobulingehalt von 5214,5 mg β -Lg/l Milch und einem α -Lactalbumingehalt von 1275 mg α -La/l Milch.

Die Abbildung 4.37 zeigt ein Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Nr. 130) mit einem β -Lactoglobulingehalt von 3045,0 mg β -Lg/l Milch und einem α -Lactalbumingehalt von 939,4 mg α -La/l Milch.

Der β -Lactoglobulingehalt ist bei der Rohmilchprobe wesentlich höher als bei der pasteurisierten Milchprobe. Vergleicht man den α -Lactalbumingehalt der beiden Milchproben, ist nur eine geringfügige Verringerung des α -Lactalbumins ersichtlich. Die Denaturierung des α -Lactalbumins beginnt erst bei 72 °C und ist daher auch das hitzestabilste Molkeprotein [TÖPEL, 2004].

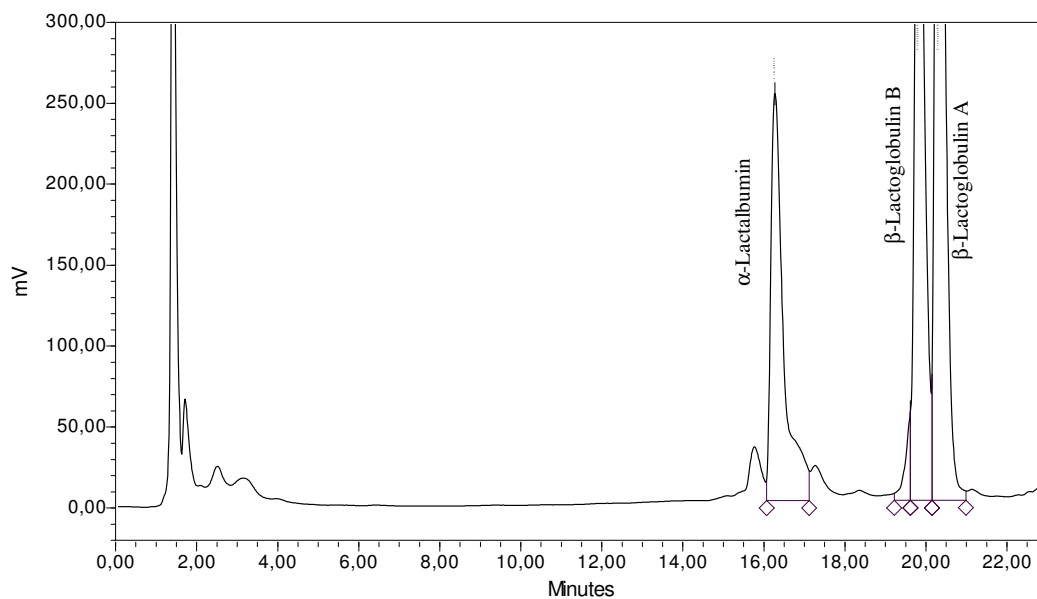


Abbildung 4.36 Chromatogramm einer Rohmilch (Nr.123)

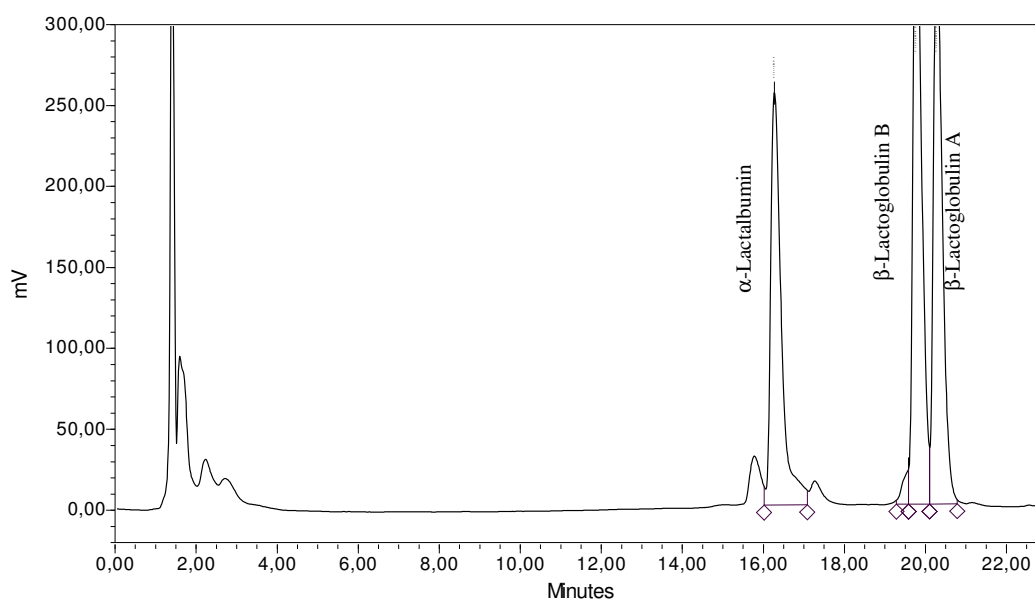


Abbildung 4.37 Chromatogramm einer pasteurisierten Milch (Nr.130)

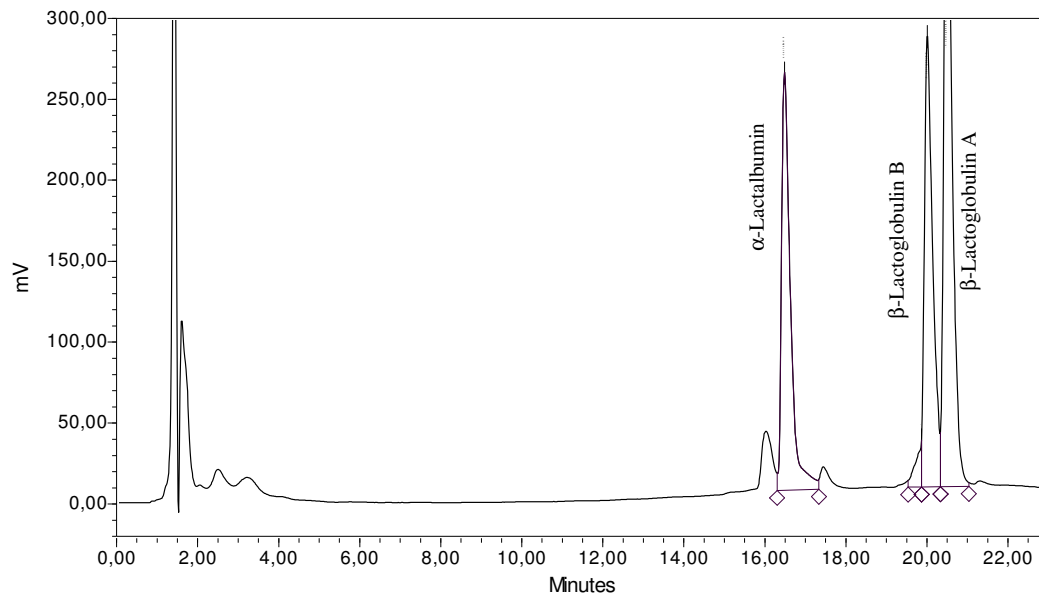


Abbildung 4.38 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.127)

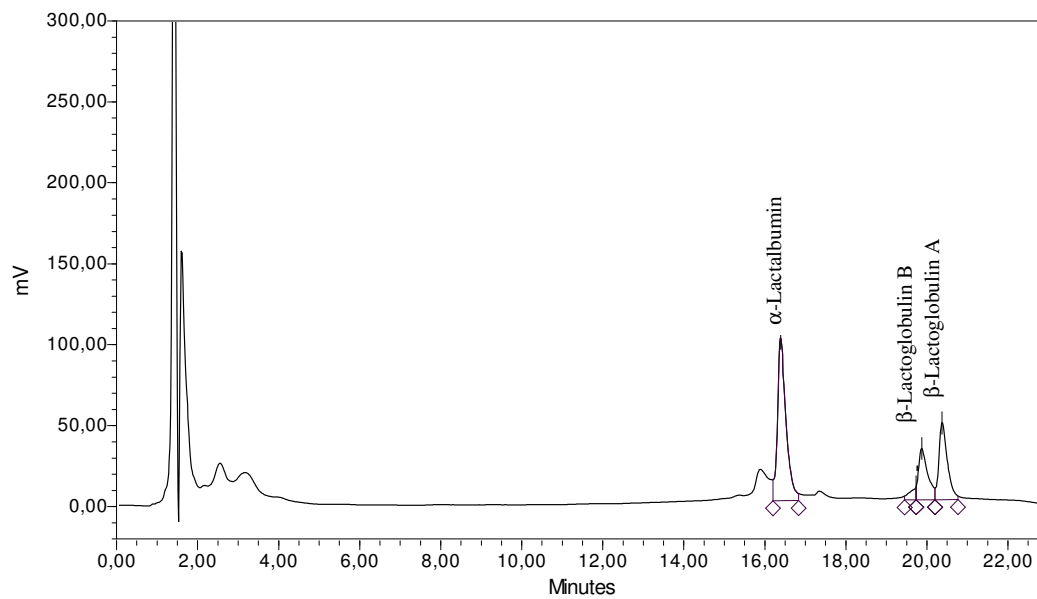


Abbildung 4.39 Chromatogramm einer ESL-Milch (Nr.124)

Die Abbildungen 4.38 und 4.39 zeigen ESL-Milchproben. Man kann anhand dieser beiden Chromatogramme deutliche Unterschiede im β -Lactoglobulingehalt und im α -Lactalbumingehalt erkennen. Anhand des Molkeproteingehaltes der beiden Milchproben kann man darauf schließen, dass die Milchprobe Nr. 127 schonender erhitzt

wurde als die Milchprobe Nr. 124. Diese Aussage konnte auch anhand des Furosingehaltes (Kapitel 4.1.5) der beiden Milchproben bestätigt werden.

In der Tabelle 4.8 werden die Ergebnisse des β -Lactoglobulingehalts und des α -Lactalbumingehalts der untersuchten Milchproben zusammengefasst. Ein β -Lactoglobulingehalt unter 400 mg/l ist bei ESL-Milchproben ein Hinweis auf eine indirekte Erhitzung durch Röhren- oder Plattenwärmetauscher. Bei einem β -Lactoglobulingehalt von ca. 1200 mg/l spricht man von direkter Erhitzung durch Injektion oder Infusion. Der α -Lactalbumingehalt in ESL-Milch beträgt bei indirektem und direktem Verfahren ca. 450-550 mg/l. Wird eine Mikrofiltration angewendet ist ein α -Lactalbumingehalt von ca. 700-800 mg/l zu erwarten [EBERHARD et al., 2003; TÖPEL, 2004].

Anhand des β -Lactoglobulin- und α -Lactalbumingehalts kann man darauf schließen, dass bei den ESL-Milchproben Nr. 126 und 127 eine Mikrofiltration oder Tiefenfiltration angewendet wurde.

Tabelle 4.8 Ergebnistabelle (α -Lactalbumingehalt und β -Lactoglobulingehalt)

MHD	Name	Probe	Milch- art	%Fett	α -Lg mg/l	β -Lg mg/l
25.01.2009	A faire Milch 3022GF 01021F	126	ESL	3,5	942,1	2857,5
29.01.2009	Biones Bio L1.1/008/21:25	127	ESL	3,5	886,5	2791,5
08.02.2009	Ja Natürlich L1 08:50	134	ESL	3,6	537,1	278,4
26.01.2009	Ja Natürlich L1 09:46	133	ESL	3,6	371,6	185,9
08.01.2009	Ja Natürlich L1 12:53	135	ESL	1,0	522,1	217,0
25.01.2009	Ja Natürlich L1 12:53	136	ESL	1,0	453,0	192,4
09.01.2009	Ja Natürlich L1 14:17	132	ESL	3,6	498,0	226,4
18.01.2009	Ja Natürlich L1 15:58	122	ESL	3,6	542,0	300,2
25.01.2009	Ja Natürlich L1 16:38	137	ESL	1,0	509,9	229,7
02.02.2009	NÖM 3018 10:58	124	ESL	1,5	321,9	330,3
11.01.2009	Ja Natürlich L1 12:32	130	Past.	3,6	939,4	3045,0
19.01.2009	Ja Natürlich L2 16:00	131	Past.	3,6	1135,5	3416,5
19.12.2008	Ja Natürlich L2 16:34	129	Past.	3,6	918,3	3429,0
11.01.2009	Goldfuss	125	RM	Nat.	1515,5	5210,0
11.01.2009	Stadler Raxendorf	123	RM	Nat.	1275,0	5214,0

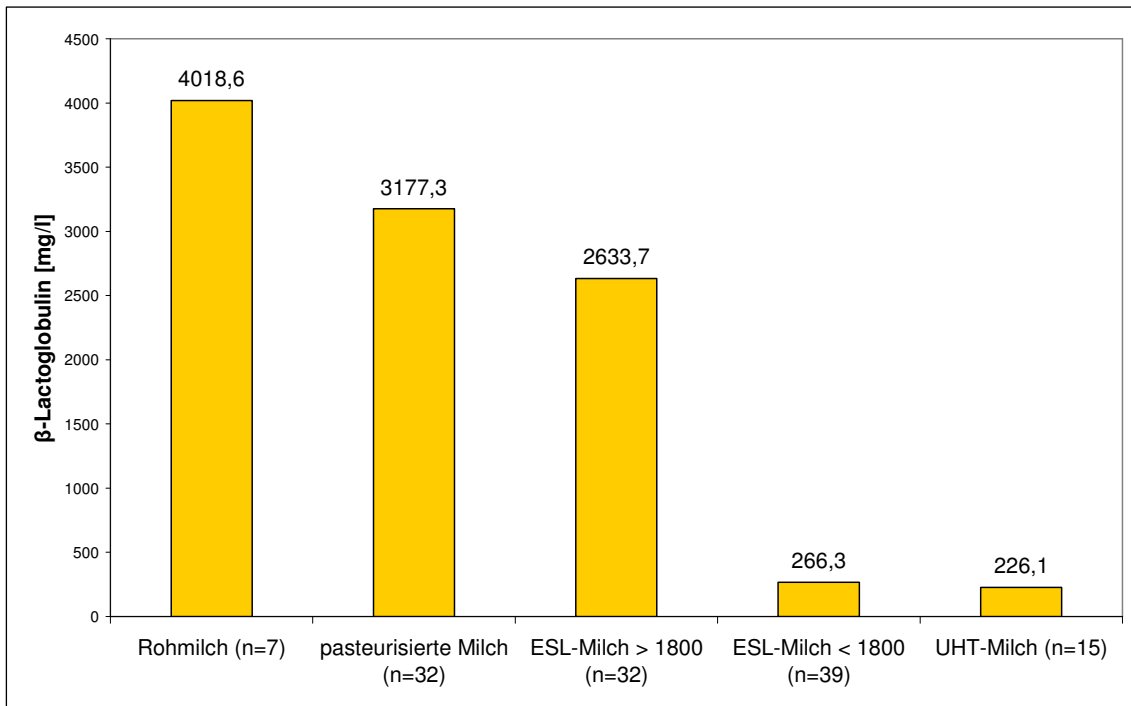


Abbildung 4.40 Mittelwerte des nativen β -Lactoglobulins aller Milchproben

In der Abbildung 4.40 wurden die Ergebnisse einer vorangegangenen Diplomarbeit [MEIER, 2009] und die Werte der Tabelle 4.8 in fünf Gruppen zusammengefasst. Anschließend wurde von jeder Gruppe der Mittelwert des nativen β -Lactoglobulins berechnet. Bei ESL-Milch wird zusätzlich differenziert (siehe Kapitel 4.3.2.3)

4.3.2.1 Rohmilch

Die sieben untersuchten Rohmilchproben stammten direkt von landwirtschaftlichen Betrieben oder aus Bioläden (waren als Rohmilch gekennzeichnet). Die Analysen ergaben einen Mittelwert von 4018,6 mg β -Lg/l. Es konnte weiters festgestellt werden, dass der native β -Lactoglobulingehalt in Rohmilchproben, die direkt von landwirtschaftlichen Betrieben stammten, wesentlich höher war als jener aus Bioläden.

4.3.2.2 Pasteurisierte Milch

Der Richtwert für den nativen β -Lactoglobulingehalt in pasteurisierter Milch liegt bei 3100 mg/l [GALMANN et al., 2001]. Die untersuchten Milchproben ergaben einen Mittelwert von 3177,3 mg β -Lg/l. Dieses Ergebnis liegt nahe dem in der Literatur beschriebenen Wert.

Die Abbildung 4.41 zeigt eine genaue Aufteilung des nativen β -Lactoglobulingehaltes der 32 analysierten Proben.

Anmerkung: Für die statistische Auswertung der Abbildungen 4.41 und 4.42 wurden die Ergebnisse einer vorangegangenen Diplomarbeit und die Werte der Tabelle 4.8 herangezogen.

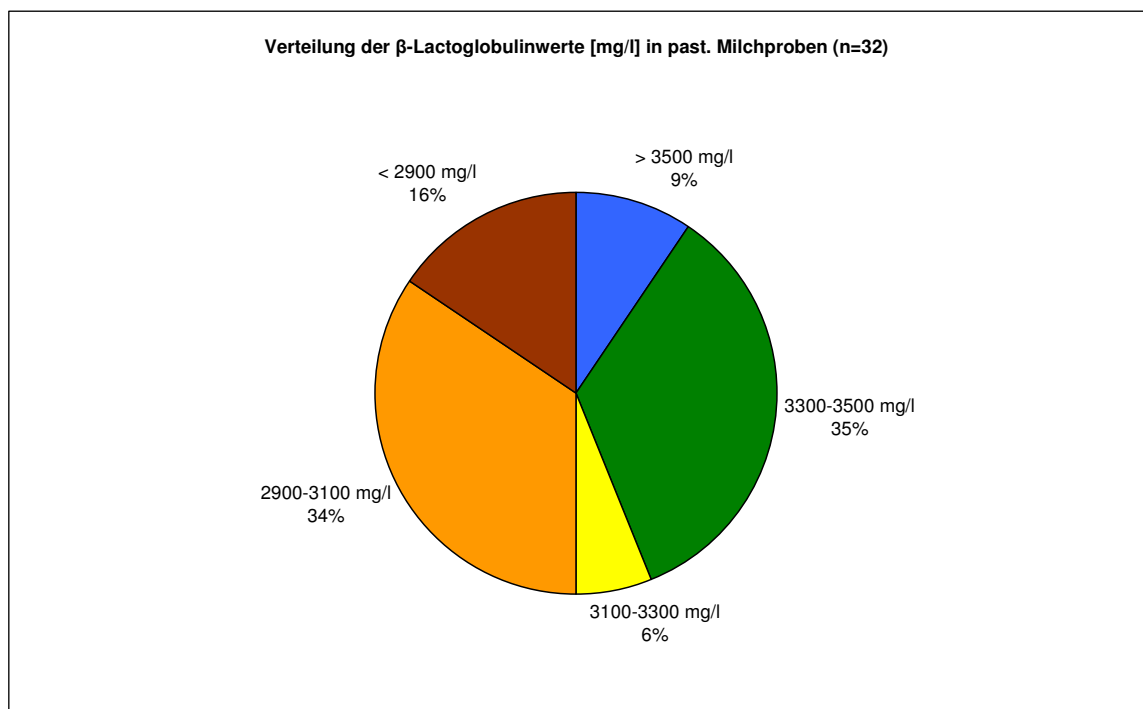


Abbildung 4.41 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen pasteurisierten Milchproben

4.3.2.3 ESL-Milch

In der Abbildung 4.40 wurde die ESL-Milch aufgrund der großen Unterschiede des nativen β -Lactoglobulingehaltes in zwei Gruppen eingeteilt, Typ 1 β -Lactoglobulingehalt ≥ 1800 mg/l und Typ 2 β -Lactoglobulingehalt < 1800 mg/l. Diese Einteilung der Typen wurde durchgeführt, da keine β -Lactoglobulinwerte zwischen 1780 mg/l und 500 mg/l lagen. Die ESL-Milch Typ 1 erzielte einen Mittelwert von 2633,7 mg β -Lg/l, während die ESL-Milch Typ 2 nur einen Mittelwert von 266,3 mg β -Lg/l erreichte.

Als Richtwert für ESL-Milch wird ein nativer β -Lactoglobulingehalt von > 1800 mg/l diskutiert [DYCK, 2004]. Es wurden insgesamt 71 ESL-Milchproben auf ihren nativen β -Lactoglobulingehalt untersucht und 31 Proben lagen innerhalb des Richtwertes. Eine weitere Probe lag bei 1776,3 mg/l und daher sehr nahe am diskutierten Richtwert. Aus diesem Grund wurde die Probe zur ESL-Milch Typ 1 gezählt. Die restlichen 39 Proben lagen unter 500 mg β -Lg /l. Die Abbildung 4.42 zeigt eine genaue Aufteilung.

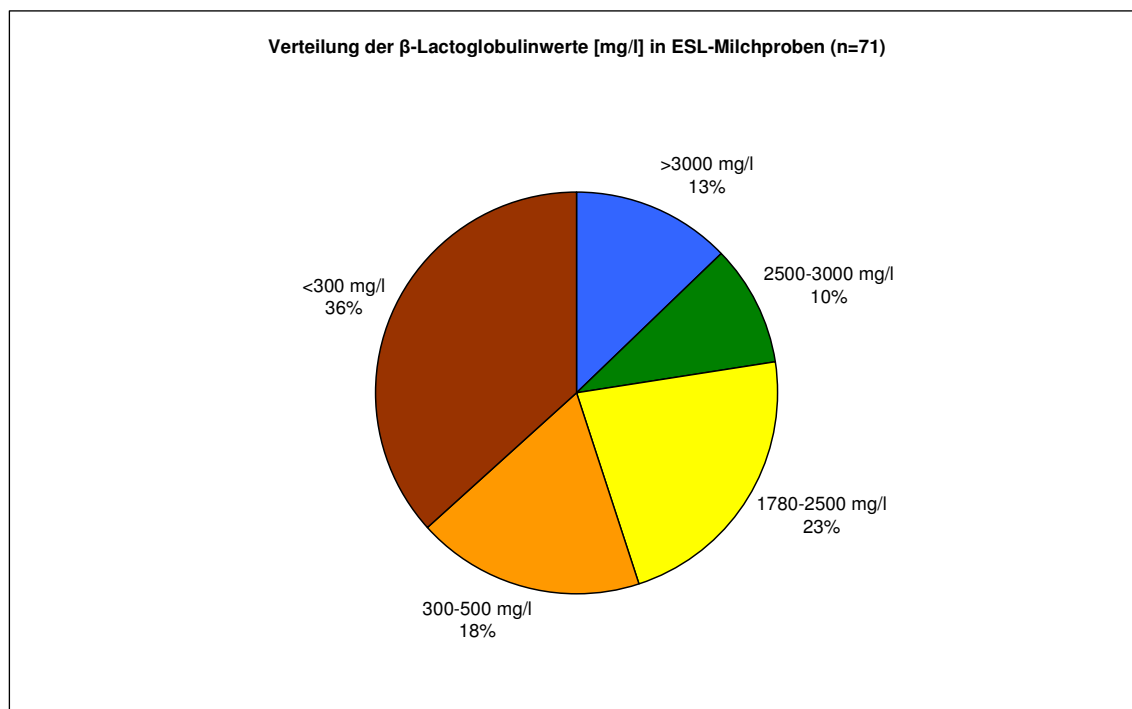


Abbildung 4.42 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen ESL-Milchproben

4.3.2.4 UHT- Milch

Um einen besseren statistischen Überblick der verschiedensten Milcharten (Rohmilch, pasteurisierte Milch, ESL-Milch und UHT-Milch) zu ermöglichen, wurden die analytischen Ergebnisse des nativen β -Lactoglobulins in UHT-Milch einer vorangegangenen Diplomarbeit [MEIER, 2009] herangezogen. Es wurden 16 UHT-Milchproben auf ihren Gehalt an nativem β -Lactoglobulin untersucht. Eine Probe konnte aufgrund eines zu schlechten Ergebnisses mit der Millenium³² Software nicht ausgewertet werden und wurde daher in der Statistik nicht berücksichtigt.

Es ergab sich ein Mittelwert von 226,1 mg β -Lg/l. Die Abbildung 4.43 zeigt eine genaue Aufteilung des nativen β -Lactoglobulingehaltes der untersuchten Proben.

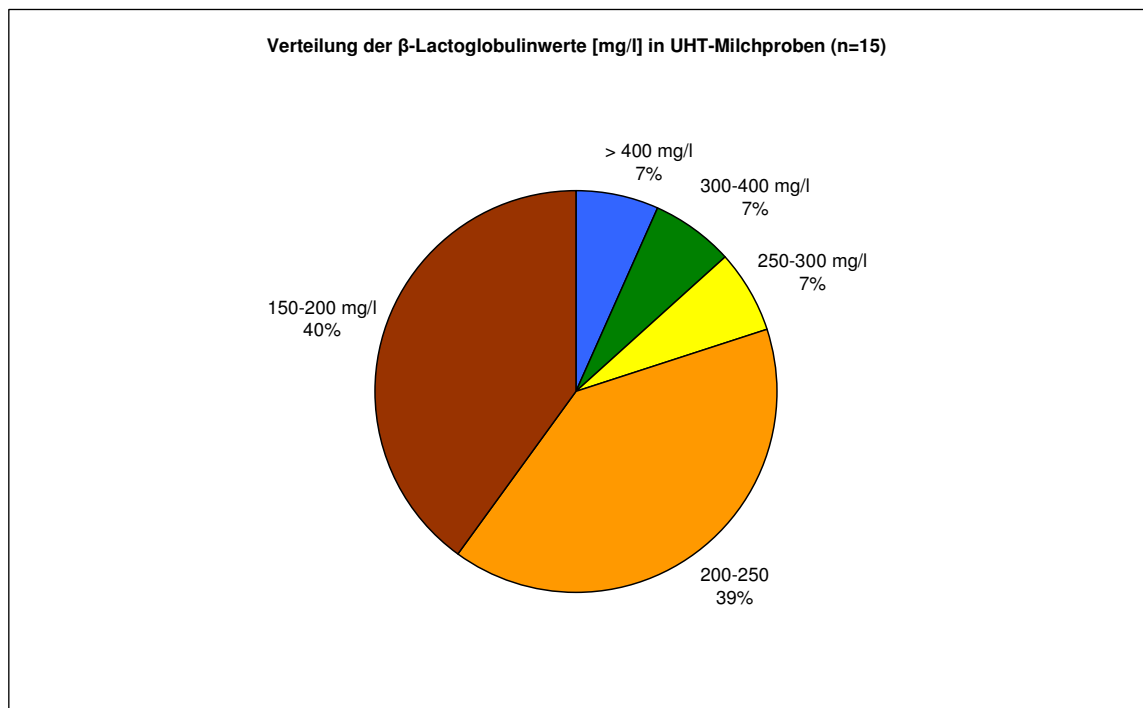


Abbildung 4.43 Zusammenfassung des nativen β -Lactoglobulins in allen UHT-Milchproben

4.4 Vergleich von Furosin mit nativem β -Lactoglobulin

Bei den analysierten Milchproben handelt es sich teilweise um eingefrorene Proben, deren β -Lactoglobulingehalt bereits in vorangegangener Diplomarbeit [MEIER, 2009] untersucht wurde. Um einen aussagekräftigen Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin zu erzielen, wurden diese Werte in der Statistik mitberücksichtigt.

Anhand der Abbildung 4.44 kann man erkennen, dass der Anstieg des Furosingehaltes mit einer Verringerung des β -Lactoglobulingehalts in Verbindung steht. Je höher die angewendete Wärmebehandlung umso höher der Furosingehalt (Maillard-Reaktion) und desto niedriger der β -Lactoglobulingehalt (wird denaturiert). Weiters kann man darauf schließen, dass die ESL-Milchproben Typ 1 (β -Lactoglobulingehalt ≥ 1800 mg/l und Furosin ≤ 38 mg/100 g Protein) schonender erhitzt wurden als die ESL-Milchproben Typ 2 (β -Lactoglobulingehalt < 1800 mg/l und Furosin > 38 mg/100 g Protein).

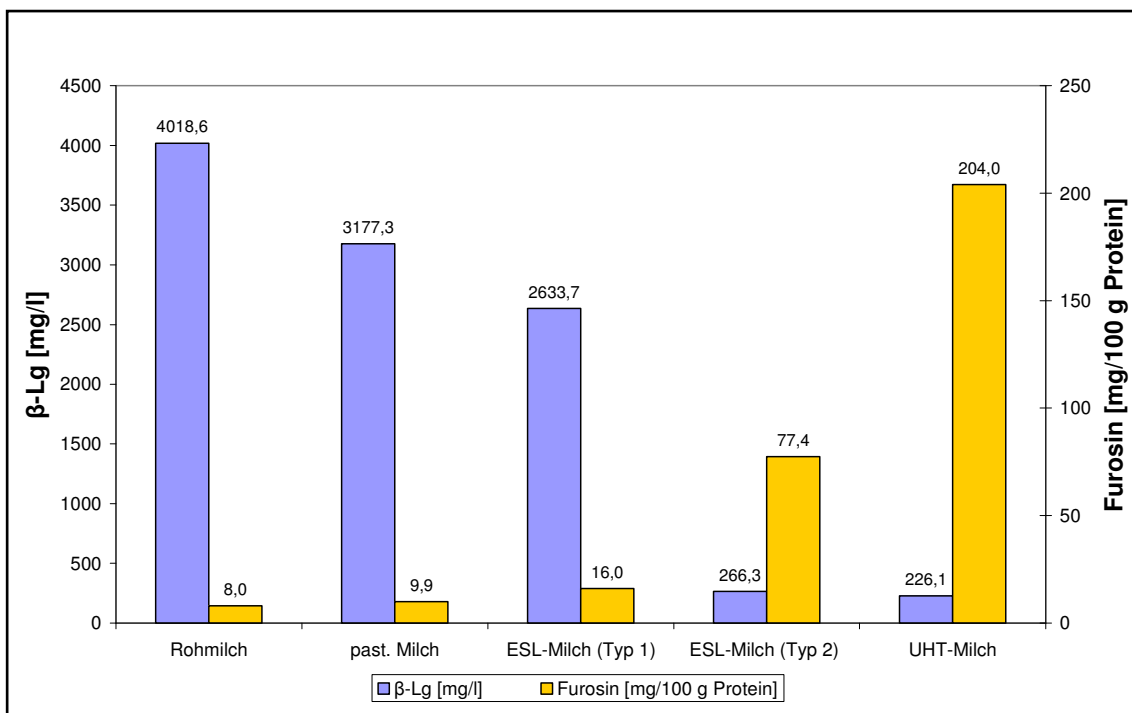


Abbildung 4.44 Mittelwerte (Furosin und β -Lactoglobulin) der untersuchten Milchproben

Die Abbildung 4.45 zeigt den Zusammenhang von 125 Milchproben in Bezug auf Furosin- und nativem β -Lactoglobulingehalt. Die Messwerte weisen eine hohe Abweichung auf, wie anhand des Bestimmtheitsmaßes ersichtlich ist. Daher wurden bei der Erstellung der Kurve in der Abbildung 4.46 die 7 lactosefreien und die 8 mit Protein angereicherten Milchproben nicht miteinbezogen. Das Bestimmtheitsmaß dieser Kurve wurde dadurch wesentlich verbessert. Es kann trotz der unterschiedlichen Reaktionskinetik bei der β -Lactoglobulindenaturierung und der Furosinbildung ein Zusammenhang von nativen β -Lactoglobulin und Furosingehalt festgestellt werden.

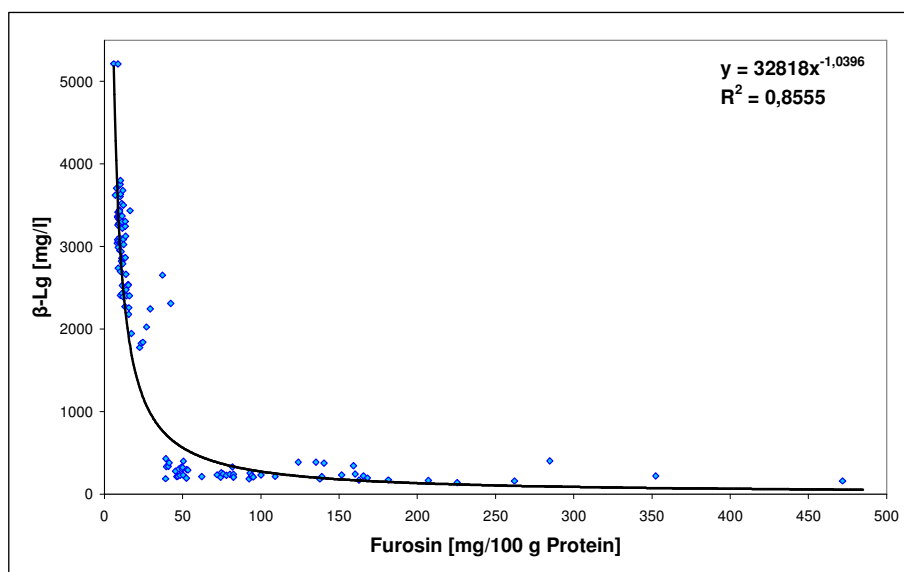


Abbildung 4.45 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 125 Milchproben

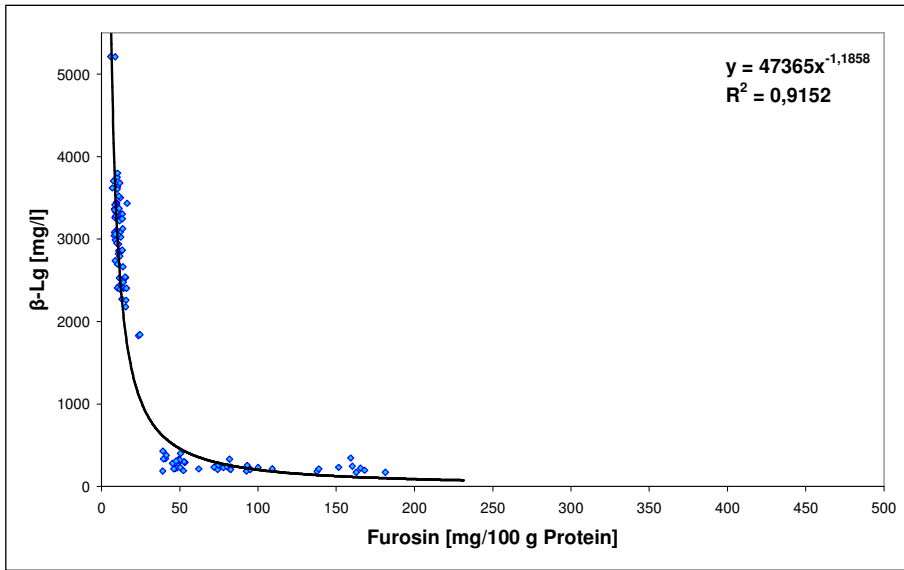


Abbildung 4.46 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosine in RM, pasteurisierte, ESL- und UHT-Milch (ohne der 7 lactosefreien und der 8 proteinangereicherten Proben)

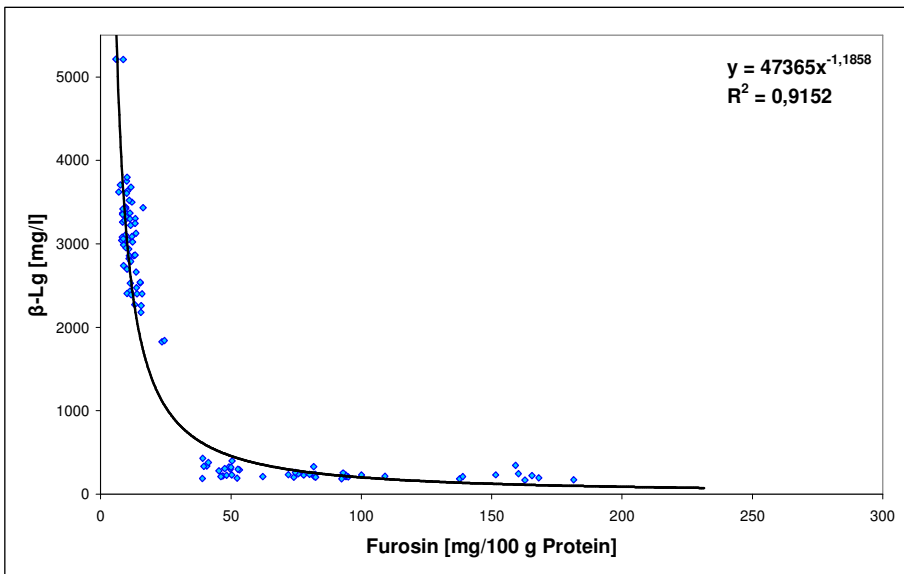


Abbildung 4.47 Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 4.42

4.4.1 Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin in ESL-Milchproben

Die Abbildung 4.48 zeigt die prozentuelle Aufteilung des Gehaltes an Furosin und an β -Lactoglobulin in 71 untersuchten ESL-Milchproben. Die Bereiche blau, grün und gelb stellen die ESL-Milch Typ 1 dar (schonend erhitzt - siehe Abbildung 4.44) und die Bereiche orange und dunkelrot sind gleichzusetzen mit der ESL-Milch Typ 2.

Es gibt eine Probenlücke im Bereich von 500 bis 1780 mg β -Lg/l, daher wurde der Wert von 1780 mg β -Lg/l als Grenze für ESL-Milch Typ 1 herangezogen. Anhand dieses β -Lactoglobulingehaltes wurde der Grenzwert für Furosin der ESL-Milch Typ 1 von 38 mg/100 g Protein ermittelt.

In der Literatur gibt es bereits Grenzwerte für ESL-Milch. Der β -Lactoglobulingehalt soll 1800 mg β -Lg/l nicht unterschreiten und der Furosingehalt darf 12 mg/100 g Protein nicht überschreiten.

Der ermittelte β -Lactoglobulingehalt für ESL-Milch Typ 1 (blauer, grüner und gelber Bereich) entspricht somit den in der Literatur angegebenen Grenzwert für ESL-Milch. Den in der Literatur angegebenen Grenzwert für Furosin konnten nur 9 Milchproben erfüllen. Diese Proben lagen auch innerhalb des Grenzwertes für β -Lactoglobulin. ESL-Milch Typ 2 (oranger und dunkelroter Bereich) entspricht nicht den in der Literatur angegebenen Grenzwerten für β -Lactoglobulin und Furosin. Weiters kann davon ausgegangen werden, dass die ESL-Milchproben Typ 2 indirekt durch Röhren- oder Plattenwärmetauscher erhitzt worden sind.

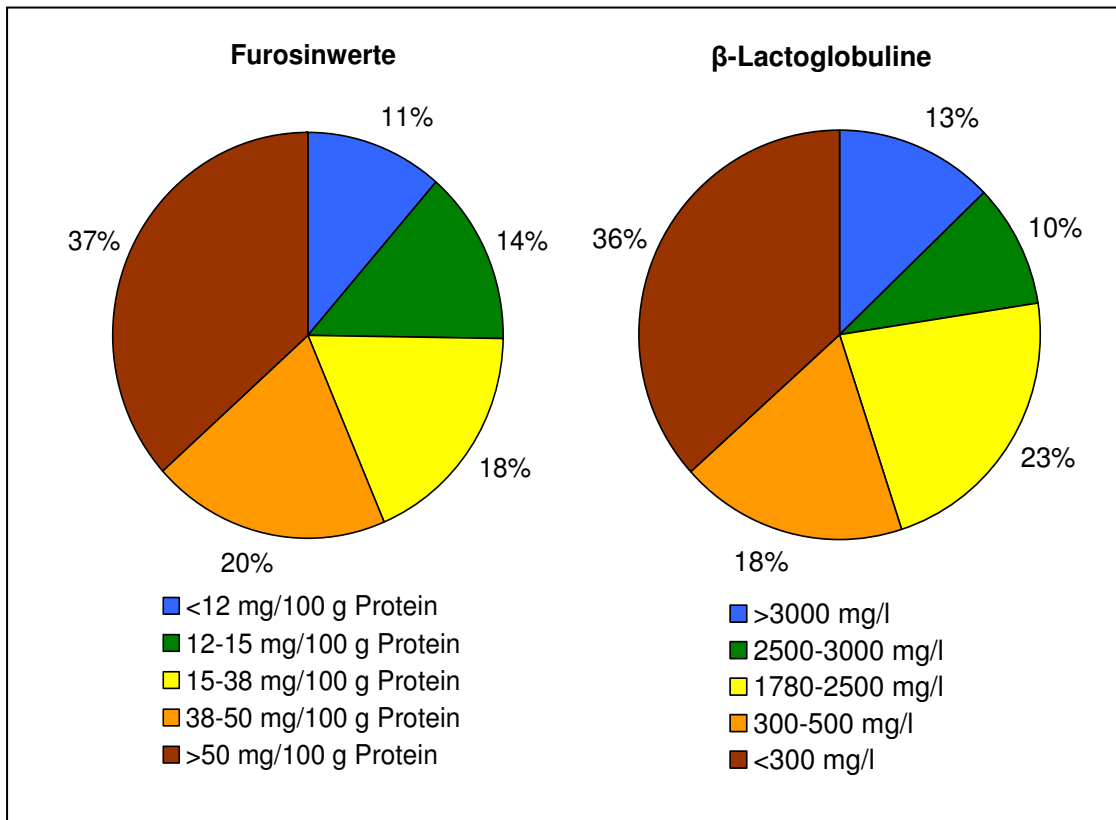


Abbildung 4.48 Vergleich von Furosine mit β -Lactoglobulin in ESL-Milchproben

Anhand der prozentuellen Aufteilung (Abbildung 4.48) kann ein Zusammenhang von nativem β -Lactoglobulin und Furosingehalt festgestellt werden.

Der Zusammenhang von den 71 untersuchten ESL-Milchproben in Bezug auf Furosin- und nativem β -Lactoglobulingehalt wird in Abbildung 4.49 noch einmal dargestellt. Aufgrund der hohen Abweichung wurden die 3 lactosefreien und die 8 mit Protein angereicherten Milchproben in Abbildung 4.50 nicht berücksichtigt. Es konnte dadurch ein besseres Bestimmtheitsmaß erzielt werden.

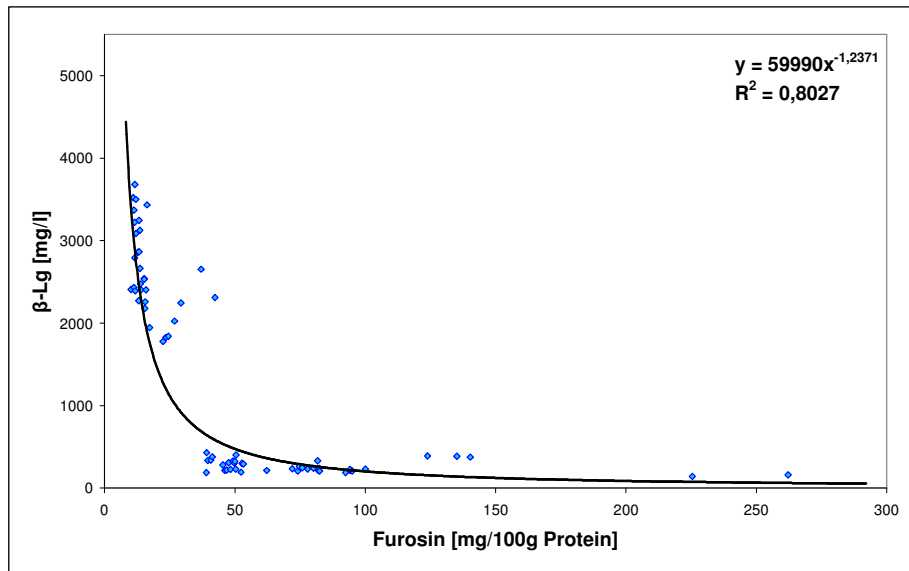


Abbildung 4.49 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 71 untersuchten ESL-Milchproben

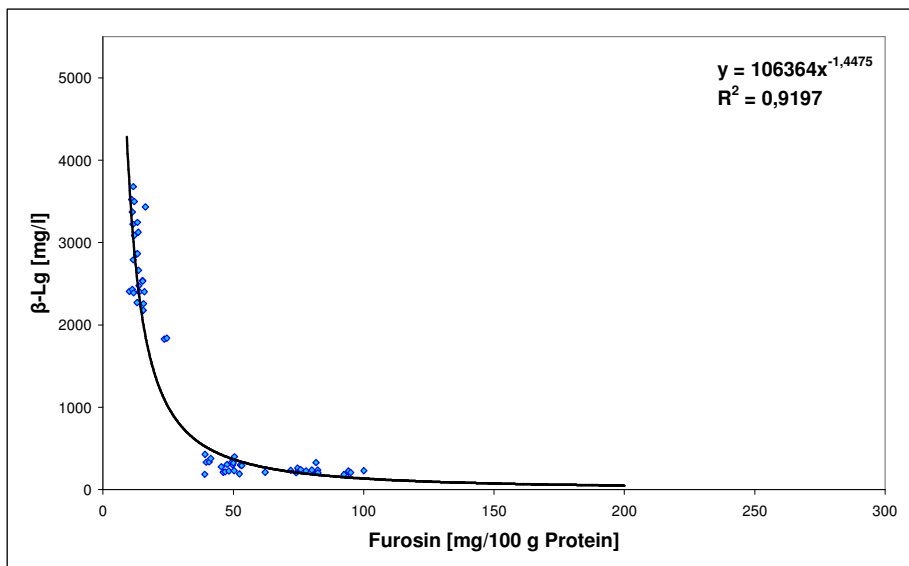


Abbildung 4.50 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Milchproben (ohne der 3 lactosefreien und der 8 proteinangereicherten Proben)

Die Abbildung 4.51 zeigt die 37 untersuchten ESL-Vollmilchproben. Zur Verbesserung des Bestimmtheitsmaßes von Furosin mit β -Lactoglobulin wurden die 3 mit Protein angereicherten Milchproben in Abbildung 4.52 nicht miteinbezogen.

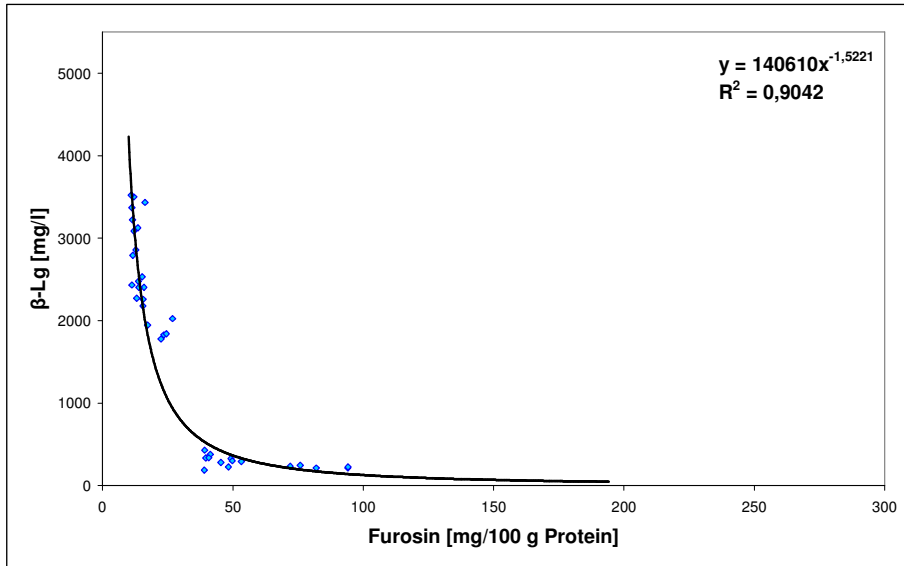


Abbildung 4.51 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 37 ESL-Vollmilchproben

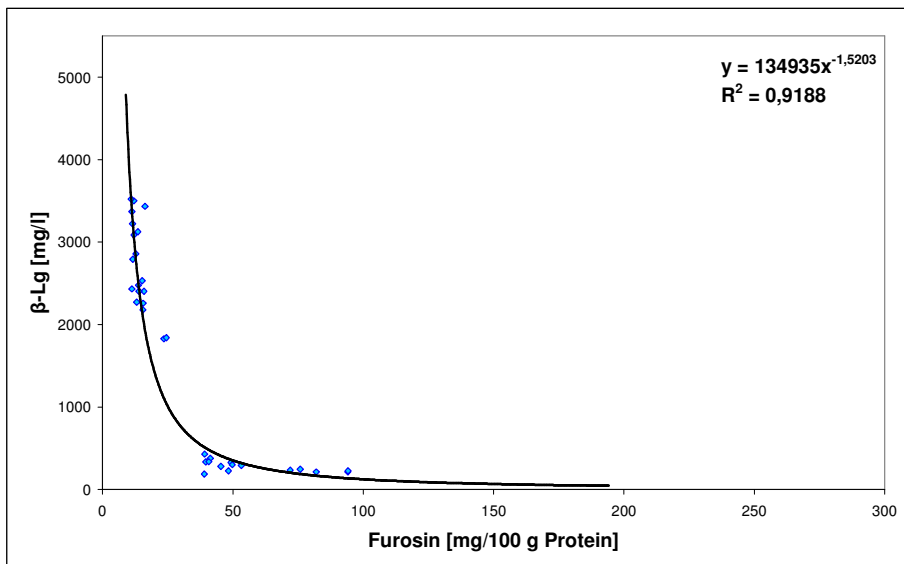


Abbildung 4.52 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Vollmilchproben (ohne der 3 proteinangereicherten Proben)

Die 34 untersuchten ESL-Leichtmilchproben (Abbildung 4.53) ergaben den geringsten Zusammenhang von Furosin mit β -Lactoglobulin, wie anhand des Bestimmtheitsmaßes ersichtlich ist. Das Bestimmtheitsmaß konnte in der Abbildung 4.54 durch den Ausschluss der 3 lactosefreien und der 5 mit Protein angereicherten Milchproben deutlich verbessert werden.

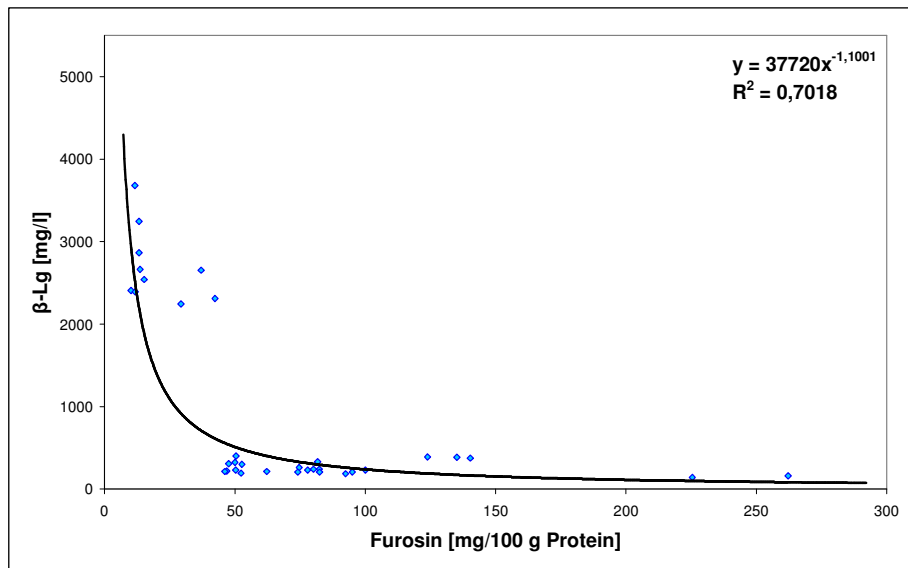


Abbildung 4.53 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin aller 34 ESL-Leichtmilchproben

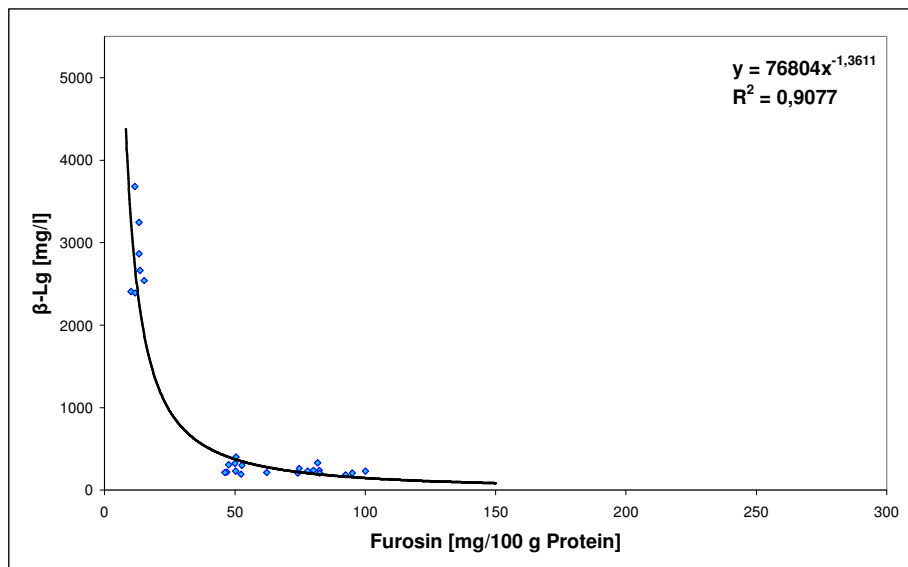


Abbildung 4.54 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in ESL-Leichtmilchproben (ohne der 3 lactosefreien und der 5 proteinangereicherten Proben)

4.4.2 Vergleich von Furosin mit β -Lactoglobulin (in RM, pasteurisierter Milch und UHT-Milch)

Die besten Ergebnisse bei der Analyse des Zusammenhangs von Furosin mit β -Lactoglobulin konnten in den Abbildung 4.55 und 4.56 erzielt werden. In die Statistik für die Abbildung 4.55 wurden alle 7 untersuchten Rohmilchproben und 11 UHT-Milchproben (ohne den 4 lactosefreien Milchproben) miteinbezogen. Die Abbildung 4.56 enthält zusätzlich alle 32 untersuchten pasteurisierten Milchproben.

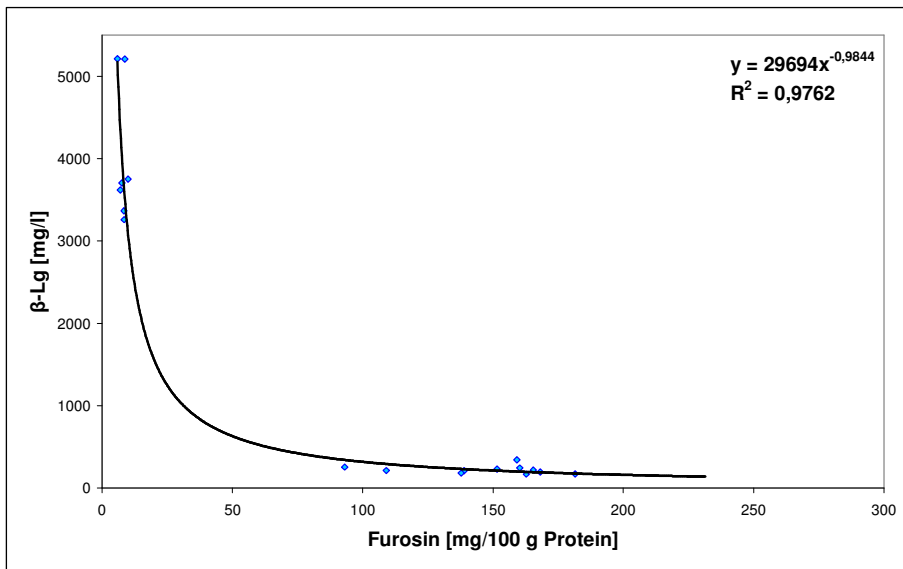


Abbildung 4.55 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in RM und UHT-Milch

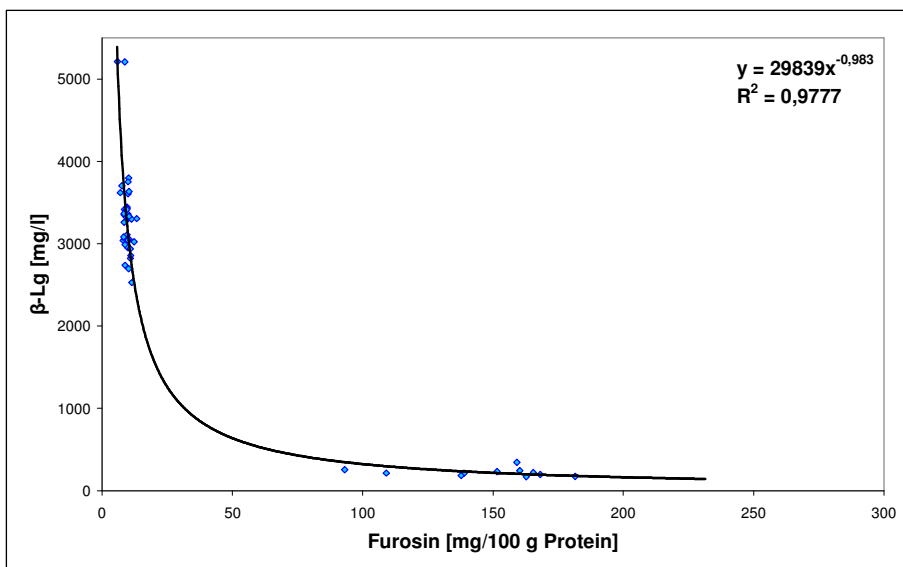


Abbildung 4.56 Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin in RM, past. Milch und UHT-Milch

Tabelle 4.9 Gesamtergebnistabelle (nach Firmennamen sortiert)

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
11.03.2008	A faire Milch 00:576 08211	18	ESL	3,5	3,32	23,6	1827,2
08.04.2008	A faire Milch 0801G 12202	49	ESL	3,5	3,32	24,5	1839,4
06.06.2008	A faire Milch 16:50G20161	119	ESL	3,5	3,18	14,0	2403,9
25.01.2009	A faire Milch 3022GF 01021F	126	ESL	3,5	3,48	12,8	2857,5
14.08.2008	Almsana 8157 05:17	90	UHT	0,5	3,53	137,8	183,0
28.07.2008	Almsana 8134 00:24	89	UHT	3,5	3,39	181,5	171,8
13.05.2008	Berchtesgaden	106	Past.	1,5	3,09	9,5	3358,4
12.05.2008	Berchtesgaden Demmree	105	Past.	1,5	3,14	9,2	3329,0
13.05.2008	Berchtesgaden Bio Frische Alpenmilch	107	Past.	3,8	3,03	10,3	3332,1
21.05.2008	Beste Bio	102	ESL	3,5	3,10	15,5	2179,5
23.04.2008	Beste Bio L610005:23	57	ESL	3,5	3,13	82,0	211,9
02.05.2008	Bio + L080097	86	ESL	3,5	3,30	39,2	430,0
13.12.2007	Bio Bio L0633408:3	7.1	ESL	3,5	3,31	75,9	244,7
13.03.2008	Bio Bio L5058/1246	11	ESL	3,5	3,02	94,1	211,4

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosine mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
25.04.2008	Bio Bio L510117:08	52	ESL	3,5	3,18	11,3	2431,4
20.08.2008	Breisgau lactosefrei 02:52	97	UHT	3,5	3,34	471,9	159,1
10.12.2007	Biones Bio L1.2 17:35/325	7,2	ESL	3,5	3,16	13,8	2474,8
29.01.2009	Biones Bio L1.1/008/21:25	127	ESL	3,5	3,43	11,6	2791,5
20.08.2008	Breisgau lactosefrei 02:52	97	UHT	3,5	3,34	471,9	159,1
11.12.2007	Clever	9	Past.	3,5	3,71	10,2	3799,4
09.04.2008	Clever L610205:14	45	Past.	3,5	3,18	9,6	3442,7
15.03.2008	Clever L232011:38	48	UHT	0,5	3,66	151,6	231,8
02.05.2008	Demeterhof J. Hitsch	100	RM	Nat.	3,21	8,4	3367,4
11.04.2008	Demeterhof J. Hitsch	62	RM	Nat.	3,24	8,5	3260,7
04.04.2008	Demeterhof J. Hitsch	47	RM	Nat.	3,61	10,0	3751,7
29.11.2007	Die leichte Muh 11:32	26	ESL	0,7	4,02	29,3	2244,5
21.06.2008	Die leichte Muh 06:05	98	ESL	0,7	3,86	37,1	2653,0
09.05.2008	Echt Bio 06:56	104	Past.	3,5	3,04	8,8	2988,9
31.03.2008	Echt Bio 11:52	35	Past.	3,5	3,22	9,7	3049,4

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosine mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
17.05.2008	Gmundner Milch 7465 02:16	38	UHT	1,5	3,62	138,9	212,5
11.01.2009	Goldfuss	125	RM	Nat.	4,43	8,7	5210,0
11.06.2008	Himmeltau Kinder 08:24 166L1	81	ESL	3,8	3,17	17,3	1945,8
07.05.2008	Himmeltau Kinder 15:33 816L1	42	ESL	3,8	3,26	22,5	1776,3
26.12.2007	Himmeltau Kinder 17:56 031L1	17	ESL	3,8	3,49	26,9	2024,7
15.03.2008	Ja Natürlich Leichtmilch L1 07:29	12	ESL	1,0	3,14	50,5	400,6
07.06.2008	Ja Natürlich L1 10:06	110	ESL	1,0	3,12	52,7	298,1
25.04.2008	Ja Natürlich L1 14:20	44	ESL	1,0	3,28	50,0	322,3
05.12.2007	Ja Natürlich L1 16:50	2	ESL	1,0	3,39	47,6	306,0
08.01.2009	Ja Natürlich Leichtmilch L1 12:53	135	ESL	1,0	2,98	46,9	212,1
25.01.2009	Ja Natürlich Leichtmilch L1 12:40	136	ESL	1,0	3,26	52,4	192,4
25.01.2009	Ja Natürlich Leichtmilch L1 16:38	137	ESL	1,0	3,27	50,3	229,7

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
16.03.2008	Ja Natürlich L1 13:38	13	ESL	3,5	3,21	49,3	328,0
02.06.2008	Ja Natürlich L1 20:25	112	ESL	3,6	3,00	53,3	291,4
09.01.2009	Ja Natürlich VM L1 14:17	132	ESL	3,6	3,16	48,3	226,4
18.01.2009	Ja Natürlich VM L1 15:58	122	ESL	3,6	3,19	49,8	300,15
26.01.2009	Ja Natürlich VM L1 09:46	133	ESL	3,6	3,21	39,1	189,2
08.02.2009	Ja Natürlich VM L1 08:50	134	ESL	3,6	3,19	45,4	226,6
16.05.2008	Ja Natürlich Frishmilch L1 09:00	111	Past.	1,6	3,32	10,8	2936,7
10.12.2007	Ja Natürlich Frishmilch L112:17	54	Past.	1,6	3,40	9,8	2951,1
10.12.2007	Ja Natürlich Kinder Frisch- milch L13366 C003919226924	55	Past.	3,8	3,16	12,3	3024,7
29.02.2008	Ja Natürlich Extra Vollmilch	14	Past.	4,5	3,06	10,9	2822,6
23.05.2008	Ja Natürlich Kinder Frishmilch L2	115	Past.	Nat.	3,14	8,8	2739,0
19.12.2008	Ja Natürlich frische VM L2 16:34	129	Past.	3,6	3,18	9,7	3429,0

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
11.01.2009	Ja Natürlich frische VM L1 12:32	130	Past. .	3,6	3,18	9,9	3045,5
19.01.2009	Ja Natürlich frische VM L2 16:00	131	Past.	3,6	3,21	9,5	3416,5
12.04.2008	Lembacher Bio Frisch Milch	58	Past.	3,5	3,20	11,3	3300,5
06.06.2008	Maresi	66	UHT	3,8	3,26	109,1	214,1
23.03.2008	Maresi L66991	39	UHT	0,1	3,64	93,1	255,8
11.05.2008	Melktaler	101	RM	3,6	2,93	7,6	3705,8
13.04.2008	Melktaler AT- No1Bio0166-31 M-N-23	59	RM	3,6	3,13	7,0	3620,1
20.12.2007	Milbona 01:42	21	ESL	1,5	3,83	13,3	2865,6
06.05.2008	Milbona 22:37	93	Past.	3,5	3,33	13,3	3305,1
13.12.2008	Milchkanne L63340659	15	ESL	1,5	3,59	77,9	229,0
16.04.2008	Milchkanne L509211:21	34	ESL	1,5	3,58	13,3	3245,6
16.05.2008	Milchkanne L51222 0:34	84.2	ESL	1,5	3,25	10,2	2406,2
03.06.2008	Milchkanne L614022:33	109	ESL	1,5	3,47	11,8	2390,0

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
31.03.2008	Milchkanne 6604220:03	33	Past.	3,5	3,32	11,4	2527,9
29.04.2008	Milchkanne L6123 06:15	84.3	Past.	3,5	3,28	10,0	3357,3
14.06.2008	Minus L lactosefrei RWM023:25	43	UHT	1,5	3,44	352,4	219,8
14.12.2007	Natur aktiv Bio 2023447232	1	ESL	3,5	3,45	15,6	2258,7
17.03.2008	NÖM fasten 20620813	19	ESL	0,9	3,45	95,1	205,9
06.05.2008	NÖM fasten 211306:06	76	ESL	0,9	3,42	92,5	184,3
01.05.2008	NÖM 2007 15:11	72	ESL	1,5	3,44	13,7	2663,4
03.12.2007	NÖM 2323 09:19	23	ESL	1,5	3,54	15,2	2540,8
20.02.2008	NÖM 3333 17:16	3	ESL	1,5	3,74	80,2	239,6
02.02.2009	NÖM 3018 10:58	124	ESL	1,5	3,58	81,8	330,3
04.12.2007	NÖM Guten Morgen 132400:57	4	ESL	1,8	3,75	82,5	205,3
07.05.2008	NÖM Guten Morgen 311318:32	83	ESL	1,8	3,51	100,1	230,1
26.03.2008	NÖM Guten Morgen	25	ESL	1,8	3,81	62,2	212,5
08.05.2008	NÖM Schulmilch	77	ESL	1,8	3,58	74,2	204,4

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosine mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
18.03.2008	NÖM Schulmilch	24	ESL	1,8	3,66	46,2	212,4
09.12.2007	NÖM 232623:59	22	ESL	3,5	3,39	72,0	234,1
23.04.2008	NÖM 210615:01	60	ESL	3,5	3,09	12,1	3087,5
27.04.2008	NÖM 191111:40	71	ESL	3,5	3,31	11,3	3370,5
30.11.2007	NÖM 232003:33	6	ESL	3,5	3,24	15,9	2402,4
07.05.2008	NÖM original Waldv. L611419:19	79	ESL	3,5	3,37	15,3	2532,5
16.05.2008	NÖM 16.05.813	108	Past.	3,5	3,31	9,2	3279,8
18.04.2008	NÖM lactosefrei 209503:32	41	UHT	1,8	3,5	284,7	402,7
13.12.2007	Schärdinger Die schlanke Linie	31	ESL	0,1	3,80	74,7	260,0
25.04.2008	Schärdinger Die schlanke Linie	51	ESL	0,1	3,67	82,4	239,8
14.08.2008	Schärdinger L4.1/114/14:03	92	ESL	3,5	3,42	11,5	3222,6
09.05.2008	Schärdinger L4.2/109/02:58	96	ESL	3,5	3,32	13,6	3125,3
09.05.2008	Schärdinger L4.2/109/05:49	94	ESL	3,5	3,36	12,0	3500,6
19.05.2008	Schärdinger L4.2/119/ 05:25	95	ESL	3,5	3,42	11,0	3523,1

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
15.07.2008	Schärdinger Formil Die Leichte 027/0005L2	117	UHT	0,5	3,55	168,1	196,2
02.03.2008	Schärdinger Formil Die Leichte 09:49 0311	8	UHT	0,5	3,21	162,8	170,2
28.05.2008	Schärdinger Formil Die Leichte 030105:5922	36	UHT	0,5	3,48	160,3	244,1
14.07.2008	Schärdinger Formil 031/19:06L	75	UHT	3,5	3,39	159,2	344,1
09.03.2008	Schärdinger Formil 16:11053637	40	UHT	3,5	3,56	39,1	1383,0
10.05.2008	Spar lactosefrei L080005	82	ESL	1,5	3,35	135,2	386,2
17.03.2008	Spar lactosefrei L080052	20	ESL	1,5	3,28	123,9	386,9
26.04.2008	Spar lactosefrei L08009161	61	ESL	1,5	3,45	140,3	374,0
16.03.2008	Spar Natur pur Bio	28	ESL	3,5	3,30	41,4	379,4
04.05.2008	Spar Natur pur Bio L080099	73	ESL	3,5	3,13	40,8	336,0
09.12.2007	Spar Natur pur Bio L07310	16	ESL	3,5	3,65	39,6	333,2
22.04.2008	Spar L081104/03	80	Past.	1,8	3,29	10,3	3634,8

MHD	Name	Probe	Milchart	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
31.05.2008	Spar mit pur Bio 10:54	118	Past	3,5	3,21	8,1	3040,9
09.05.2008	Spar L4./920/01:57	99	Past	3,5	3,28	9,7	3325,4
27.04.2008	Spar L4.1/108/06:22	84.1	Past	3,5	3,34	8,4	3354,5
11.12.2007	Spar L4.1 02:36/334	56	Past.	3,5	3,57	10,0	3606,1
10.07.2008	Spar Leichtmilch 072 17:39 L1	68	UHT	0,5	3,30	165,5	220,6
11.01.2009	Stadler H. Raxendorf	123	RM	Nat.	3,41	5,9	5214,5
06.05.2008	Stainzer TM Mi08:58	88	ESL	0,5	3,30	11,7	3679,3
10.05.2008	Stainzer 10:39	87	ESL	3,5	3,39	16,3	3433,1

In der Tabelle 4.9 werden alle analysierten Ergebnisse zusammengefasst. Bei den Proben 1 bis 121 handelt es sich um eingefrorene Milchproben, deren nativer β-Lactoglobulingehalt bereits in vorangegangener Diplomarbeit bestimmt wurde. Diese Werte wurden in die Statistik miteinbezogen, um einen aussagekräftigen Vergleich von Furosin mit β-Lactoglobulin zu ermöglichen.

Tabelle 4.10 Rohmilch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert)

MHD	Name	Probe	% Fett	% EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
11.01.2009	Stadler	123	Nat.	3,41	5,9	5214,5
13.04.2008	Melktaler	59	3,6	3,13	7,0	3620,1
11.05.2008	Melktaler	101	3,6	2,93	7,6	3705,8
02.05.2008	Demeterhof	100	Nat.	3,21	8,4	3367,4
11.04.2008	Demeterhof	62	Nat.	3,24	8,5	3260,7
11.01.2009	Goldfuss	125	Nat.	4,43	8,7	5210,0
04.04.2008	Demeterhof	47	Nat.	3,61	10,0	3751,7

Tabelle 4.11 Pasteurisierte Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert)

MHD	Name	Probe	% Fett	% EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
31.05.2008	Spar	118	3,5	3,21	8,1	3040,9
27.04.2008	Spar	84.1	3,5	3,34	8,4	3354,5
13.05.2008	Berchtesgaden	106	1,5	3,09	9,5	3358,4
09.05.2008	Spar	99	3,5	3,28	9,7	3325,4
06.06.2008	Tiroler	120	3,5	3,25	8,3	3082,4
28.04.2008	Zillertaler	85	3,6	3,30	8,6	3417,7
12.05.2008	Tiroler VM	113	3,5	3,25	8,7	3060,9
09.05.2008	Echt Bio	104	3,5	3,04	8,8	2988,9
23.05.2008	Ja Natürlich	115	Nat.	3,14	8,8	2739,0
12.05.2008	Berchtesgaden	105	1,5	3,14	9,2	3329,0
16.05.2008	NÖM	108	3,5	3,31	9,2	3279,8
19.01.2009	Ja Natürlich	131	3,6	3,21	9,5	3416,5
09.04.2008	Clever	45	3,5	3,18	9,6	3442,7
17.04.2008	Tiroler	69	3,5	3,17	9,6	3108,4
31.03.2008	Echt Bio	35	3,5	3,22	9,7	3049,4
19.12.2008	Ja Natürlich	129	3,6	3,18	9,7	3429,0
10.12.2007	Ja Natürlich	54	1,6	3,4	9,8	2951,1

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosine mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
11.01.2009	Ja Natürlich	130	3,6	3,18	9,9	3045,0
29.04.2008	Milchkanne	84,3	3,5	3,28	10,0	3357,3
11.12.2007	Spar	56	3,5	3,57	10,0	3606,1
23.05.2008	Täglich Waldviertler	116	3,5	3,25	10,0	---
11.12.2007	Clever	9	3,5	3,71	10,2	3799,4
07.06.2008	Täglich Waldviertler	121	3,5	3,38	10,2	2697,1
13.05.2008	Berchtesgaden	107	3,8	3,03	10,3	3332,1
22.04.2008	Spar	80	1,8	3,29	10,3	3634,8
22.05.2008	Tiroler VM	114	3,5	3,24	10,4	3051,5
16.05.2008	Ja Natürlich	111	1,6	3,32	10,8	2936,7
29.02.2008	Ja Natürlich	14	4,5	3,06	10,9	2822,6
21.04.2008	Täglich Waldviertler	78	3,5	3,39	11,0	2858,1
12.04.2008	Lembacher	58	3,5	3,2	11,3	3300,5
31.03.2008	Milchkanne	33	3,5	3,32	11,4	2527,9
10.12.2007	Ja Natürlich	55	3,8	3,16	12,3	3024,7
06.05.2008	Milbona	93	3,5	3,33	13,3	3305,1

Tabelle 4.12 ESL-Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosine mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
16.05.2008	Milchkanne	84,2	1,5	3,25	10,2	2406,2
19.05.2008	Schärdinger	95	3,5	3,42	11,0	3523,1
25.04.2008	Bio Bio	52	3,5	3,18	11,3	2431,4
27.04.2008	NÖM	71	3,5	3,31	11,3	3370,5
14.08.2008	Schärdinger	92	3,5	3,42	11,5	3222,6
29.01.2009	Bionis Bio	127	3,5	3,43	11,6	2791,5
06.05.2008	Stainzer	88	0,5	3,30	11,7	3679,3
03.06.2008	Milchkanne	109	1,5	3,47	11,8	2390,0
09.05.2008	Schärdinger	94	3,5	3,36	12,0	3500,6

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
23.04.2008	NÖM	60	3,5	3,09	12,1	3087,5
25.01.2009	A faire Milch	126	3,5	3,48	12,8	2857,5
27.05.2008	Waldviertler	103	3,5	3,33	13,1	2270,2
20.12.2007	Milbona	21	1,5	3,83	13,3	2865,6
16.04.2008	Milchkanne	34	1,5	3,58	13,3	3245,6
09.05.2008	Schärdinger	96	3,5	3,32	13,6	3125,3
01.05.2008	NÖM	72	1,5	3,44	13,7	2663,4
10.12.2007	BionesBio	7,2	3,5	3,16	13,8	2474,8
06.06.2008	A faire Milch	119	3,5	3,18	14,0	2403,9
03.12.2007	NÖM	23	1,5	3,54	15,2	2540,8
07.05.2008	NÖM	79	3,5	3,37	15,3	2532,5
21.05.2008	Beste Bio	102	3,5	3,10	15,5	2179,5
14.12.2007	Natur aktiv Bio	1	3,5	3,45	15,6	2258,7
30.11.2007	NÖM	6	3,5	3,24	15,9	2402,4
10.05.2008	Stainzer	87	3,5	3,39	16,3	3433,1
11.06.2008	Himmeltau Kinder	81	3,8	3,17	17,3	1945,8
07.05.2008	Himmeltau Kinder	42	3,8	3,26	22,5	1776,3
11.03.2008	A faire Milch	18	3,5	3,32	23,6	1827,2
08.04.2008	A faire Milch	49	3,5	3,32	24,5	1839,4
26.12.2007	Himmeltau Kinder	17	3,8	3,49	26,9	2024,7
29.11.2007	Die leichte Muh	26	0,7	4,02	29,3	2244,5
21.06.2008	Die leichte Muh	98	0,7	3,86	37,1	2653,0
26.01.2009	Ja Natürlich	133	3,6	3,21	39,1	185,9
02.05.2008	Bio +	86	3,5	3,30	39,2	430,0
09.12.2007	Spar Natur pur Bio	16	3,5	3,65	39,6	333,2
04.05.2008	Spar	73	3,5	3,13	40,8	336,0
16.03.2008	Spar	28	3,5	3,30	41,4	379,4
10.05.2008	Die leichte Muh	50	0,7	3,90	42,4	2310,6
08.02.2009	Ja Natürlich	134	3,6	3,19	45,4	278,4
18.03.2008	NÖM	24	1,8	3,66	46,2	212,4

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
08.01.2009	Ja Natürlich	135	1,0	2,98	46,9	217,0
05.12.2007	Ja Natürlich	2	1,0	3,39	47,6	306,0
09.01.2009	Ja Natürlich	132	3,6	3,16	48,3	226,4
16.03.2008	Ja Natürlich	13	3,5	3,21	49,3	328,0
18.01.2009	Ja Natürlich	122	3,6	3,19	49,8	300,2
25.04.2008	Ja Natürlich	44	1,0	3,28	50,0	322,3
25.01.2009	Ja Natürlich	137	1,0	3,27	50,3	229,7
15.03.2008	Ja Natürlich	12	1,0	3,14	50,5	400,6
25.01.2009	Ja Natürlich	136	1,0	3,26	52,4	192,4
07.06.2008	Ja Natürlich	110	1,0	3,12	52,7	298,1
02.06.2008	Ja Natürlich	112	3,6	3,00	53,3	291,4
26.03.2008	NÖM	25	1,8	3,81	62,2	212,5
09.12.2007	NÖM	22	3,5	3,39	72,0	234,1
08.05.2008	NÖM	77	1,8	3,58	74,2	204,4
13.12.2007	Schärdinger	31	0,1	3,8	74,7	260,0
13.12.2007	Bio Bio	7.1	3,5	3,31	75,9	244,7
13.12.2008	Milchkanne	15	1,5	3,59	77,9	229,0
20.02.2008	NÖM	3	1,5	3,74	80,2	239,6
02.02.2009	NÖM	124	1,5	3,58	81,8	330,3
23.04.2008	Beste Bio	57	3,5	3,13	82,0	211,9
25.04.2008	Schärdinger	51	0,1	3,67	82,4	239,8
04.12.2007	NÖM	4	1,8	3,75	82,5	205,3
06.05.2008	NÖM	76	0,9	3,42	92,5	184,3
13.03.2008	Bio Bio	11	3,5	3,02	94,1	211,4
03.05.2008	Waldviertler	74	3,5	3,17	94,2	226,3
17.03.2008	NÖM	19	0,9	3,45	95,1	205,9
07.05.2008	NÖM	83	1,8	3,51	100,1	230,1
17.03.2008	Spar	20	1,5	3,28	123,9	386,9
10.05.2008	Spar	82	1,5	3,35	135,2	386,2
26.04.2008	Spar	61	1,5	3,45	140,3	374,0

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
02.04.2008	Viva vital	10	0,1	4,15	225,5	140,2
20.06.2008	Viva vital	91	0,1	3,79	262,2	159,5

Tabelle 4.13 UHT-Milch Ergebnisse (nach Furosingehalt sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
09.03.2008	Schärdinger Formil	40	3,5	3,56	39,1	1383,0
23.03.2008	Maresi	39	0,1	3,64	93,1	255,8
06.06.2008	Maresi	66	3,8	3,26	109,1	214,1
14.08.2008	Almsana	90	0,5	3,53	137,8	183,0
17.05.2008	Gmundner Milch	38	1,5	3,62	138,9	212,5
15.03.2008	Clever	48	0,5	3,66	151,6	231,8
14.07.2008	Schärdinger Formil	75	3,5	3,39	159,2	344,1
28.05.2008	Schärdinger Formil	36	0,5	3,48	160,3	244,1
02.03.2008	Schärdinger Formil	8	0,5	3,21	162,8	170,2
10.07.2008	Spar	68	0,5	3,3	165,5	220,6
15.07.2008	Schärdinger Formil	117	0,5	3,55	168,1	196,2
28.07.2008	Almsana	89	3,5	3,39	181,5	171,8
01.04.2008	Viva vital	37	1,5	3,32	207,0	166,1
18.04.2008	NÖM	41	1,8	3,5	284,7	402,7
14.06.2008	Minus L	43	1,5	3,44	352,4	219,8
20.08.2008	Breisgau	97	3,5	3,34	471,9	159,1
22.07.2008	Breisgau	67	3,5	3,2	485,0	---

Anmerkung: Probennummer 40 wurde aufgrund einer wahrscheinlichen Verwechslung in der Statistik nicht berücksichtigt

Tabelle 4.14 Rohmilch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
11.01.2009	Stadler	123	Nat.	3,41	5,9	5214,5
11.01.2009	Goldfuss	125	Nat.	4,43	8,7	5210,0
04.04.2008	Demeterhof	47	Nat.	3,61	10,0	3751,7
11.05.2008	Melktaler	101	3,6	2,93	7,6	3705,8
13.04.2008	Melktaler	59	3,6	3,13	7,0	3620,1
02.05.2008	Demeterhof	100	Nat.	3,21	8,4	3367,4
11.04.2008	Demeterhof	62	Nat.	3,24	8,5	3260,7

Tabelle 4.15 Pasteurisierte Milch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
11.12.2007	Clever	9	3,5	3,71	10,2	3799,4
22.04.2008	Spar	80	1,8	3,29	10,3	3634,8
11.12.2007	Spar	56	3,5	3,57	10,0	3606,1
09.04.2008	Clever	45	3,5	3,18	9,6	3442,7
19.12.2008	Ja Natürlich	129	3,6	3,18	9,7	3429,0
28.04.2008	Zillertaler	85	3,6	3,30	8,6	3417,7
19.01.2009	Ja Natürlich	131	3,6	3,21	9,5	3416,5
13.05.2008	Berchtesgaden	106	1,5	3,09	9,5	3358,4
29.04.2008	Milchkanne	84,3	3,5	3,28	10,0	3357,3
27.04.2008	Spar	84,1	3,5	3,34	8,4	3354,5
13.05.2008	Berchtesgaden	107	3,8	3,03	10,3	3332,1
12.05.2008	Berchtesgaden	105	1,5	3,14	9,2	3329,0
09.05.2008	Spar	99	3,5	3,28	9,7	3325,4
06.05.2008	Milbona	93	3,5	3,33	13,3	3305,1
12.04.2008	Lembacher	58	3,5	3,2	11,3	3300,5
16.05.2008	NÖM	108	3,5	3,31	9,2	3279,8
06.06.2008	Tiroler	120	3,5	3,25	8,3	3082,4

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
12.05.2008	Tiroler VM	113	3,5	3,25	8,7	3060,9
22.05.2008	Tiroler VM	114	3,5	3,24	10,4	3051,5
31.03.2008	Echt Bio	35	3,5	3,22	9,7	3049,4
11.01.2009	Ja Natürlich	130	3,6	3,18	9,9	3045,0
31.05.2008	Spar	118	3,5	3,21	8,1	3040,9
10.12.2007	Ja Natürlich	55	3,8	3,16	12,3	3024,7
09.05.2008	Echt Bio	104	3,5	3,04	8,8	2988,9
10.12.2007	Ja Natürlich	54	1,6	3,4	9,8	2951,1
16.05.2008	Ja Natürlich	111	1,6	3,32	10,8	2936,7
21.04.2008	Täglich Waldviertler	78	3,5	3,39	11,0	2858,1
29.02.2008	Ja Natürlich	14	4,5	3,06	10,9	2822,6
23.05.2008	Ja Natürlich	115	Nat.	3,14	8,8	2739,0
07.06.2008	Täglich Waldviertler	121	3,5	3,38	10,2	2697,1
31.03.2008	Milchkanne	33	3,5	3,32	11,4	2527,9
23.05.2008	Täglich Waldviertler	116	3,5	3,25	10,0	---

Tabelle 4.16 ESL-Milch Ergebnisse (nach β-Lactoglobulin sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
06.05.2008	Stainzer	88	0,5	3,30	11,7	3679,3
19.05.2008	Schärdinger	95	3,5	3,42	11,0	3523,1
09.05.2008	Schärdinger	94	3,5	3,36	12,0	3500,6
10.05.2008	Stainzer	87	3,5	3,39	16,3	3433,1
27.04.2008	NÖM	71	3,5	3,31	11,3	3370,5
16.04.2008	Milchkanne	34	1,5	3,58	13,3	3245,6
14.08.2008	Schärdinger	92	3,5	3,42	11,5	3222,6
09.05.2008	Schärdinger	96	3,5	3,32	13,6	3125,3
23.04.2008	NÖM	60	3,5	3,09	12,1	3087,5

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
20.12.2007	Milbona	21	1,5	3,83	13,3	2865,6
25.01.2009	A faire Milch	126	3,5	3,48	12,8	2857,5
29.01.2009	Biones Bio	127	3,5	3,43	11,6	2791,5
01.05.2008	NÖM	72	1,5	3,44	13,7	2663,4
21.06.2008	Die leichte Muh	98	0,7	3,86	37,1	2653,0
03.12.2007	NÖM	23	1,5	3,54	15,2	2540,8
07.05.2008	NÖM	79	3,5	3,37	15,3	2532,5
10.12.2007	BionesBio	7,2	3,5	3,16	13,8	2474,8
25.04.2008	Bio Bio	52	3,5	3,18	11,3	2431,4
16.05.2008	Milchkanne	84,2	1,5	3,25	10,2	2406,2
06.06.2008	A faire Milch	119	3,5	3,18	14,0	2403,9
30.11.2007	NÖM	6	3,5	3,24	15,9	2402,4
03.06.2008	Milchkanne	109	1,5	3,47	11,8	2390,0
10.05.2008	Die leichte Muh	50	0,7	3,90	42,4	2310,6
27.05.2008	Waldviertler	103	3,5	3,33	13,1	2270,2
14.12.2007	Natur aktiv Bio	1	3,5	3,45	15,6	2258,7
29.11.2007	Die leichte Muh	26	0,7	4,02	29,3	2244,5
21.05.2008	Beste Bio	102	3,5	3,10	15,5	2179,5
26.12.2007	Himmeltau Kinder	17	3,8	3,49	26,9	2024,7
11.06.2008	Himmeltau Kinder	81	3,8	3,17	17,3	1945,8
08.04.2008	A faire Milch	49	3,5	3,32	24,5	1839,4
11.03.2008	A faire Milch	18	3,5	3,32	23,6	1827,2
07.05.2008	Himmeltau Kinder	42	3,8	3,26	22,5	1776,3
02.05.2008	Bio +	86	3,5	3,30	39,2	430,0
15.03.2008	Ja Natürlich	12	1,0	3,14	50,5	400,6
17.03.2008	Spar	20	1,5	3,28	123,9	386,9
10.05.2008	Spar	82	1,5	3,35	135,2	386,2
16.03.2008	Spar	28	3,5	3,30	41,4	379,4
26.04.2008	Spar	61	1,5	3,45	140,3	374,0
04.05.2008	Spar	73	3,5	3,13	40,8	336,0

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β-Lacto- globulin mg/l
09.12.2007	Spar Natur pur Bio	16	3,5	3,65	39,6	333,2
02.02.2009	NÖM	124	1,5	3,58	81,8	330,3
16.03.2008	Ja Natürlich	13	3,5	3,21	49,3	328,0
25.04.2008	Ja Natürlich	44	1,0	3,28	50,0	322,3
05.12.2007	Ja Natürlich	2	1,0	3,39	47,6	306,0
18.01.2009	Ja Natürlich	122	3,6	3,19	49,8	300,2
07.06.2008	Ja Natürlich	110	1,0	3,12	52,7	298,1
02.06.2008	Ja Natürlich	112	3,6	3,00	53,3	291,4
08.02.2009	Ja Natürlich	134	3,6	3,19	45,4	278,4
13.12.2007	Schärdinger	31	0,1	3,8	74,7	260,0
13.12.2007	Bio Bio	7.1	3,5	3,31	75,9	244,7
25.04.2008	Schärdinger	51	0,1	3,67	82,4	239,8
20.02.2008	NÖM	3	1,5	3,74	80,2	239,6
09.12.2007	NÖM	22	3,5	3,39	72,0	234,1
07.05.2008	NÖM	83	1,8	3,51	100,1	230,1
25.01.2009	Ja Natürlich	137	1,0	3,27	50,3	229,7
13.12.2008	Milchkanne	15	1,5	3,59	77,9	229,0
09.01.2009	Ja Natürlich	132	3,6	3,16	48,3	226,4
03.05.2008	Waldviertler	74	3,5	3,17	94,2	226,3
08.01.2009	Ja Natürlich	135	1,0	2,98	46,9	217,0
26.03.2008	NÖM	25	1,8	3,81	62,2	212,5
18.03.2008	NÖM	24	1,8	3,66	46,2	212,4
23.04.2008	Beste Bio	57	3,5	3,13	82,0	211,9
13.03.2008	Bio Bio	11	3,5	3,02	94,1	211,4
17.03.2008	NÖM	19	0,9	3,45	95,1	205,9
04.12.2007	NÖM	4	1,8	3,75	82,5	205,3
08.05.2008	NÖM	77	1,8	3,58	74,2	204,4
25.01.2009	Ja Natürlich	136	1,0	3,26	52,4	192,4
26.01.2009	Ja Natürlich	133	3,6	3,21	39,1	185,9
06.05.2008	NÖM	76	0,9	3,42	92,5	184,3

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
20.06.2008	Viva vital	91	0,1	3,79	262,2	159,5
02.04.2008	Viva vital	10	0,1	4,15	225,5	140,2

Tabelle 4.17 UHT-Milch Ergebnisse (nach β -Lactoglobulin sortiert)

MHD	Name	Probe	%Fett	%EW	Furosin mg/100g Protein	β -Lacto- globulin mg/l
09.03.2008	Schärdinger Formil	40	3,5	3,56	39,1	1383,0
18.04.2008	NÖM	41	1,8	3,5	284,7	402,7
14.07.2008	Schärdinger Formil	75	3,5	3,39	159,2	344,1
23.03.2008	Maresi	39	0,1	3,64	93,1	255,8
28.05.2008	Schärdinger Formil	36	0,5	3,48	160,3	244,1
15.03.2008	Clever	48	0,5	3,66	151,6	231,8
10.07.2008	Spar	68	0,5	3,3	165,5	220,6
14.06.2008	Minus L	43	1,5	3,44	352,4	219,8
06.06.2008	Maresi	66	3,8	3,26	109,1	214,1
17.05.2008	Gmundner Milch	38	1,5	3,62	138,9	212,5
15.07.2008	Schärdinger Formil	117	0,5	3,55	168,1	196,2
14.08.2008	Almsana	90	0,5	3,53	137,8	183,0
28.07.2008	Almsana	89	3,5	3,39	181,5	171,8
02.03.2008	Schärdinger Formil	8	0,5	3,21	162,8	170,2
01.04.2008	Viva vital	37	1,5	3,32	207,0	166,1
20.08.2008	Breisgau	97	3,5	3,34	471,9	159,1
22.07.2008	Breisgau	67	3,5	3,2	485,0	---

Anmerkung: Probennummer 40 wurde aufgrund einer wahrscheinlichen Verwechslung in der Statistik nicht berücksichtigt

5. Schlussbetrachtung

Die Analyse der Erhitzungsindikatoren Furosin und natives β -Lactoglobulin mittels RP-HPLC ermöglicht die Beurteilung der angewandten Wärmebehandlung in verschiedenen Milchproben.

Um einen besseren Vergleich der Wärmebehandlungen zu erzielen, wurden neben pasteurisierter Milch, ESL-Milch und UHT-Milch auch Rohmilchproben analysiert. Die Rohmilchproben stammten direkt von landwirtschaftlichen Betrieben oder aus Bioläden (waren als Rohmilch gekennzeichnet). Ihre Untersuchung ergab einen Mittelwert von 8 mg Furosin/100 g Protein und einen nativen β -Lactoglobulingehalt von 4019 mg/l. Der native β -Lactoglobulingehalt aus den Rohmilchproben, die direkt von landwirtschaftlichen Betrieben stammten, war wesentlich höher als jener von Bioläden. Die Untersuchungen der pasteurisierten Milchproben ergaben einen Mittelwert von 9,9 mg Furosin/100 g Protein und einen nativen β -Lactoglobulingehalt von 3177 mg/l.

Da es für ESL-Milch bis jetzt noch keine gesetzliche Definition gibt, aber in der Literatur schon Grenzwerte existieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene im österreichischen Handel vorkommende ESL-Milchproben auf diese Grenzwerte hin überprüft. Der native β -Lactoglobulingehalt soll 1800 mg/l nicht unterschreiten und der Furosingehalt darf 12 mg/100 g Protein nicht überschreiten.

Aufgrund großer Unterschiede im Furosin- und nativen β -Lactoglobulingehalt wurden die ESL-Milchproben in zwei Gruppen eingeteilt. Die ESL-Milchproben Typ 1 (natives β -Lactoglobulin ≥ 1780 mg/l und Furosin ≤ 38 mg/100 g Protein) ergaben einen Mittelwert von 16 mg Furosin/100 g Protein und einen nativen β -Lactoglobulingehalt von 2634 mg/l. Ein wesentlich schlechteres Ergebnis erzielten die ESL-Milchproben Typ 2 (natives β -Lactoglobulin < 1780 mg/l und Furosin > 38 mg/100 g Protein). Es ergab sich ein Mittelwert von 77 mg Furosin/100 g Protein und der native β -Lactoglobulin Mittelwert sank auf 266 mg/l.

Den angegebenen Grenzwert für Furosin konnten von 71 untersuchten ESL-Milchproben nur 9 Milchproben erfüllen. Diese Proben lagen auch innerhalb des Grenzwertes für das native β -Lactoglobulin.

Bei den ESL-Milchproben Typ 2 liegen die nativen β -Lactoglobulingehalte zwischen 430 und 140 mg/l. Anhand des nativen β -Lactoglobulingehaltes kann man darauf schließen, dass bei ESL-Milchproben Typ 2 eine Indirekterhitzungsmethode angewandt wurde.

Die Untersuchungen der UHT-Milchproben ergaben einen Furosin-Mittelwert von 204 mg/100 g Protein und einen nativen β -Lactoglobulin-Mittelwert von 266 mg/l.

Durch den Vergleich vom Furosin- mit nativem β -Lactoglobulingehalt einzelner Milchproben konnte festgestellt werden, dass ein hoher Furosingehalt mit einem niedrigen nativen β -Lactoglobulingehalt (und umgekehrt) in Verbindung steht und eine Proteinanreicherung oder Lactosehydrolyse den Furosin- und nativen β -Lactoglobulingehalt in den Milchproben negativ beeinflusst.

Vergleicht man den Furosin- mit nativem β -Lactoglobulingehalt von Rohmilch-, pasteurisierten Milch- und UHT-Milchproben (lactosefreie Milchproben wurden nicht berücksichtigt), so entsteht eine Kurve mit einer starken Korrelation ($R^2 = 0,9777$). Es konnte somit ein Zusammenhang zwischen Furosin und dem nativen β -Lactoglobulingehalt festgestellt werden. Für eine genaue Aufklärung des Zusammenhanges zwischen den beiden Erhitzungsindikatoren sind noch weitere Analysen notwendig.

6. Zusammenfassung

Die Wärmebehandlung von Milch ist eine hygienische Maßnahme, um Mikroorganismen möglichst vollständig abzutöten und dient hauptsächlich der Haltbarkeitsverlängerung. Es kommt dabei zu Veränderungen der Milchinhaltsstoffe (z. B. Vitaminverlust) und zu negativen sensorischen Beeinflussungen. Je höher die thermische Belastung umso stärker sind die Veränderungen. Die Wärmebehandlung der Milch kann mit Hilfe von Indikatoren beurteilt werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden mittels RP-HPLC die Erhitzungsindikatoren Furosin und das native β -Lactoglobulin in unterschiedlichen frischen und eingefrorenen Milchproben (Rohmilch, pasteurisierte Milch, ESL-Milch und UHT-Milch) bestimmt. Die Furosinmittelwerte der untersuchten Rohmilchproben und pasteurisierter Milchproben waren geringfügig höher als die in der Literatur angegebenen Werte. Der Mittelwert für das native β -Lactoglobulin lag im beschriebenen Bereich.

Für ESL-Milch werden in der Literatur Grenzwerte für Furosin (≤ 12 mg/100 g Protein) und natives β -Lactoglobulin (> 1800 mg β -Lactoglobulin/l) angegeben. Von 71 untersuchten ESL-Milchproben lagen nur 9 Milchproben innerhalb beider Grenzwerte. Die Analyse der UHT-Milchproben ergab, dass die Mittelwerte für Furosin und natives β -Lactoglobulin den Angaben in der Literatur entsprechen.

Weiters konnte festgestellt werden, dass eine Proteinanreicherung und die Lactosehydrolyse den Furosin- und nativen β -Lactoglobulingehalt von Milch negativ beeinflussen. Berücksichtigt man diese Proben nicht, so kann ein Zusammenhang zwischen Furosin und nativem β -Lactoglobulingehalt trotz unterschiedlicher Reaktionskinetik beobachtet werden.

7. Abstract

The heat treatment of milk is a hygienic measure to remove a high percentage of micro-organisms. However, it is primarily important for preservation purposes. During this process, the nutrients in milk are effected (e.g. loss of vitamins) and moreover there are negative sensory influences. The higher the thermal impact, the more significant are the changes. There are indicators for assessing these changes.

Within this diploma thesis, the heat load of different fresh and frozen milk samples of raw milk, extended shelf life (ESL) milk and ultra-high-temperature (UHT) milk was evaluated using RP-HPLC of furosine and native β -lactoglobulin as indicators for heat load. The average furosine levels of the tested raw milk samples and of the pasteurized samples were insignificantly higher than the levels indicated in the literature. The average level of native β -lactoglobulin also corresponded to the indicated values. In the literature, the following values were indicated for ESL milk: Furosine (≤ 12 mg/100 g protein) and native β -lactoglobulin (> 1800 mg β -lactoglobulin/l). Only 9 out of 71 ESL-milk samples ranged within these thresholds. The analysis of the UHT milk samples showed that the average levels of furosine and native β -lactoglobulin corresponded to the values in the references. In addition, it could be observed that protein enrichment and the hydrolysis of lactose have a negative effect on the furosine and native β -lactoglobulin contents of the milk.

However, even if these samples were not considered, a connection between furosine and native β -lactoglobulin could be perceived despite different chemical reaction kinetics.

8. Literaturverzeichnis

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

CLAWIN-RÄDECKER P, LORENZEN P, MARTIN D. Furosingehalte und Molkenproteinzusammensetzung in Schaf- und Ziegenmilch. Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Jahresbericht 2004; 14-15.

DELGADO-ANDRADE C, RUFIÁN-HENARES J. A, MORALES F. J. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. Food Chemistry 100, 2007; 725-731.

DYCK B. Neue Marktchancen durch ESL-Technologie. Deutsche Molkerei Zeitung 2004; 20: 22-25.

EBERHARD P, BÜTIKOFER U, SIEBER R. Vitamine in gelagerter hocherhitzter Milch. Bern, FAM-INFO Nr. 452, 2003; 3-4.

EBERMANN R, ELMADFA I. Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer Verlag, Wien, 2008; 306-321.

FERRER E, ALEGRIA A, COURTOIS G, FARRÉ R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. Journal of Chromatography A 2000; 881: 599-606.

GALLMANN P, EBERHARD P, SIEBER R. Vor- und Nachteile der ESL (Extended Shelf Life)-Milch. Bern, FAM-INFO Nr.423, 2001; 6-7.

GUERRA-HERNANDEZ E, CORZO N. Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed phase liquid chromatography. American Association of Cereal Chemists 1996; 73: 729-731.

HAVEA P, SINGH H, CREAMER L.K. Characterization of heat induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. Journal of Dairy Research 2001; 68: 482-497.

HENKE J. R. Verfahrenstechnik zur Behandlung von ESL-Milch, Food Technologie Magazin 2009; 4-5.

INTERNATIONAL STANDARD. Dried milk assessment of heat treatment intensity high performance liquid chromatographic method. International Dairy Federation. 1992; 162:1992.

INTERNATIONAL STANDARD. Milk and milk products - Determination of furosine content – Ion-pair reverse phase chromatography method. International Dairy Federation. 2004; 193:2004.

KIESNER C, HOFFMANN W, LORENZEN P. C, CLAWIN-RÄDECKER I, MARTIN D, MEISEL H, EINHOFF K, HAMMER P, TEUFEL P, SUHREN G. Anwendung von Mikrofiltration bei der Herstellung von Konsummilch mit verlängerter Haltbarkeit. Kieler milchwissenschaftliche Forschungsberichte 2006; 57:139-189.

KRAUSE R. Untersuchungen zur Bildung von Furosine und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen. Technische Universität Dresden, Dissertation 2005; 18-25.

LIESKE B, SENGE B. UV-spektrophotometrische Bestimmung von β -Lactoglobulin. Deutsche Milchwirtschaft 2005; 56:13.

LINDSAY S, Einführung in die HPLC. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1996; 4-6, 40-42, 117-119.

MARTIN D. Charakterisierung des Milchenzyms Adenosindesaminase. Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Jahresbericht 2004; 16.

MATISSEK R, STEINER G. Lebensmittelanalytik. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2006; 87-94.

MEIER J, Nachweis von nativem β -Lactoglobulin und Furosin als Erhitzungsindikatoren in ESL-Milch mittels RP-HPLC. Universität für Bodenkultur Wien Abteilung Lebensmittelchemie Diplomarbeit 2009; 24-32, 48-58.

MULSOW B, Struktur-Eigenschaftsbeziehungen nichtenzymatisch glykosylierter Molkenproteine. Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden Dissertation 2008; 8-11.

MÜLLER S, Analytische Trennungen neuartiger Supramoleküle mittels HPLC, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Dissertation 2006; 30-35.

NUßBAUMER K, Analytik biogener Amine und freier Aminosäuren in Milchproben sowie Bestimmung des nativen β -Lactoglobulins als Hitzeindikator in ESL-Milch mittels HPLC und UPLC. Universität für Bodenkultur Wien Abteilung Lebensmittelchemie, Diplomarbeit 2006; 68-77.

RUFÍÁN-HENARES J.Á, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004; 52: 5354-5358.

SCHWERMANN S, SCHWENZOW U. Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Deutsche Milchwirtschaft 2008; 57.

SERRANO M. A, CASTILLO G, MUÑOZ M. M, HERNÁNDEZ A. Influence of hydrolysis, purification and calibration method on furosine determination using ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 2002; 40: 87-91.

SPREER E. *Technologie der Milchverarbeitung*. 8. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, 2005; 255-306.

TOKUŞOĞLU Ö, AKALIN A. S, UNAL M. K. A rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine (ϵ -N-2-furoylmethyl-L-Lysine) in pasteurized and UHT-milks, *Milchwissenschaft* 2004; 59: 502-505.

TÖPEL A. *Chemie und Physik der Milch*. 1. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, 2004; 511-574.

Anita Schmid

berufliche Tätigkeit

02.08.1993 – 01.08.1996 Lehrzeit bei Fa. Foto Nettig GmbH
11.07.1996 Lehrabschlussprüfung Fotokauffrau
02.08.1996 – 30.09.2002 Fotokauffrau Fa. Niedermeyer GmbH
01.10.2002 – 2009 Samstag-Aushilfe Fa. Niedermeyer GmbH

Weiterbildungen

30.07.2002 Berufsreifeprüfung

Studium Universität Wien

01.10.2002 – 04.02.2005 Studium der Ernährungswissenschaften (1. Abschnitt)
04.02.2005 1. Diplomprüfung

Praktika

26.09.2005 – 10.10.2005 Med. Universität Wien
Hygiene Institut Ao. Univ. Prof. Dr. Mohammad Manafi
Folgende Aufgaben wurden durchgeführt:

- Evaluierung von CCP-Agar für *Clostridium perfringens*
- Wasseruntersuchungen
- „*Enterobacter sakazakii*“ - Studie, Untersuchung von Säuglingsnahrung (Trockenmilch)
- Küchenuntersuchung: Oberflächenabklatsch, Händeabklatsch, Lebensmitteluntersuchung

28.08.2006 – 08.09.2006 Med. Universität Wien
Hygiene Institut Ao. Univ. Prof. Dr. Mohammad Manafi
Folgende Aufgaben wurden durchgeführt:

- Untersuchung von Bio-Salat auf pathogene Keime
- Identifizierung von Keimen aus einem Wasserreservoir
- Küchenuntersuchung: Oberflächenabklatsch, Händeabklatsch, Lebensmitteluntersuchung

01.08.2007-28.09.2007 Hanusch Krankenhaus Wien

Folgende Aufgaben wurden durchgeführt:

- Berechnung des 5-Wochen Personalspeiseplans
- Änderungsvorschläge und Verbesserungsvorschläge für Personalspeiseplan
- Recherchen zum Thema "Schwangerschaft und Ernährung"

Raxendorf, im Mai 2009