



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

HPLC-Analytik zur Qualitätsbestimmung von Milch und
Sojaprodukten

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Astrid Wunderer
Matrikel-Nummer:	0501207
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 474 Diplomstudium Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut Mayer Universität für Bodenkultur DLWT, Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, im Dezember 2009

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur dieses Studium ermöglicht haben, sondern mir auch immer mit Geduld, Liebe und Motivation zur Seite gestanden sind.

Weiterer Dank gebührt meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. DI. Dr. Helmut Mayer, der mir die Möglichkeit zu dieser Diplomarbeit gegeben hat und mir mit fachlichem Rat immer weitergeholfen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich weiters bei meinen Kollegen Bernd Raba und DI Gregor Fiechter, die mich im Laufe der Arbeit immer tatkräftig mit Rat und Tat unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	3
2.1 Definition von Lebensmitteln und Qualität	3
2.2 Allgemeine Anforderungen an Rohmilch	3
2.3 Chemische Zusammensetzung der Milch	4
2.4 Ernährungsphysiologische Qualität von Milch	5
2.5 Unterschiedliche Milchsorten abhängig von ihrer Hitzebehandlung	6
2.5.1 Pasteurisierte Milch	6
2.5.2 Extended Shelf Life (ESL)-Milch	7
2.5.3 Baktofugation	10
2.5.4 Mikrofiltration	10
2.5.5 Tiefenfiltration	12
2.5.6 Modifizierte Pasteur	12
2.5.7 Direkte und indirekte ESL-Erhitung	13
2.6 Ultrahocherhitzte Milch	15
2.7 Sterilisierte Milch	16
2.8 Indikatorstoffe zur Beurteilung wärmebehandelter Milch	16
2.8.1 Inaktivierung von Enzymen	17
2.8.2 Bildung von chemischen Verbindungen	18
2.8.3 Denaturierung von Molkenproteinen	22
2.9 Zusammensetzung des Milcheiweißes	23
2.9.1 Caseinfraktion	23
2.9.2 Molkenproteine	24
2.9.3 Serumalbumin	25
2.10 Maillard-Reaktion	26
2.11 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojaprodukten	
mittels HPLC	27
2.11.1 Sojabohne	27
2.11.2 Sojamilch	29
2.11.3 Kohlenhydrate	30
2.12 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	35
2.12.1 Reversed Phase-HPLC	35
3. Material und Methoden	37
3.1 Probenmaterial	37
3.2 Ermittlung des nativen β -Lactoglobulingehalts	38
als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC	38
3.2.1 Aufarbeitung der Milchproben	39
3.2.2 Chromatographische Parameter zur Bestimmung des nativen	
β -Lactoglobulins	42
3.2.3 Herstellung der Kalibrationsstandards	44
3.3 Bestimmung des Furosingehalts in Milch	46
3.3.1 Aufarbeitung der Proben:	48
3.3.2 Chromatographische Parameter zur Bestimmung von Furosin	50
3.3.3 Berechnung des Furosingehalts in Milchproben	51

3.4 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.....	52
3.4.1. Aufarbeitung der Proben.....	53
3.4.2 Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl	56
3.5 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in.....	
Sojaprodukten mittels HPLC	57
3.5.1 Probenmaterial	57
3.5.2 Aufarbeitung der Sojaprobe.....	57
3.5.3 Versuche zur Löslichkeit der Zuckerstandards	64
3.6 Optimierung der chromatographischen Einstellungen zur Analyse von löslichen Kohlenhydraten in Sojabohnen	66
4. Ergebnisse und Diskussion	68
4.1 Kalibration des nativen β -Lactoglobulingehalts in Milchproben	68
4.2 Ermittlung des nativen β -Lactoglobulingehalts als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC	74
4.2.1 Natives β -Lactoglobulin bei pasteurisierter Milch	77
4.2.2 Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch	79
4.2.3 Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in Rohmilch	83
4.3 Bestimmung des Furosingehalts in Milch	84
4.4.1 Furosingehalt bei pasteurisierter Milch	86
4.4.2 Furosingehalt bei ESL-Milch	88
4.4.3 Furosingehalt bei Rohmilch	91
4.4 Vergleich: Natives β -Lactoglobulin mit Furosin	92
4.5 Ergebnisse der Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl	98
4.6 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojaprodukten mittels HPLC	99
4.7 Optimierung der chromatographischen Einstellungen zur Analyse von löslichen Kohlenhydraten in Sojabohnen	105
5. Schlussbetrachtung	111
6. Zusammenfassung	113
7. Abstract	114
8. Literaturverzeichnis.....	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Darstellung der Haltbarkeitsverlängerung von ESL-Milch [DYCK, 1999].....	8
Abbildung 2.2: Prozess der Mikrofiltration modifiziert nach [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]	11
Abbildung 2.3: Gesamtkeimzahl mikrofiltrierter ESL-Milch im Vergleich zu pasteurisierter Milch [GALLMANN et al, 2001]	12
Abbildung 2.4: Vergleich des direkten mit dem indirekten und Erhitzungsverfahren zur Herstellung von ESL-Milch modifiziert nach [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]	14
Abbildung 2.5: Furosinbildung in Abhängigkeit der Temperatur [ERBERSDOBLER und SOMOZA, 2007].....	21
Abbildung 2.6: chemische Umwandlung der inaktiven Glykoside in die biologische aktive Form der Aglykone [CEDERROTH und NEF, 2009].....	28
Abbildung 4.1: Kalibrationsgerade α -Lactalbumin.....	70
Abbildung 4.2: Kalibrationsgerade β -Lactoglobulin	70
Abbildung 4.3: Standardlösung I (β -Lg 0,2 μ g / 10 μ L, α -La 0,1 μ g / 10 μ L)	71
Abbildung 4.4 Standardlösung II (β -Lg 0,4 μ g / 10 μ L, α -La 0,2 μ g / 10 μ L)	71
Abbildung 4.5: Standardlösung III (β -Lg 0,8 μ g / 10 μ L, α -La 0,4 μ g / 10 μ L) ...	72
Abbildung 4.6: Standardlösung IV (β -Lg 1,6 μ g / 10 μ L, α -La 0,8 μ g / 10 μ L)....	72
Abbildung 4.7: Standardlösung V (β -Lg 2,4 μ g / 10 μ L, α -La 1,2 μ g / 10 μ L)....	73
Abbildung 4.8: Standardlösung VI (β -Lg 3,2 μ g / 10 μ L, α -La 1,6 μ g / 10 μ L)...	73
Abbildung 4.9: Verteilung der β -Lactoglobulin Werte aller Milchproben.....	75
Abbildung 4.10: Durchschnittlicher Gehalt der Milchproben an β -Lactoglobulin	76
Abbildung 4.11: Darstellung der einzelnen untersuchten pasteurisierten Milchproben	78
Abbildung 4.12: Chromatogramm einer pasteurisierten Vollmilch mit einem β -Lg Gehalt von 3429 mg/ L Milch	78
Abbildung 4.13: Einteilung der ESL-Milch in die unterschiedlichen Qualitätsstufen.....	80

Abbildung 4.14: β -Lactoglobulingehalt der ESL-Milchproben	81
Abbildung 4.15: Gegenüberstellung von zwei ESL-Milchproben	82
Abbildung 4.16: Chromatogramm einer ESL-Milch mit einem Gehalt von 289,25 mg / L Milch	82
Abbildung 4.17: Chromatogramm einer ESL-Milch mit einem Gehalt von 2720,5mg / L Milch	82
Abbildung 4.18: Vergleich von Rohmilch zu pasteurisierter Milch.....	83
Abbildung 4.19: Einteilung der Furosinwerte in unterschiedliche Qualitätsstufen.....	85
Abbildung 4.20: Furosingehalt in den pasteurisierten Milchproben.....	86
Abbildung 4.21: Chromatogramm einer pasteurisierten VM von „Ja! Natürlich“	87
Abbildung 4.22: Verteilung der Furosinwerte bei ESL-Milch	88
Abbildung 4.23: Vergleich des Furosingehalts von ESL - Milchproben.....	89
Abbildung 4.24: Chromatogramm einer ESL-VM mit 68, 7 mg Furosin / 100 g Protein	90
Abbildung 4.25: Chromatogramm einer ESL-VM mit einem Furosingehalt von 8, 4 mg / 100 g Protein.....	90
Abbildung 4.26: Chromatogramm der Rohmilch	91
Abbildung 4.27: Vergleich der Mittelwerte von Furosin und β -Lactoglobulin aller Milchproben	92
Abbildung 4.28: Zusammenhang zwischen β -Lactoglobulin und Furosin aller pasteurisierten und ESL-Milchproben	94
Abbildung 4.29: Vergleich Furosin und β -Lactoglobulin bei pasteurisierten Milchproben	95
Abbildung 4.30: Vergleich des Gehalts an Furosin und β -Lactoglobulin bei ESL-Milchproben	96
Abbildung 4.31 Zusammenhang zwischen β -Lactoglobulin und Furosin bei ESL-Milchproben	97
Abbildung 4.32: Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosin bei ESL-Vollmilchproben	97

Abbildung 4.33: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach der Extraktion mit UHQ-Wasser [CICEK,2001]	99
Abbildung 4.34: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach einmaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei RT [1g / 10 mL]	101
Abbildung 4.35: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach einmaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei 50°C [2g / 25 mL]	101
Abbildung 4.36: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach zweimaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei RT [2g / 25 mL]	102
Abbildung 4.37: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach zweimaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei 50°C [2g / 25 mL]	102
Abbildung 4.38: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach "direkter Injektion" des Zuckerextrakts [1,5g / 25 mL]	103
Abbildung 4.39: Chromatogramm der extrahierten Zucker aus Sojamilch [1g / 10 mL]	104
Abbildung 4.40: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards (LM 70% AcN)	105
Abbildung 4.41: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards (LM 80% AcN)	106
Abbildung 4.42: Vergleich beider 4-fach Zuckerstandards.....	106
Abbildung 4.43: Vergleich der Chromatogramme von direkt und indirekt gemischtem LM	107
Abbildung 4.44: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards,	108
Abbildung 4.45: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards, LM 70% AcN,	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Durchschnittliche Zusammensetzung der Rohmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].....	4
Tabelle 2.2: Durchschnittlicher Vitamingehalt der Kuhmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].....	6
Tabelle 2.3: Möglichkeiten der Pasteurisation bei Milch [SPREER, 2005].....	7
Tabelle 2.4: Darstellung der Anlagenausführungen.....	9
Tabelle 2.5: Überblick über die Verfahrenskonzepte [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]	15
Tabelle 2.6: Furosingehalte in wärmebehandelter Milch [CLAWIN-RÄDECKER et al, 1996].....	21
Tabelle 2.7: Durchschnittliche Hitzebelastung von Milch [GALLMANN et al, 2001].....	23
Tabelle 2.8: Unterschiedlichen Milchproteine in Kuhmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].....	25
Tabelle 2.9: Durchschnittliche Zusammensetzung reifer, getrockneter Sojabohnen [EBERMANN und ELMADFA, 2008]	27
Tabelle 2.10: Durchschnittlicher Gehalt an Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen in der Sojabohne [EBERMANN und ELMADFA, 2008].....	29
Tabelle 2.11: Unterschied löslicher und unlöslicher Ballaststoffe [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].....	33
Tabelle 3.1 Herstellung der β – Lg Kalibrationsstandards	45
Tabelle 3.2: Erklärung der Furosinberechnung [SCHMID,2009].....	51
Tabelle 3.3: Erläuterungen zur Berechnung des Gesamtproteingehalts [MATISSEK und STEINER, 2006]	56
Tabelle 3.4: Versuche zur Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses der Lösungsmittel	65
Tabelle 4.1: Konzentrationen und Flächen der Kalibrierung	69
Tabelle 4.2: Darstellung der Gesamtergebnisse der untersuchten Milchproben	74
Tabelle 4.3: Vergleich der durchschnittlich ermittelten Furosinwerte [mg / L] mit jenen der Literatur.....	84

Tabelle .4.4: Vergleich des nativen β -Lactoglobulins mit Furosin der pasteurisierten Milchproben.....	93
Tabelle 4.5: Vergleich des nativen β -Lactoglobulin mit dem Furosingehalt bei ESL-Milchproben	93
Tabelle 4.6: Ergebnisse der Gesamtstickstoffbestimmung nach <i>Kjeldahl</i>	98

Abkürzungsverzeichnis

α - Lg	α - Lactalbumin
β - Lg	β - Lactoglobulin
AcN	Acetonitril
<i>ALP</i>	<i>Alkalische Phosphatase</i>
DIN	Deutsches Institut für Normung
ESL - LM	ESL-Leichtmilch
ESL - VM	ESL-Vollmilch
ESL	Extended Shelf Life
Frau	Fructose
Glu	Glucose
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LM	Laufmittel
<i>Lpo</i>	<i>Lactoperoxidase</i>
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff
Raff	Raffinose
RM	Rohmilch
RP-HPLC	Reversed Phase-HPLC
Sacc	Saccharose
UHQ	Ultra-High-Quality
UHT	Ultra-High-Temperature

1. Einleitung und Fragestellung

Der Begriff „Qualität“ bekommt einen immer wichtigeren Aspekt im Bereich der Lebensmittelbranche. Lebensmittel dienen nicht nur mehr der Ernährung, sondern sollen auch einen Beitrag zum allgemeinen Wohlbefinden und dem Erhalt der Gesundheit leisten.

Aus ernährungsphysiologischer Sicht bedeutet dies, dass der Transport und die Verarbeitung der Rohstoffe möglichst schnell, schonend und nach dem neuesten Stand der Technik von statten gehen sollte, um deren natürliche Inhaltsstoffe weitestgehend zu erhalten.

Eine Aufgabenstellung dieser Diplomarbeit bestand darin, die Auswirkungen der Hitzebelastung auf pasteurisierte und ESL (Extended Shelf Life)-Milch, anhand der Ermittlung des β -Lactoglobulin und Furosingehalts mittels RP-HPLC, darzustellen. Als Qualitätskriterien gelten hier ein Mindestanteil von 1800 mg β -Lg / L Milch und ein Maximalwert von 12 mg Furosin / 100 g Protein [GALLMANN et al, 2001].

Diese Erhitzungsindikatoren lassen auf die erfolgte Pasteurisation, (Ultra) Hoherhitzung oder Sterilisation rückschließen. Je mehr an natürlichen Inhaltsstoffen (β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Immunglobuline) erhalten und je weniger an chemischen Verbindungen (Furosin, Hydroxymethylfurfural, Lactulose) gebildet worden sind, umso qualitativ hochwertiger ist dieses Produkt.

Die Methode zur Bestimmung des Furosingehalts war bereits in vorangegangenen Arbeiten [MEIER, 2009; SCHMIDT, 2009] optimiert worden. Bei der Bestimmung des β -Lg Gehalts musste erneut eine Kalibrierung durchgeführt werden, die Analysenmethode konnte jedoch übernommen werden [NUSSBAUMER, 2006; SCHMIDT, 2009].

Ein weiteres Ziel war es, eine Analysenmethode zur Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojamilch und Sojabohnen mittels HPLC zu ermitteln. Hauptaufgabe war es hier, eine geeignete Extraktionsmethode zur Gewinnung der Zucker Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose und Stachyose aus Sojabohnen und Sojamilch zu ermitteln. Die gewonnenen Zuckerextrakte

anschließend qualitativ und quantitativ anhand einer neu erarbeiteten HPLC-Methodik bestmöglich darzustellen.

2. Literaturüberblick

2.1 Definition von Lebensmitteln und Qualität

Gemäß der europäischen Verordnung Nummer 178 / 2002 des europäischen Parlaments versteht man unter dem Begriff „Lebensmittel“, Stoffe und Erzeugnisse, welche dazu bestimmt sind von Menschen in unverarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder gänzlich verarbeitetem Zustand aufgenommen zu werden.

Die primären Ziele dieses Lebensmittel - und Verbraucherschutzgesetzes stellen der Schutz der Gesundheit und die Prävention der Verbrauchertäuschung dar [EG Verordnung Nr. 178/ 2002].

Laut der aktuellen Norm für Qualitätsmanagement, der EN ISO 9001: 2008 versteht man unter Qualität, das Ausmaß in welchem objektiv, messbare Produkteigenschaften die Anforderungen an das Produkt erfüllen. Ausschlaggebend ist hierbei, dass diese Merkmal immer dem gleichen Standard entsprechen [EN ISO 9001: 2008].

2.2 Allgemeine Anforderungen an Rohmilch

Rohmilch, welche zur Weiterverarbeitung bestimmt ist, muss aus regelmäßig kontrollierten Betrieben mit einem gesunden Viehbestand stammen. Diese darf den Gefrierpunkt von - 0,52 °C nicht überschreiten, andernfalls muss eine Untersuchung auf Fremdwasser erfolgen. Weiters muss Vollmilch bei 20 °C eine Dichte von mindestens 1,028 kg / L Milch und eine fettfreie Trockenmasse von 8,50 % aufweisen [MILCHHYGIENEVERORDNUNG, 2002].

Als Rohmilch in den Verkehr gebracht werden darf jedoch nur jene Milch, welche während der vollen Laktation produziert wurde. Dieser Zeitraum entspricht im Normalfall dem 10. bis 270. Tag nach dem Kalben.

Andernfalls weist die Milch einen höheren Gehalt an Trockensubstanz sowie einen geringeren Fettkügelchendurchmesser auf, welche die Gerinnungsfähigkeit der Milch negativ beeinträchtigt.

Um Rohmilch als solche deklarieren zu können, darf diese weder behandelt noch über 40 °C erhitzt werden [SPREER, 2005].

Tabelle 2.1: Durchschnittliche Zusammensetzung der Rohmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998]

	mittlerer Gehalt [Gew. %]
Wasser	87,0 – 89,0
Lipide	2,0 – 7,0
Protein	2,5 – 6,0
Lactose	3,5 – 5,5
Asche	0,5 – 0,8
Minorbestandteile	0,1

2.3 Chemische Zusammensetzung der Milch

Kuhmilch weist durchschnittlich einen Wassergehalt von 87 % und eine Trockenmasse von 13 % auf. Wobei sich die Trockenmasse in 9 % fettfreie Trockenmasse und 4 % Fett unterteilen lässt.

Die fettfreie Trockenmasse setzt sich hierbei aus Milchzucker, Salzen und Rohprotein zusammen, welches in Reinprotein und NPN-Substanzen eingeteilt wird [FOISSY, 2005].

Der Anteil des NPN setzt sich aus dem Stickstoff jener Milchbestandteile, welche nach dem Ausfällen der Milchproteine in Lösung bleiben. Zu diesen zählen Harnsäure, Creatin, Creatinin, Hippursäure, Orotsäure, N-Acetylglucosamin sowie Salicylsäure und Sarkosin. Im Durchschnitt enthält ein Liter Milch 200 bis 400 mg Nicht-Protein-Stickstoff [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

Reinprotein setzt sich vor allem aus Caseinen und Molkenproteinen zusammen, diese stellen mit 3,2 % die Hauptfraktion des Reinproteins dar. Das Verhältnis von Caseinen zu Molkenproteinen beträgt bei Kuhmilch im Durchschnitt 80 : 20.

Milch ist eine Öl-in-Wasser Emulsion, das Fett ist hierbei in Form von Fettkügelchen, welche von einer Fettkügelchenmembran umgeben sind, im Milchserum emulgiert [BELITZ et al., 2001].

Weiters sollte dieses unveränderte Eutersekret einen typischen, vollmundigen und leicht süßlichen Geschmack und Geruch aufweisen, homogen und frei von Klümpchen und Flockenbildung sein [SPREER, 2005].

Im Gemelk der Kühe können bis zu 60 verschiedene Fettsäuren nachgewiesen werden, wobei die Öl-, Palmitin-, Stearin-, und Myristinsäure die mengenmäßig bedeutendsten Vertreter sind. Typisch für das MilCHFett ist der Anteil von etwa 1 % methylverzweigter und zirka 2 % trans-ungesättigter Fettsäuren wie die 11-trans-Octadecensäure [BALTES, 2000].

2.4 Ernährungsphysiologische Qualität von Milch

Aus ernährungsphysiologischer Sicht zählt Milch zu den wertvollsten Lebensmitteln, da ein Liter Vollmilch mit 3,5 % Fett 100 % des Calciumbedarfs, in etwa zwei Drittel des Tagesbedarfs an Phosphor und Vitamin B₂, zirka ein Drittel der Vitamin A und B₁- Aufnahme, sowie 20 % des Vitamin C-Bedarfs eines Tages deckt [SPREER, 2005].

Im Durchschnitt werden 60 % des Calciumbedarfs von 1000 mg / Tag durch Milch- und Milchprodukte gedeckt [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Um die Qualität der Milch zu erhalten, sollte diese so schonend wie möglich erhitzt und anschließend gekühlt bei 4 bis 5 °C gelagert werden, um die Vitaminverluste während der Lagerung so gering wie möglich zu halten. Diese sind vor allem abhängig von Lagerungstemperatur und Reststickstoffgehalt in der Milch, wobei hier Vitamin B₁ und B₆ die höchsten Verluste mit bis zu 15 % bei einer vorangehenden direkten Erhitzung bei 125 °C zeigen [EBERHARD et al., 2003].

Tabelle 2.2: Durchschnittlicher Vitamingehalt der Kuhmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998]

<i>Vitamin</i>	<i>Mittlerer Gehalt [mg / L Milch]</i>
Retinol (Vitamin A)	0,3
Calciferol (Vitamin D)	0,001
Tocopherol (Vitamin E)	0,9
Phyllochinin / Menachinon (Vitamin K)	0,04
Thiamin (Vitamin B ₁)	0,4
Riboflavin (Vitamin B ₂)	1,6
Folsäure	0,05
Panthothensäure	3,6
Niacin	9,0
Pyridoxal (Vitamin B ₆)	0,5
Cobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,005
Ascorbinsäure (Vitamin C)	20,0
Biotin	0,04

2.5 Unterschiedliche Milchsorten abhängig von ihrer Hitzebehandlung

2.5.1 Pasteurisierte Milch

Pasteurisierte Konsummilch, handelsüblich auch als Trinkmilch bezeichnet, wird als gereinigte und für den menschlichen Verzehr bestimmte Milch definiert, welche einer Wärmebehandlung unterzogen wurde [SPREER, 2005].

Die Pasteurisation kann durch unterschiedliche Verfahren durchgeführt werden, wie in Tabelle 2.3. dargestellt ist.

Tabelle 2.3: Möglichkeiten der Pasteurisation bei Milch [SPREER, 2005]

Benennung	Temperatur [° C]	Einwirkzeit	Keimabtötung [%]
Kurzzeiterhitzung	72 – 75	15 – 30 sec	99,5
Hoherhitzung	85 – 127	8 – 15 sec	99,9
Dauererhitzung	62 – 65	30 min	95,0

Die Wärmebehandlung derer dient der Abtötung von möglichen pathogenen Keimen, jedoch nicht von deren Sporen. Pasteurisierte Milch muss einen negativen *Phosphatasetest* vorweisen, da dieser eine ausreichende Erhitzung bestätigt. Der *Peroxidasenachweis* sollte positiv verlaufen, da dieses Enzym erst bei einer Temperatur von zirka 80 °C inaktiviert wird [STRAHM und EBERHARD, 2009].

2.5.2 Extended Shelf Life (ESL)-Milch

Hoherhitzte Milch mit verlängerter Haltbarkeit und möglichst gleichen sensorischen Eigenschaften wie pasteurisierte Milch bezeichnet man als Extended Shelf Life-Milch (ESL-Milch). Eine genau gesetzliche Definition dieser „neuen“ Milch ist bis jetzt jedoch noch nicht verfügbar. Dieses Produkt ist ein Kompromiss aus Pasteurisation und Ultrahocherhitzung.

ESL-Milch muss gekühlt gelagert werden und ist im Durchschnitt 21 Tage haltbar [GALLMANN et al, 2001].

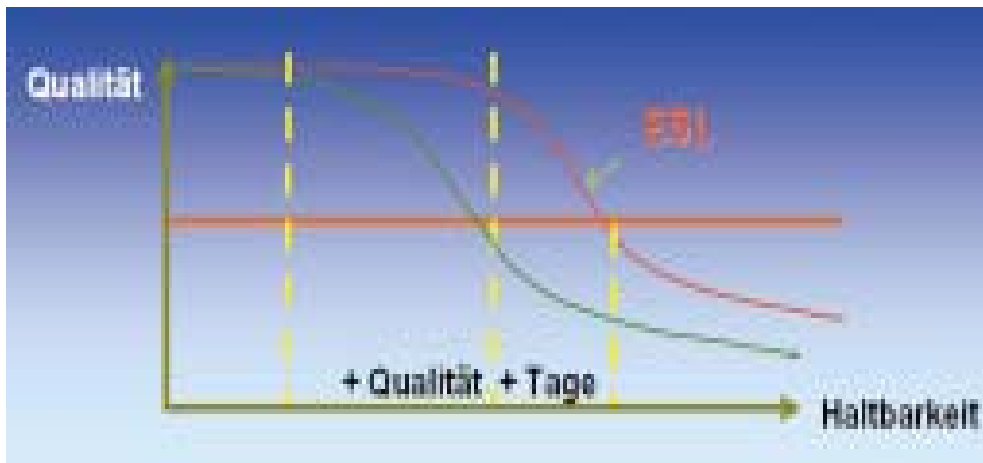


Abbildung 2.1: Darstellung der Haltbarkeitsverlängerung von ESL-Milch [DYCK, 1999]

Als Voraussetzung für den Erhalt einwandfreier ESL-Milch von guter, gleich bleibender Qualität ist die Verwendung hochwertiger Rohmilch und deren Verarbeitung, Verpackung und Lagerung nach neuesten technischen und hygienischen Vorgaben [DYCK, 1999].

In Tabelle 2.4 ist der Einfluss der Abfülltechnik auf die Haltbarkeit der ESL-Milch dargestellt, diese verdeutlicht, dass nicht nur die Milch für die Qualität des Endproduktes ausschlaggebend ist, sondern, dass viel mehr Faktoren wie die verwendete Technik, Hygiene, Verpackung und Einhaltung der Kühlkette einen weitaus wichtigeren Beitrag hierzu liefern [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

Tabelle 2.4: Darstellung der Anlagenausführungen

Kategorie	Ventiltechnik	Tanklager	Abfülltechnik	Haltbarkeit ≤ 8 °C
Standard	Standardventile	Ohne Luft Überlagerung	Standard Anlage	10 d
Clean	Standardventile	Drucklose Tanks mit Sterilluftüber- Lagerung	Geschlossene Anlage, Sterilluft über dem Füllorgan	14 d
Ultra Clean	Spezielle Sitz- oder Doppelsitzventile	Drucklose Tanks mit Sterilluftüber- lagerung	Geschlossene Anlage, Sterilluft über dem Füllorgan und Verpackungs- mittel Dekontamination	21 d bis 30
Aseptik	Sterilventile	Drucküberlagerte Steriltanks	Aseptik- Anlage	d

Mittlerweile gilt die Sterilluftüberlagerung der Füllorgane oder eine aseptische Abfüllanlage als Grundvoraussetzung zur Herstellung von ESL-Milch, da diese

den größten Schutz vor einer möglichen Rekontamination bieten, welche die Haltbarkeit deutlich verringern würde [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

Grundsätzlich wird zwischen Filtrations- und Erhitzungsverfahren zur Herstellung dieser „länger frischen“ Milch unterschieden. Teilweise wird auch eine Kombination dieser beiden Verfahren eingesetzt, um jegliche mikrobiologische Kontamination auszuschließen [KAUFMANN und KULOZIK, 2008].

2.5.3 Baktofugation

In der Baktofuge erfolgt die Abtrennung der Mikroorganismen, vor allem der Sporen, aus der angewärmten Milch durch die Zentrifugalkraft. Das Baktofugat muss sterilisiert werden und kann anschließend wieder der Milch zugeführt werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Haltbarkeitsverlängerung der Produkte, welche aus baktofugierter Rohmilch hergestellt werden [STRAHM und EBERHARD, 2009].

2.5.4 Mikrofiltration

Das Grundprinzip dieses Prozesses liegt in der Entfernung von Bakterien und Sporen durch Membranen. Da diese jedoch eine ähnliche Größe aufweisen wie die Milchfettkügelchen, muss zuerst eine Separation der Magermilch vom Rahm erfolgen. Anschließend wird die Magermilch durch Keramikmembranen mit einem Porendurchmesser von 0,8 bis 1,4 µm filtriert. Da hierbei immer noch einige Bakterien in die Milch gelangen können, erfolgt im Anschluss eine Pasteurisation [RYSSTAD und KOLSTAD, 2006].

Bei dieser „Cross-Flow“ Filtration entsteht ein keimarmes Permeat und ein keimreiches Retentat, welches aufkonzentriert, hocherhitzt, homogenisiert und wieder der filtrierten Magermilch zugeführt wird [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

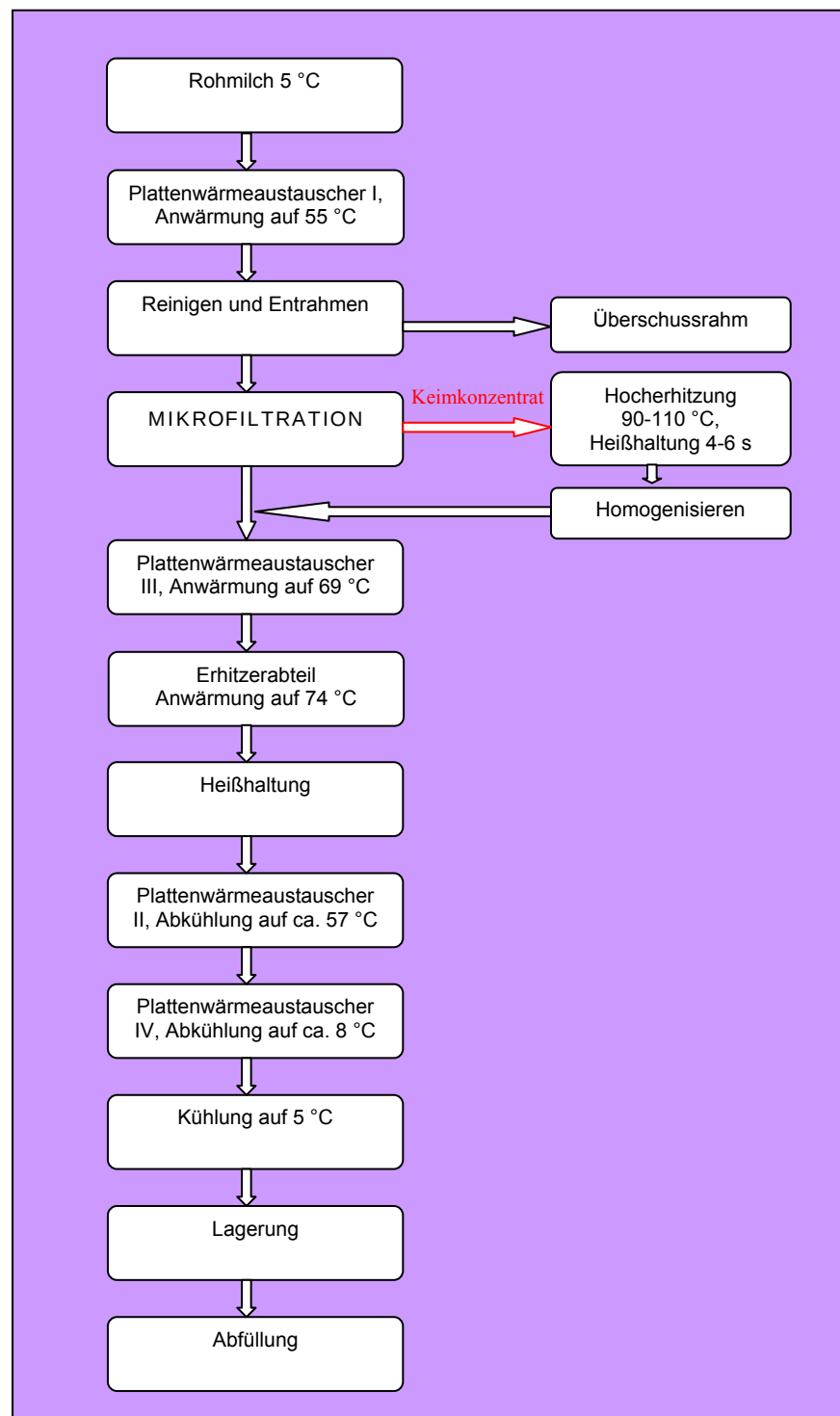


Abbildung 2.2: Prozess der Mikrofiltration modifiziert nach [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

Die erhöhte Effektivität dieses Verfahrens gegenüber der herkömmlichen Pasteurisation wird in Abbildung 2.3 verdeutlicht.

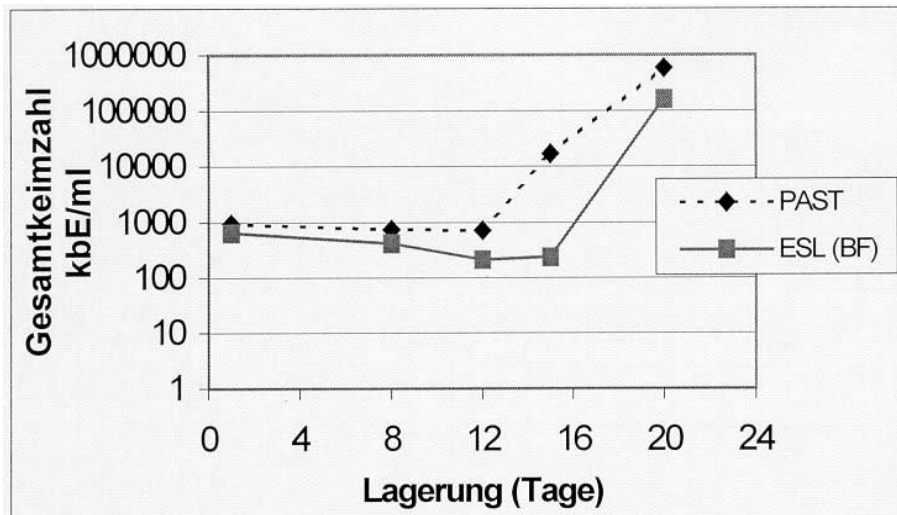


Abbildung 2.3: Gesamtkeimzahl mikrofiltrierter ESL-Milch im Vergleich zu pasteurisierter Milch [GALLMANN et al, 2001]

2.5.5 Tiefenfiltration

Hierbei ist die Porengröße der Filter weitaus geringer als bei der Mikrofiltration, die maximale Größe des Vorfilters beträgt $0,3\ \mu\text{m}$ und der Endfilter darf den Porendurchmesser von $0,2\ \mu\text{m}$ nicht überschreiten. Folglich können die Mikroorganismen durch den Siebeffekt die Filter nicht passieren. Jede Filtrationseinheit besteht aus mehreren Polypropylen-Filterkerzen. Der größte Unterschied zur „Cross-Flow“ Mikrofiltration ist, dass hierbei kein Retentat anfällt [SCHWERMANN und SCHENZOW, 2008].

2.5.6 Modifizierte Pasteur

Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der indirekten Erhitzung, ist jedoch im Gegensatz zu den direkten und indirekten Erhitzungsverfahren der Milch die kostengünstigere Möglichkeit ESL-Milch herzustellen. Ein konventioneller

Milchpasteur wird hierzu um ein zusätzliches Röhrenpaket und einen Entgaser erweitert. Im zweiten Erhitzungsablauf wird die 74 °C heiße Milch auf 125 °C erhitzt und anschließend wieder rückgekühlt, wie bei der herkömmlichen Pasteurisation der Milch. Der Entgaser sorgt für einen kontinuierlichen Durchfluss und Produktentgasung [GEA TDS GmbH, 2009].

2.5.7 Direkte und indirekte ESL-Erhitzung

Die direkte Erhitzung der Rohmilch kann durch ein Injektions- oder Infusionsverfahren erfolgen. Bei der Erhitzung mittels eines Injektors, wird Dampf mit erhöhtem Druck direkt in die Milch injiziert, das Wasser wird in einem Flashkühler unter Vakuum wieder entfernt.

Erfolgt die Erhitzung nach dem Infusionsprinzip, findet die Durchmischung von Milch und Dampf in einem Druckbehälter statt, wobei hier das Produkt nicht die Innenwand des Behälters berühren sollte, da hier Ablagerungen entstehen können. Anschließend erfolgt im Flashkühler wieder die Entfernung des Wassers [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

In der nachfolgenden Abbildung 2.4 ist der Unterschied zwischen dem direkten und indirekten Prozessverfahren dargestellt, welche zur Herstellung von ESL-Milch verwendet werden.

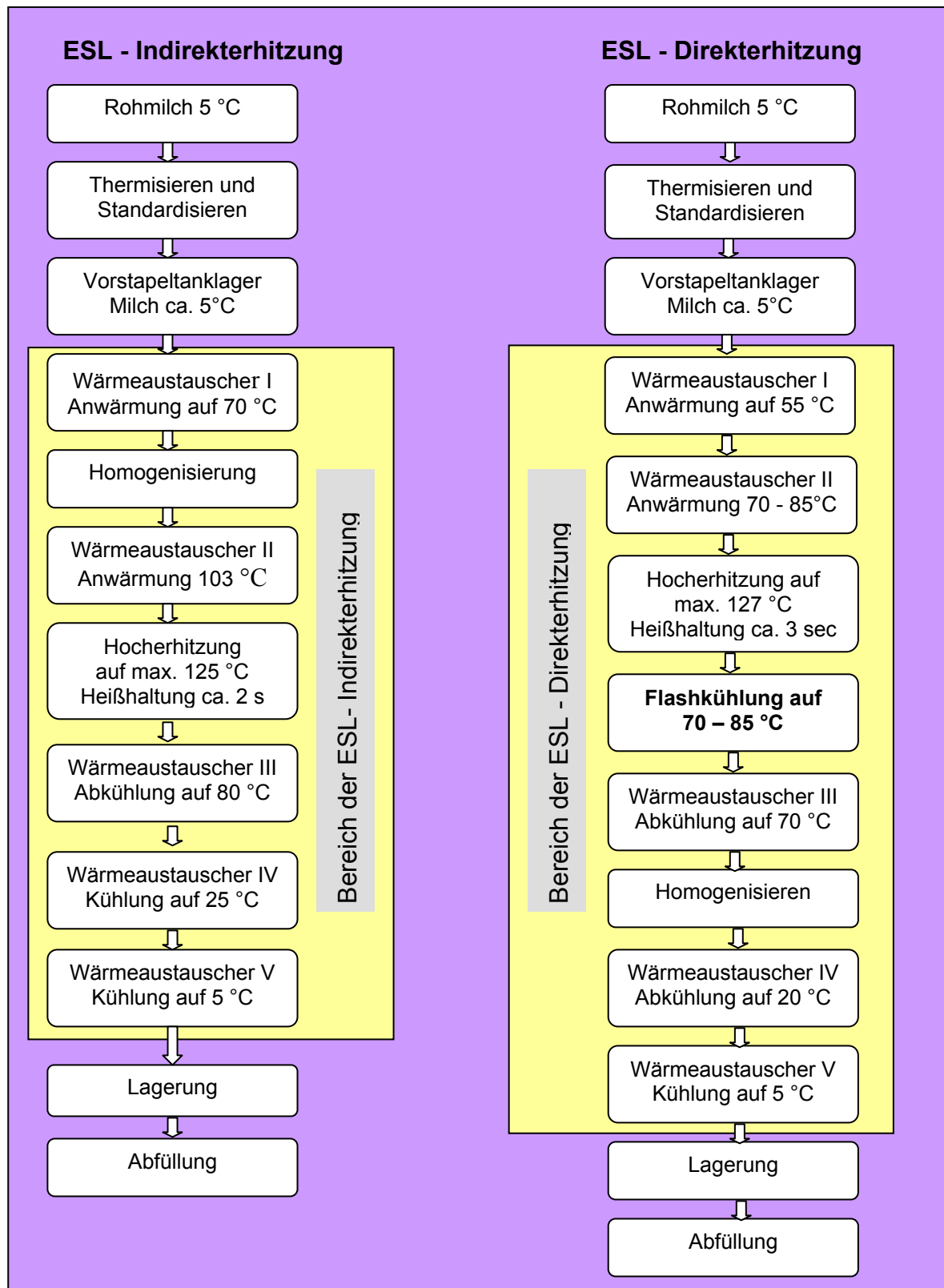


Abbildung 2.4: Vergleich des direkten mit dem indirekten und Erhitzungsverfahren zur Herstellung von ESL-Milch modifiziert nach [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

Weiters besteht sowohl bei der Direkt- als auch bei der Indirekterhitzung die Möglichkeit einer Inline-Erhitzung. Hierbei entfällt die Thermisierung und Standardisierung der Milch und die Rohmilch wird direkt im Wärmeaustauscher auf etwa 55°C erhitzt, gereinigt und entrahmt. Bei der ESL-Inline-Indirekterhitzung wird die erhitzte Milch zusätzlich entgast und homogenisiert.

Ansonsten verlaufen diese Verfahren nach demselben Prozessablauf wie die handelsübliche direkte und indirekte Erhitzung der Milch [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

Tabelle 2.5: Überblick über die Verfahrenskonzepte [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008]

	<i>Milchpasteur</i>	<i>Erhitzung Direkt Injektion</i>	<i>Erhitzung Direkt Infusion</i>	<i>Indirekte Erhitzung</i>	<i>Modifizierter Pasteur</i>	<i>Mikrofiltration</i>	<i>Tiefenfiltration</i>
Erhitzungs- temperatur	Max 74°C	Max 127°C	Max 127°C	Max 125°C	Max 125°C	Max 74°C	Max 74°C
Heißhaltezeit (s)	20	3	3	2	2	20	20
β-Lg (mg / L)	> 3100	> 1600	> 1700	> 1000	> 1000	>2500	> 2500
Lactulose (mg / kg)	ca. 10	ca. 25	ca. 20	ca. 32	ca. 34	ca. 17	ca. 25

2.6 Ultrahocherhitzte Milch

Die Haltbarmachung der ultrahocherhitzten Milch oder besser bekannt als UHT-Milch erfolgt durch Erhitzung auf 135 bis 150 ° C für mindestens eine Sekunde, wodurch alle Keime und Sporen abgetötet werden. Die Haltbarkeit ungeöffneter und bei Raumtemperatur gelagerter Produkte beträgt mindestens drei Monate [SPREER, 2005].

Bei den Verfahren unterscheidet man zwischen direkten und indirekten, wobei erstere wesentlich produktschonender sind, da die Milch durch direkte Dampfinjektion oder Dampfinfusion auf zirka 150 °C für zwei Sekunden erhitzt und anschließend sofort rückgekühlt wird.

Die indirekte Erhitzung erfolgt durch Plattenwärmetauscher oder Röhrenwärmeüberträger auf zirka 138 °C und anschließende Heißhaltung von vier Sekunden [STRAHM und EBERHARD, 2009].

2.7 Sterilisierte Milch

Im Gegensatz zur Pasteurisation werden bei der Sterilisation neben den vegetativen Mikroorganismen, ebenso deren Dauerformen abgetötet. Dies erfolgt durch Erhitzung der bereits abgefüllten Milch auf mindestens 121 °C für ein Minimum von drei Minuten im Autoklav. Die Temperatur sollte jedoch 125 °C nicht überschreiten, da in diesem Bereich die meisten Geschmacksveränderungen auftreten. Sterilisierte Milch ist ungeöffnet und ungekühlt bis zu einem Jahr haltbar [STRAHM und EBERHARD, 2009].

Durch die *Maillard*-Reaktion sowie durch die teilweise Karamellisierung der Lactose kann die Milch schwach gelblich gefärbt sein [FRANZKE, 1996].

2.8 Indikatorstoffe zur Beurteilung wärmebehandelter Milch

Indikatorstoffe sind Stoffe, welche von Natur aus in der Rohmilch enthalten sind und durch deren Konzentrationsänderungen oder Entstehen, können chemische, biochemische oder physikalische Einwirkungen erkannt werden. Voraussetzung für einen Indikatorstoff ist, dass durch diesen, die zu prüfende Beschaffenheit eindeutig nachweisbar ist und selbst geringe biochemische, chemische und physikalische Einwirkungen durch Konzentrationsänderungen oder Inaktivierungserscheinungen nachweisbar sind [TÖPEL, 2004].

Zur Beurteilung der Hitzebelastung wird zwischen zwei Reaktionsgruppen unterschieden. Der ersten Gruppe (Typ I) gehören Enzyme, Vitamine oder Molkenproteine an, welche denaturiert oder inaktiviert werden.

Die Typ II Reaktionen stellen chemische Verbindungen dar, welche erst während der Thermisierung entstehen [MORALES et al, 2000].

Diese Hitzeindikatoren werden vor allem durch die thermische Reaktion von Proteinen, Lactose und einigen Minorbestandteile gebildet. Da eine deutliche Zunahme erst über 100 °C erfolgt, eignen sich diese Typ II-Hitzeindikatoren besonders zur Charakterisierung unterschiedlich wärmebehandelter Milch [TÖPEL, 2004].

Die Hauptaufgaben dieser Indikatoren sind der Nachweis ausreichender Pasteurisierung, die Kontrolle der festgelegten Wärmebelastungsgrenzen und den Einsatz nicht zulässiger Stoffe aufzudecken [TÖPEL, 2004].

Hitzeindikatoren werden auf 3 unterschiedlichen Wegen gebildet:

2.8.1 Inaktivierung von Enzymen

- *Alkalische Phosphatase (ALP):*

Die *Alkalische Phosphatase* ist vorwiegend in der Fettkügelchenmembran und im Milchplasma enthalten. Die Inaktivierung dieser Phosphomonoesterase ist der klassische Nachweis einer ausreichenden und korrekten Pasteurisierung der Milch. Die mögliche Restaktivität der *ALP* kann photometrisch mit Phenylphosphat oder p - Nitrophenylphosphat bestimmt werden. Die schnellere und sensiblere Methode ist der fluorimetrische Nachweis [CLAEYS et al, 2002]. Somit kann durch die Bestimmung der *ALP* Aktivität auch eine mögliche Kontamination von pasteurisierter oder sterilisierter Milch mit Rohmilch erkannt werden. Eine positive Reaktion reflektiert eine Restaktivität von mindestens 0,5 % der Ausgangsaktivität [CLAEYS et al, 2004].

- *Lactoperoxidase (Lpo):*

Dieses Enzym kann als Indikator zur Differenzierung von pasteurisierter und hochehrhitzter Milch verwendet werden. Dessen Thermostabilität ist jedoch stark von der Zusammensetzung des Mediums, sowie vom pH-Wert, Casein und dem Gehalt an β -Lactoglobulin abhängig [CLAEYS et al, 2002].

Lactoperoxidase ist hochempfindlich gegenüber jeglichem Lichteinfluss und nur unter der Voraussetzung, dass keine lichtinduzierte Inaktivierung des Enzyms stattgefunden hat, darf es als Erhitzungsindikator fungieren.

Die Aktivität der *Lpo* ist bereits nach sechs Sekunden bei einer Temperatur von 81 °C zu 99 % inaktiviert, somit ist es eigentlich ungeeignet, um eine Hoherhitzung, welche durchschnittlich bei 80 bis 90°C für 15 bis 20 Sekunden erfolgt, nachzuweisen [CLAEYS et al, 2004].

- *N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase*:

Diese dient dem Nachweis der Thermisierung von Rohmilch und wird bei Temperaturen zwischen 65 °C und 75 °C inaktiviert. Die Restaktivität erfolgt durch den Einsatz von N-Acetyl-β-D-glucosamin-p-nitrophenol, welches eine Gelbfärbung nach der Hydrolyse ergibt.

Weiters gilt *Fukosidase* als Nachweis für die Thermisierung. Dieses Enzym wird jedoch bereits in einem Temperaturbereich von 55 °C und 65 °C inaktiviert [TÖPEL, 2004].

- *γ-Glutamyltranspeptidase GGT*:

Diese Transferase ist in der Fettkügelchenmembran gebunden und katalysiert die Übertragung von γ-Glutamylresten der Peptide auf α-Aminosäuren. *GGT* dient als Nachweis der Kurzzeiterhitzung und wird erst ab 85 °C vollständig inaktiviert.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt spektrophotometrisch mittels γ-Glutamyl-carboxy-nitroanilin [TÖPEL, 2004].

2.8.2 Bildung von chemischen Verbindungen

- Lactulose:

Lactulose ist in unbehandelter Milch nicht nachweisbar, entsteht jedoch durch die Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung. Durch die Isomerisierung bildet sich aus dem Glucose-Teil der Lactose ein 1,2-Endiol, welches sich zu Lactose, Epilactose oder Lactulose rückbilden kann. In der Milch entsteht diese vor allem

durch die Wärmebehandlung, andere Milchinhaltsstoffe wie Phosphate oder Citrate tragen kaum zur Lactulosebildung bei [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

Hierbei sollte ein Wert von 50 mg / kg Milch bei pasteurisierter Milch nicht überschritten werden und für UHT- Milch gilt ein Maximalwert von 400 mg Lactulose / kg Milch [EBERHARD und REHBERGER, 2005].

- Hydroxymethylfurfural (HMF):

Bei diesem Hitzeindikator muss zwischen freiem HMF und dem Gesamtgehalt an Hydroxymethylfurfural unterschieden werden. Freies HMF kann nur durch den Abbau von Lactulosyllysin im Zuge der *Maillard*-Reaktion gebildet werden, während das gesamte HMF auch durch einen säurekatalysierten Abbau von Lactose entsteht. Diese Umlagerung ist bekannt als die Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung (LA) und ist in Milch hauptverantwortlich für die HMF-Bildung.

Hydroxymethylfurfural dient der Unterscheidung von UHT-Milch und sterilisierter Milch und wird photometrisch mit Thiobarbitursäure oder mittels HPLC nachgewiesen. Der Anteil von HMF variiert zwischen 3,6 und 7,3 $\mu\text{mol} / \text{L}$ Milch, in Rohmilch bis zu 30-140 $\mu\text{mol} / \text{L}$ in sterilisierter Milch [CLAEYS et al, 2002].

- 6-Methyladenosin

Dieser Indikator zählt zu den Ribonukleotiden und entsteht aus 1-Methyladenosin durch die Dimroth-Umlagerung. 6-Methyladenosin ist in Rohmilch nicht vorhanden und entsteht zunehmend mit steigender Temperatur und Länge der Heißhaltezeit. Es dient zur Unterscheidung zwischen Kurzzeit- und Hoherhitzung und kann mittels HPLC analysiert werden [TÖPEL, 2004].

- Furosin

Furosin oder chemisch korrekt $\epsilon\text{-N-(2 furoylmethyl)-L-lysine}$ entsteht bei der sauren Hydrolyse von Lactulosyllysin, neben Pyridosin und Lysin, während der Maillard - Reaktion. Es ist auch bereits in Rohmilch in Mengen von 5-7 mg / 100 g Protein enthalten. In der Literatur gilt ein Grenzwert von 8,6 mg / 100 g

Protein in *Peroxidase*-positiver Konsummilch als Nachweis für eine schonende Pasteurisation [TÖPEL, 2004; CLAWIN - RÄDECKER et al, 1996].

Weiters sind Literaturangaben von 3-5 mg / 100 g Protein in Rohmilch zu finden. In *Peroxidase*-negativer Milch können Furosinwerte bis 40 mg / 100 g Protein erreicht werden [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

Die Furosinbildung erfolgt bereits in einer frühen Phase der *Maillard* - Reaktion und kann somit Auskunft über das Ausmaß der bereits erfolgten Reaktion geben. Weiters kann es zur Charakterisierung von pasteurisierter, hochpasteurisierter und UHT-Milch dienen. Ein deutlich erhöhter Furosinwert kann eine zu starke Erhitzung sowie den möglichen Einsatz von Casein, Molken- oder Milchpulver aufdecken [SCHLIMME et al, 1996].

Die Bildung des Furosins ist stark abhängig vom Proteingehalt des Milchproduktes, wodurch die Angabe dieses Hitzeindikators in g / 100 g Protein angegeben wird.

Analysen haben ergeben, dass entrahmte Milch einen höheren Anteil an Furosin aufweist als Vollmilch, da Fett die Viskosität fördert und somit die Temperatur besser verteilt wird gegenüber Magermilch [CLAEYS et al, 2002].

Furosin ist ein Hitzeindikator in der frühen Phase der *Maillard*-Reaktion und nimmt im Laufe der Reaktion wieder ab. N-ε-carboxymethyllysin (CML) hingegen entsteht erst im Laufe der fortgeschrittenen Reaktion und kann weitere Auskunft über die Proteinschädigung geben. Es ist vor allem in sterilisierter Milch und deren Produkten nachweisbar [ERBERSDOBLER und SOMOZA, 2007].

In der nachfolgenden Tabelle sind die Werte von unterschiedlich erhitzter Milch sowie von Rohmilch angeführt.

Tabelle 2.6: Furosingehalte in wärmebehandelter Milch [CLAWIN-RÄDECKER et al, 1996]

	<i>Temperatur</i> (°C)	<i>Furosin</i> (mg /100 g Protein)
Rohmilch		5-7
Kurzzeiterhitzung	62-75	5-7
Dauererhitzung	62	> 9,5
Hoherhitzung(Indirekt)	86-125	10-40
Ultrahoherhitzung (indirekt)	140	50-120
Sterilisierung	110-134	110-450

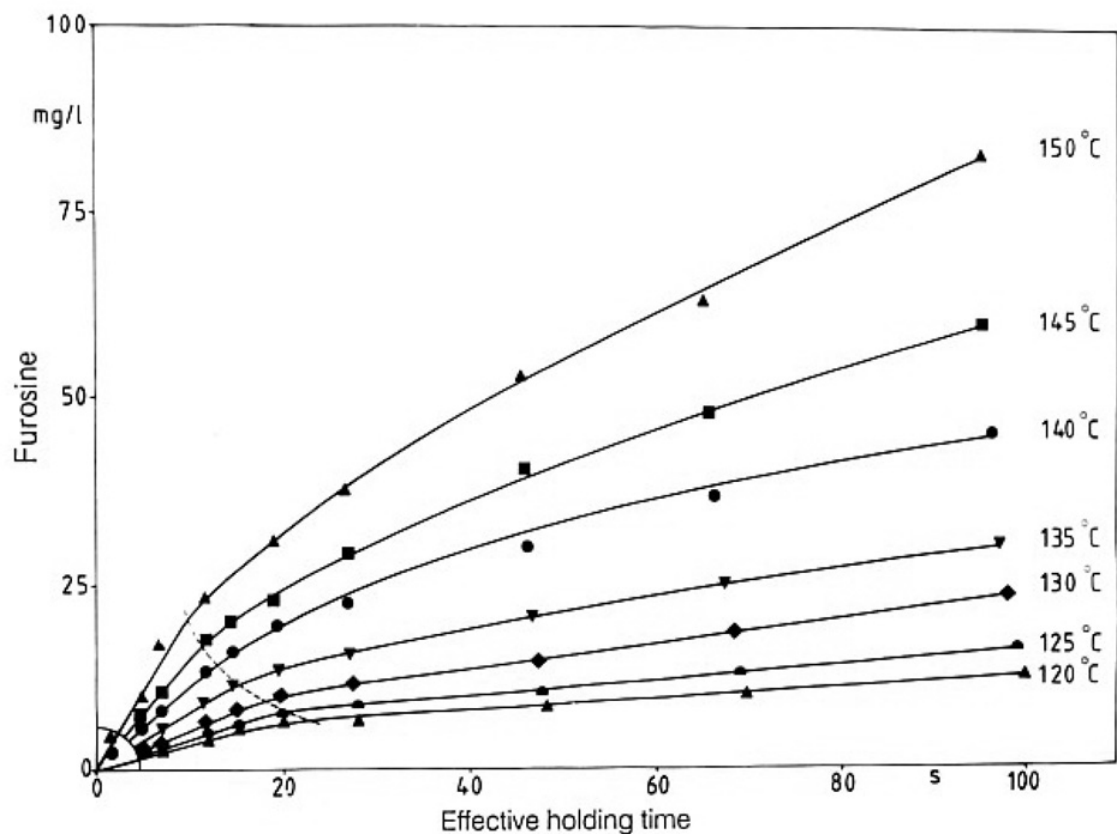


Abbildung 2.5: Furosinebildung in Abhängigkeit der Temperatur [ERBERSDOBLER und SOMOZA, 2007]

Die Abbildung 2.5. zeigt den Verlauf der Furosinbildung bei einer ultrahocherhitzten Milch, welche nach einem indirekten Verfahren erhitzt wurde. Der Gehalt an Furosin steigt nicht linear mit zunehmender Temperatur und somit stärkerer Hitzebelastung, sondern beginnt zu stagnieren. Dies kann auf die zunehmend gebildeten Amadori-Produkte während der *Maillard*-Reaktion zurückgeführt werden [ERBERSDOBLER und SOMOZA, 2007].

2.8.3 Denaturierung von Molkenproteinen

Abhängig von der Art und der Dauer der Hitzebelastung werden die Molkenproteine α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin sowie das Serumalbumin und die Immunglobuline unterschiedlich stark denaturiert.

Je mehr dieser Inhaltsstoffe zerstört wurden, desto stärkerer thermischer Belastung war die Milch ausgesetzt. Aus diesem Grund kann durch Bestimmung des Restgehalts an Molkenproteinen, Serumalbumin und Immunglobulinen zwischen Rohmilch, pasteurisierter, hocherhitzter, ultrahocherhitzter (UHT) und sterilisierter Milch unterschieden werden. Die Auswirkungen der einzelnen Erhitzungsverfahren sind in der Tabelle 2. 7 ersichtlich.

Immunglobuline und das Serumalbumin werden bereits größtenteils bei einer Temperatur von 70 °C denaturiert. Die unterschiedlichen Fraktionen von β -Lactoglobulin werden ab 72 °C inaktiviert und das hitzestabilste Molkenprotein α -Lactalbumin wird erst ab einer Temperatur von 78 °C denaturiert.

Der Nachweis der einzelnen Fraktionen erfolgt mittels HPLC, ELISA oder elektrophoretischen Bestimmungsmethoden [TÖPEL, 2004].

Tabelle 2.7: Durchschnittliche Hitzebelastung von Milch [GALLMANN et al, 2001]

Indikator	Einheit	Pasteu- risation	Bakto- fugation	Mikro- filtration	Hocher- hitzung	UHT direkt	UHT indirekt
Furosin	mg/100g	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

2.9 Zusammensetzung des Milcheiweißes

Kuhmilch weist durchschnittlich einen Anteil von 30 bis 35 g Eiweiß / L auf. Hierbei lassen sich vor allem zwei Hauptfraktionen, in Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit, unterscheiden [SCHMIDT, 2003].

2.9.1 Caseinfraktion

Die Caseinfraktion bildet mit zirka 80 % des Milcheiweißes den Hauptbestandteil. Hierbei unterscheidet man die α_s -, β -, γ - und κ -Caseine, wobei hier wiederum die α_{s1} - und die β -Caseine mit ihren genetischen Variationen den größten Anteil darstellen [BELITZ et al, 2001].

Die Caseinfraktionen bildet jenen Teil des Eiweißes, welcher an seinem isoelektrischen Punkt von pH-Wert von 4,6 und einer Temperatur von 20 °C ausfällt. Weiters können sie als Phosphoproteine die Ca^{2+} -Ionen in der Milch binden. Ein wichtiger Unterschied gegenüber den Molkenproteinen ist, dass Casein durch das Fehlen einer Tertiärstruktur nicht durch Hitze denaturierbar ist [SCHMIDT, 2003].

In der Milch liegen die Komponenten der Caseinfraktion in Form von Caseinkomplexen und Caseinmizellen vor. Dieses Mizellsystem kann durch den

Zusatz von Labenzym oder Ansäuerung destabilisiert werden [BELITZ et al, 2001].

Ansonsten erfolgt die Stabilisierung der Micellen durch hydrophobe und hydrophile Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie durch CCP-Brücken. Darüberhinaus bilden α - und β -Caseine den hydrophoben Kern der Micellen, während die κ -Caseine überwiegend an der Oberfläche lokalisiert sind und somit den hydrophilen Anteil bilden [FOISSY, 2005].

Der Säurezusatz verursacht eine Änderung der elektischen Ladung und es kommt zur Ausbildung einer Gallerte. Des Weiteren kann es zur Ausbildung einer Gallerte beim Einsatz von *Proteinasen*, *Phosphatasen* oder *Glukosidasen*, kommen. Diese Ausbildung der Gallerte ist besonders erwünscht bei der Käseherstellung [SPREER, 2005].

Weiters kann eine Erhitzung der Milch auf über 70 °C dazu führen, dass sich vermehrt Casein-Molkenprotein-Komplexe bilden. Diese setzen sich hauptsächlich aus denaturiertem β -Lactoglobulin und κ -Casein zusammen. Auf dieser Komplexbildung beruht die Möglichkeit der Sterilisierung und Ultrahocherhitzung von Milch, da es durch die veränderten Eigenschaften dieser Komplexe zu keiner Ausflockung der Milch, selbst bei fast vollständiger Denaturierung der Molkenproteine, kommt [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

2.9.2 Molkenproteine

Laut Definition sind Molkenproteine jene Stickstoff-Bestandteile des Milcheiweißes, welche bei einem pH-Wert von 4,6 und 20 °C in Lösung bleiben, jedoch mit 12 % iger Trichloressigsäure fällbar sind.

Der Anteil der Molkenproteine beträgt in Kuhmilch etwa 20 % und diese können in Albumine und Globuline eingeteilt werden. Milchspezifisch sind hier vor allem das α -Lactalbumin und das β -Lactoglobulin mit ihren genetischen Varianten, die

wichtigsten Vertreter. Weitere Molkeneiweißkomponenten sind Immunglobuline, Blutserumalbumine und das eisenhaltige Lactoferrin [FOISSY, 2005].

Molkenproteine sind im Gegensatz zum Casein hitzeempfindlich und denaturieren bei Hitzeeinwirkung, wobei sich die Peptidketten entfalten und reaktive Gruppen frei werden. [SCHMIDT, 2003].

Die Denaturierung erfolgt jedoch nicht nur durch Erhitzung, sondern auch durch eine hohe Konzentration von Ca^{2+} -Ionen und einen pH-Wert über 8,6. Hierdurch wird einer der fünf Cysteinreste frei und diese SH-Gruppe kann mit weiteren Milchproteinen reagieren [BELITZ et al, 2001].

Aus ernährungsphysiologischer Sicht sind Molkenproteine sehr wertvoll, da sie einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren wie Threonin, Lysin, Isoleucin und Tryptophan aufweisen und α -Lactalbumin über eine sehr hohe biologische Wertigkeit verfügt [SCHMIDT, 2003].

Neben den Molkenproteinen und Caseinen enthält Kuhmilch noch weitere Milchproteine wie in Tabelle 2.8 ersichtlich ist.

Tabelle 2.8: Unterschiedlichen Milchproteine in Kuhmilch [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998]

<i>Milchproteine</i>	<i>Mittlerer Gehalt in Gew %</i>
Caseine	2,7
Molkenproteine	0,6
Proteose - Peptone	0,08
Proteine der FKM	0,04

2.9.3 Serumalbumin

Dieses Protein hat einen Anteil am Gesamtproteingehalt der Milch von 0,7 % bis 1,3 % und tritt über die Blutbahn in die Milch ein. Dies ist möglich, da es sowohl in der Milch als auch im Blut denselben strukturellen und immunologischen Aufbau aufweist [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

2.10 Maillard-Reaktion

Die *Maillard*-Reaktion oder nicht-enzymatische Bräunung ist die wichtigste Reaktion der α -Aminogruppe von Aminosäuren mit Carbonylgruppen von reduzierenden Zuckern, Aldehyden oder Ketonen. Die Bezeichnung nicht-enzymatische Bräunung, da sie ohne Zusatz von Enzymen zur Bildung von tiefbraunen Reaktionsprodukten, den Melanoidinen führt [FRANZKE, 1996].

Die *Maillard*-Reaktion lässt sich in drei Stadien unterteilen, das frühe und fortgeschrittene Stadium sowie das Endstadium. Abhängig von ihren Ausgangsprodukten, vor allem Glucose, Fructose, Maltose und Lactose, welche mit der freien Aminogruppen von Aminosäuren, meist des Lysins oder Arginins, reagieren kommt es zu unterschiedlichen chemischen Reaktionsabläufen und Endprodukten. Die α -Hydroxycarbonyl-Umlagerung ist jedoch typisch für das Anfangsstadium, diese ermöglicht die Stabilisierung des Imins durch die Amadori-Umlagerung in eine Amadori-Verbindung. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es vor allem zu Fragmentierungs- und Enolisierungsmechanismen, wobei es zur Bildung von α -Dicarbonylverbindungen kommt, welche die Grundlage für aromaintensive Endprodukte bilden. In der Endphase kommt es dann zur Bildung von Aromaprodukten und ungesättigten, stickstoffhaltigen färbigen Polymeren, den Melanoiden [MULSOW, 2008].

Der Fortschritt dieser Reaktion wird vor allem durch die Temperatur, Lagerungszeit, Wasseraktivität, den pH-Wert und den Gehalt an Lactose und Proteinen beeinflusst [TÖPEL, 2004].

Die nicht-enzymatische Bräunung kann jedoch nicht nur durch Energiezufuhr ausgelöst werden, sondern es kann auch zu einem Spontaneinsatz dieser Reaktion während der Lagerung kommen, welche das Aussehen der Lebensmittel und deren Farbe negativ beeinflussen kann. Im Falle der Milch kommt es zu einer Gelbfärbung, weiters wird der ernährungsphysiologische Wert vermindert und es kann zur Bildung unerwünschter Inhaltsstoffe kommen [MORALES et al, 2004].

2.11 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojaprodukten mittels HPLC

2.11.1 Sojabohne

Die Sojabohne zählt zu den Leguminosen, auch Hülsenfrüchte genannt, welche alle einen hohen Wassergehalt und geringen Fettgehalt aufweisen. Die meisten Hülsenfrüchte werden durch Trocknen haltbar gemacht und müssen vor dem Verzehr erhitzt werden, da sonst das Eiweiß sehr schlecht verdaulich ist und auch mögliche toxische Inhaltsstoffe wie das Enzym *Urease* nicht inaktiviert werden.

Tabelle 2.9: Durchschnittliche Zusammensetzung reifer, getrockneter Sojabohnen [EBERMANN und ELMADFA, 2008]

Bestandteile	Gehalt im Mittel [%]
Kohlenhydrate	30,0
Fett	20,0
Protein	36,5
Wasser	8,5
Rohfaser	9,3
Asche	4,9

Der Fettanteil setzt sich zu 15 % aus gesättigten Fettsäuren (GFS), zu 24 % aus einfach ungesättigten Fettsäuren (MFS) sowie zu zirka zwei Dritteln aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFS) zusammen [CEDERROTH und NEF, 2009].

Der mengenmäßig bedeutendste Anteil bei den löslichen Kohlenhydraten in der Sojabohne wird durch die Stachyose, Raffinose und Saccharose gedeckt [EBERMANN UND ELMADFA, 2008].

Weiters ist die Sojabohne und deren Produkte aus ernährungsphysiologischer Sicht besonders wertvoll, da sie als pflanzliche Produkte kein Cholesterin, keine

Lactose, sondern wichtige Mikronährstoffe wie Isoflavone, Phytat, Saponine, Phytosterole, Vitamine und Mineralstoffe enthalten.

Hierbei sind vor allem die Isoflavone besonders hervorzuheben, welche zu den Phytoöstrogenen zählen, da sie sich laut neuesten Studien positiv auf den Fett- und Glucosestoffwechsel auswirken. Weiters werden ihnen eine Milderung der Symptome bei Frauen in den Wechseljahren zugeschrieben.

In der Sojabohne sind vor allem Genistein und Daidzein, welche in ihrer biologisch inaktiven Form als β -D-Glykoside, Genistin und Daizin, vorliegen, enthalten. Durch Hydrolisierung der inaktiven Formen in der Darmwand durch die bakteriellen β -Glucosidasen entstehen die biologisch aktiven Aglykone, Genistein und Daidzein, welche anschließend in den Intestinaltrakt aufgenommen werden und somit ihre positive Wirkung entfalten können. Daidzein kann weiters zu Demethylangouensin und Equol, Genistein zu Ethylphenol metabolisiert werden [CEDERROTH und NEF, 2009].

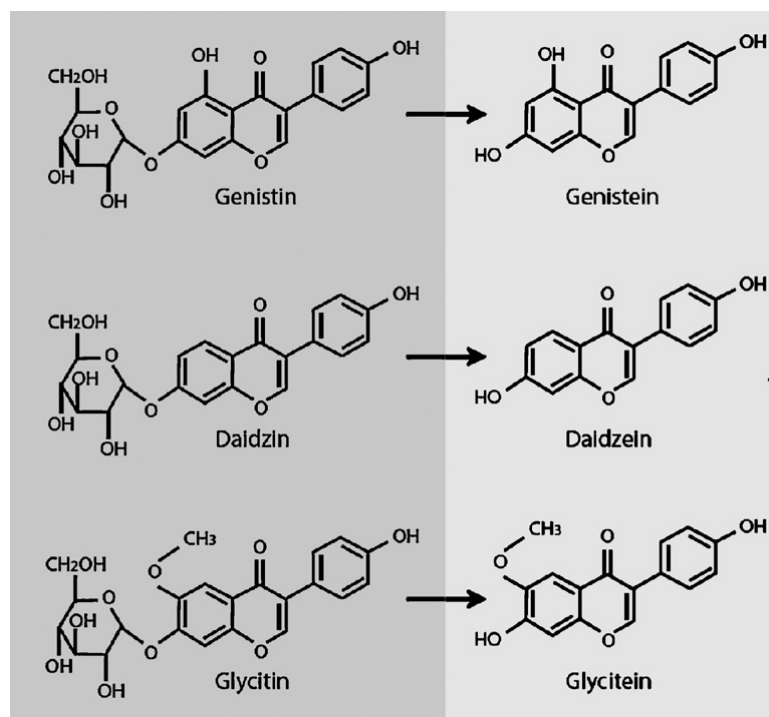


Abbildung 2.6: chemische Umwandlung der inaktiven Glykoside in die biologische aktive Form der Aglykone [CEDERROTH und NEF, 2009]

Darüberhinaus ist die Sojabohne reich an wichtigen Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen, wie aus der Tabelle 2.10 ersichtlich ist.

Tabelle 2.10: Durchschnittlicher Gehalt an Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen in der Sojabohne [EBERMANN und ELMADFA, 2008]

<i>Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine</i>	<i>Gehalt [mg / 100 g Sojabohne]</i>
Eisen	15,7
Zink	4,9
Kupfer	1,7
Selen	0,0178
Thiamin	0,9
Riboflavin	0,9
Niacin	1,6
Pantothensäure	0,8
Folsäure	0,375
Vitamin E	1,95

Die Sojabohne ist vielseitig einsetzbar und dient als Ausgangsprodukt für Sojaöl, Sojamilch, Tofu, Tempeh und Miso. Weiters dienen Phospholipide, hier vor allem das Sojalecithin, in der technologischen Verarbeitung von Lebensmitteln als Emulgatoren [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

2.11.2 Sojamilch

Sojamilch ist ein wässriges Extrakt aus Sojabohnen. Die Sojabohnen werden mit reichlich Wasser eingeweicht, nach Abfiltration des unlöslichen Rückstandes, welcher auch als Okara bezeichnet wird, erfolgt die Erhitzung. Die Entstehung von Bitterstoffen wird durch die *Lipoxygenase* katalysiert.

Diese Reaktion kann jedoch durch frühzeitige Erhitzung des Extrakts vermindert werden.

Abhängig vom Wasser-Sojabohnen-Verhältnis (5:1 oder 10:1) enthält die Sojamilch durchschnittlich 3,6 % Protein, 2 % Fett, 2,9 % Kohlenhydrate und 0,5 % Asche. Somit ist sie reicher an Protein als Kuhmilch und enthält gleichzeitig einen geringeren Anteil an Fett und Kohlenhydraten, sowie kein Cholesterol und keine Lactose [EISENBRAND und SCHREIER, 2006].

2.11.3 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate sind chemisch aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff aufgebaut, wobei hier pro Kohlenstoffatom ein Wassermolekül vorhanden ist, dieses Verhältnis ist in der Summenformel $C_nH_{2n}O_n$ wiedergegeben.

Diese Relation gilt jedoch nicht für komplexe Kohlenhydrate, daher werden diese als Polyhydroxyaldehyde beziehungsweise als Polyhydroxyketone bezeichnet [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Der Begriff Kohlenhydrat ist ein Sammelbegriff für alle Zucker und ihnen nahe stehende Polyhydroxycarbonylverbindungen. Diese kommen in jeder lebenden Zelle vor. Hier in großem Ausmaß in pflanzlichen Verbindungen vor allem als Gerüstsubstanzen wie Cellulose, Hemicellulose oder Pectinstoffen oder als Energiereserve in Form von Stärke.

Im menschlichen und tierischen Organismus dienen Kohlenhydrate hauptsächlich der Energiegewinnung sowie der Bereitstellung der C-Atome für Biosynthesen und können nur in sehr geringem Ausmaß als Glykogen gespeichert werden [FRANZKE, 1996].

Aus diesem Grund sind diese Organismen auf die ständige Zufuhr von Kohlenhydraten angewiesen, da das Gehirn, die Erythrozyten ebenso wie das Nierenmark nur aus Glucose deren Energie gewinnen können. Weiters sind chitinähnliche Polysaccharide in Knochen und Bindegewebe enthalten und erhalten so deren Stabilität und Stützfunktion. Weiters sorgen komplexe Kohlenhydrate für ein länger anhaltendes Sättigungsgefühl und dienen der Stabilisierung des Blutzuckerspiegels [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Kohlenhydrate werden in drei Hauptgruppen eingeteilt.

- Monosaccharide (Einfachzucker):

Diese sind vor allem als Stoffwechselmetaboliten in den Organismen zu finden und setzen sich hierbei meist aus wasserunlöslichen, polymeren Kohlenhydraten zusammen.

Anteilmäßig am häufigsten vertreten sind hier die Pentosen und Hexosen vertreten. Pentosen besitzen ein Grundgerüst aus 5 C-Atomen und kommen hauptsächlich in pflanzlichen Polysacchariden, sowie in Kohlenhydratkomponenten wie Nucleinsäuren, Nukleotiden, Glykosiden und Coenzymen vor. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei die D-Ribose, D-Xylose und L-Arabinose.

Hexosen sind vor allem in Lebensmitteln in chemisch gebundener Form enthalten, wobei die D-Hexosen Glukose, Galaktose, Mannose und die Hexulosen D-Fruktose und L-Sorbose aus technologischer und ernährungsphysiologischer Sicht die wichtigsten Vertreter darstellen.

Zu den Derivaten der Monosaccharide zählen unter anderem Glykoside, Zuckeralkohole, Acetale, Desoxy- und Aminosucker sowie Zuckerester [FRANZKE, 1996].

- Oligosaccharide (Mehrfachzucker):

Der Zusammenschluss zweier oder mehrerer Zucker ist durch die Kondensation der freien glykosidischen Hydroxygruppe mit einer Hydroxygruppe eines anderen Saccharidmoleküls möglich, welche dann als α -oder β -Glykoside gelten.

Abhängig von dieser Bindung unterscheidet man zwischen reduzierenden und nichtreduzierenden Disacchariden. Bei Zweiteren erfolgt die glykosidische Bindung zwischen den beiden anomeren C-Atomen der Saccharidmoleküle, während bei reduzierenden Disacchariden ein anomeres C-Atom ungebunden bleibt.

Der wichtigste Vertreter der nicht-reduzierenden Zucker ist die Saccharose, welcher in allen chlorophyllhaltigen Pflanzen eine wichtige Rolle bei deren Photosynthese spielt. Besonders reichhaltig an Saccharose sind das Zuckerrohr und die Zuckerrübe [FRANZKE, 1996].

In Sojabohnen ist die Saccharose ebenfalls stark vertreten mit bis zu 8,2 % des Gesamtkohlenhydratgehalts und diese ist ein entscheidender Faktor für den typischen leicht süßlichen Geschmack von Sojaprodukten [BAINY et al, 2008]

Bei reduzierenden Zuckern ist vor allem Laktose von Interesse. Laktose ist das Hauptkohlenhydrat in der Milch und wird technologisch aus Süßmolke gewonnen. Bei Erhitzung erfolgt im Zuge der *Maillard*-Reaktion die teilweise Umwandlung zu Lactulose.

Weiters spricht man bei der Kondensation gleicher Zuckermoleküle von Homosacchariden, andernfalls von Heterosacchariden [FRANZKE, 1996].

- Polysaccharide (Vielfachzucker):

Diese Glykane sind aus linear oder verzweigt verknüpften Monosacchariden aufgebaut und spielen eine sehr bedeutende Rolle in der Natur sowie im Lebensmittelbereich.

Weiters kann auch bei Glykanen zwischen Homoglykanen wie Stärke, Glykogen, Cellulose, Dextran, Chitin, Pektinen und Heteroglykanen wie beispielsweise Alginaten, Guaran, Gummi arabicum, Xanthan, Carrageenan unterschieden werden.

Aus technologischer Sicht finden sie Einsatz als

- o Dickungs- und Geliermittel (modifizierte Stärke, Pektin, Algin)
- o Stabilisatoren (Carrageenan, Pektin, Algin, Johannisbrotkernmehl, Agar, Xanthan)
- o Trubstabilisierung von Fruchtsäften (Gummi arabicum, Xanthan, Pektin)
- o Herstellung von Gelees und Konfitüren (Pektin, Algin, Carrageenan, Agar)

- o Erhöhung der Wasserbindungsfähigkeit (Agar, Guaran, Johannisbrotkernmehl)

Die vielfältige Verwendung dieser Polysaccharide beruht auf deren unterschiedlichen Verhalten bei Quellbarkeit, Löslichkeit, Viskosität und Schmelzverhalten [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Viele dieser Polysaccharide zählen zu den Ballaststoffen, diese sind Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden und dienen als Stütz- und Strukturelemente der Zelle. Hierzu zählen Cellulose, Hemicellulose, β -Glucane, Pektine, Lignin und Pflanzengummi.

Diese können unterteilt werden in lösliche und unlösliche Ballaststoffe, wie in Tabelle 2.11 dargestellt ist.

Besonders reich an Ballaststoffen sind Leguminosen, Vollgetreide, Kartoffeln und Gemüse. Obst enthält einen geringeren Anteil an Hemicellulosen, jedoch mehr Pektin und Cellulose und dieser Anteil kann durch Trocknen konzentriert werden. Die empfohlene Menge liegt bei 30 g Ballaststoffen pro Tag [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Tabelle 2.11: Unterschied löslicher und unlöslicher Ballaststoffe [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]

<i>Lösliche Ballaststoffe</i>	<i>Unlösliche Ballaststoffe</i>
Hoher Gehalt an Arabinoxylanen oder Uronsäure	Hauptbestandteile sind Cellulose, Hemicellulose und Lignin
Rascher Abbau durch anaerobe Darmflora	Niedriges Wasserbindungsvermögen Kaum bakterieller Abbau
z.B.: Pektine, Xanthan, Psyllium	z.B.: Cellulose

In Sojaprodukten stellen die Saccharose und die Oligosaccharide Raffinose und Stachyose über 99 % des Kohlenhydratanteils dar. Wobei die Anteile von

Saccharose zwischen 2,5 % und 8,2 %, bei Raffinose von 0,1 % bis 0,9 % und bei Stachyose zwischen 1,4 % und 4,1 % schwanken. Da Oligosaccharide durch ihre α -galaktosidischen Verknüpfungen schwer verdaulich sind, können diese zu Verdauungsstörungen und vermehrter Gasbildung führen. Aus diesem Grund werden Sorten mit einem geringeren Gehalt an Oligosacchariden für einige Produkte, besonders für fermentierte Lebensmittel wie Miso, bevorzugt. Während bei der Herstellung von prebiotischen Sojaprodukten ein höherer Anteil an Raffinose und Stachyose gewünscht wird.

Diese wirken sich positiv auf den Cholesterinspiegel, Blutdruck und die Blutzuckerregulation aus und können das Risiko an bestimmten Krebsarten zu erkranken senken [BAINY et al, 2008].

2.12 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Das Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, einer der leistungsfähigsten chromatographischen Trennmethoden, beruht auf der unterschiedlichen Elution der in einem Stoffgemisch enthaltenen Komponenten. Je stärker die Adsorption der zu trennenden Stoffe zur stationären Phase (Säule) ist, desto länger werden sie in der Säule zurückgehalten. Die enthaltenen Substanzen können so an Hand der Retentionszeit identifiziert werden.

Aufbau einer HPLC - Anlage:

- eine oder mehrere Hochdruckpumpen
- Vorratsgefäße für die Lösungsmittel (mobile Phase)
- Injektor
- gepackte Säule , eventuell eine Vorsäule (stationäre Phase)
- Detektor
- Datenaufnahme (PC)

Bei einer konstanten Zusammensetzung der mobilen Phase spricht man von einer „isokratischen“ Elution, während sich bei einer „Gradientenelution“ das Mischungsverhältnis der Lösungsmittel ändert. Diese „Gradientenelution“ wird eingesetzt, wenn die zu analysierenden Komponenten sehr ähnliche Retentionszeiten aufweisen oder sich sogar überschneiden, somit können diese besser von einander getrennt werden.

2.12.1 Reversed Phase-HPLC

Weiters kann man zwischen einer Normalphasen-HPLC und einer Umkehrphasen (Reversed Phase)-HPLC unterscheiden. Bei der RP-HPLC ist die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar. Während bei der Normalphasen-HPLC die stationäre Phase polarer als die mobile Phase ist.

Als mobile Phase dient meist ein Gemisch polarer Lösungsmittel aus der elutropen Reihe (Wasser, Acetonitril und Methanol).

Die stationäre Phase besteht meist aus Silicagel, welches mit langkettigen Kohlenstoffen, meist unpolaren C-18 Atomen, substituiert wurde und es so zu einer Phasenumkehr kommt [WILEY et al, 1992].

3. *Material und Methoden*

3.1 *Probenmaterial*

Tabelle 3.1: Milchproben

Nr	Milchart	Probe	Chargennummer	MHD
129	Past	Ja! Natürlich frische VM	L2 16:34	19.12.08
130	past	Ja! Natürlich frische VM	L1 12:32	11.01.09
131	past	Ja! Natürlich frische VM	L2 16:00	19.01.09
132	ESL	Ja! Natürlich VM	L1 14:17	09.01.09
133	ESL	Ja! Natürlich VM	L1 09:46	26.01.09
134	ESL	Ja! Natürlich VM	L1 08:50	08.02.09
135	ESL	Ja! Natürlich LM	L1 12:53	08.01.09
136	ESL	Ja! Natürlich LM	L1 12:40	25.01.09
137	ESL	Ja! Natürlich LM	L1 16:38	25.01.09
138	Past	Ja! Natürlich frische VM	L1 09:09	04.02.09
139	Past	Ja! Natürlich frische VM	L1 20:23	16.02.09
140	ESL	Ja! Natürlich VM	L1 13:06	21.02.09
141	ESL	Ja! Natürlich VM	L1 19:36	08.03.09
142	ESL	Ja! Natürlich LM	L1 10:46	19.02.09
143	ESL	Ja! Natürlich LM	L1 11:23	26.02.09
144	Past	Clever VM	L6046 23:47	13.02.09
145	RM	Rohmilch Danzinger Fels / Wagram		
146	ESL	Clever VM länger frisch	L505801:58	13.03.09
147	ESL	Natur Pur Bio VM länger frisch	L090039 01/8/01234	06.03.09
148	ESL	Natur aktiv Bio VM länger frisch	18:52GM 08 1819	13.03.09
149	ESL	BioBio VM länger frisch	L606001:16	16.03.09
150	ESL	Bioness länger frische Bio VM	L1.1/042/15:17	02.03.09
151	ESL	Clever VM länger frisch	L606023:56	16.03.09
152	ESL	Natur Pur Bio VM länger frisch	62/A/08 D81	03.03.09
153	ESL	Natur aktiv Bio VM länger frisch	18:52GA 08 191B	14.03.09
154	ESL	BioBio VM länger frisch	L505117:42	06.03.09
155	ESL	Bioness länger frische Bio VM	L1.2/044/06:29	05.03.09

Die Tabelle 3.1. enthält alle verwendeten Milchproben, wobei die Nummern 129 bis 137 bereits von der vorangegangenen Diplomarbeit stammen [SCHMID, 2009]. Die Nummern 129 bis 143 waren gefroren, während die übrigen Milchproben gekühlt geliefert wurden.

3.2 Ermittlung des nativen β -Lactoglobulingehalts

als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC

Chromatographisches System:

Waters 600 System Controller Millipore 600EPA898

Waters TM 600 Pumpe

Waters TM bus SAT/IN Module

Waters TM 2489 UV/Visible Detektor

Waters TM Rheodyne 7725i Injektor

HPLC Säule Waters TM Symmetry 300 TM C18 3,5 μ m, 2,1 x 150 mm, Part. No. 186000200

Filter Sartorius Stedim Minisart RC 4 0,20 μ m, Produkt Nummer 17821 - K

Hamilton Spritze 25 μ L , Microliter TM Syringes , P/N 80465/00

Chemikalien:

Stickstoff, Linde, 5.0

UHQ-Wasser

Trifluoressigsäure, > 99,5 %, FLUKA

Salzsäure 37% rauchend, Rotipuran® p.A. ROTH®

Acetonitril, Rotipuran® HPLC Gradient Grade 99,9 % , ROTH®

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; MERCK, MM 177,99 g / mol

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.A. ≥ 99 %, MERCK,
MM 137,99 g / mol

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

Geräte und weitere Hilfsmittel

Glasgefäße pyrolisiert

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

pH-Meter, Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor pH-Meter

Zentrifuge, Beckmann J2-HS, USA

Zentrifugenröhrchen, Corex® 15 mL USA,

Universal Container 30 mL, „Sterilin“

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

Einwegspritzen, BRAUN Injekt® 2 mL

Eppendorf - Zentrifuge, 5415R T

Analysenwaage Mettler Toledo, AE 163

Laufmittelfilter, MAGNA, Nylon, Supported, Plain, 0,20 µm, 47 mm

Pumpe für Saugnutsche, Millipore LR37697

3.2.1 Aufarbeitung der Milchproben

- Gefrorene Milchproben auftauen sowie gekühlte Milchproben auf etwa 20 °C temperieren
- Probenverpackung gründlich, aber vorsichtig schwenken, um bessere Phasendurchmischung zwischen der Wasser- und Fettphase zu erreichen
- 10 mL Milch mit einer Vollpipette in ein 25 mL Becherglas mit einem Magnetrührer pipettieren
- mit 2 M HCl auf pH-Wert 4,5 einstellen, hierfür werden in etwa 250 µL benötigt
- 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- bei 8000 rpm und 4 °C das ausgeflockte Casein für 20 min abzentrifugieren
- 1 mL klares Filtrat der Rohmilch, pasteurisierter oder ESL-Milch zu 9mL 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,70 zugeben
- vortexen

- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Probe erneut vortexen
- Ein Aliquot von 1 mL entnehmen und in Eppendorfgefäß von 1,5 mL überführen
- für 20 min bei 4°C und 13200 rpm zentrifugieren
- den klaren Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- hiervon 500 µL durch 0,2 µm Filter filtrieren
- Injektion von 20 µL Probe in die HPLC

Lösungen:

- *0,1 M Phosphatpuffer, pH-Wert 6,70*
- 0,2 M Natriummdihydrogenphosphat :
In einem 100 mL Messkolben werden 2,75979 g des Natriumdihydrogenphosphats (NaH_2PO_4) eingewogen, etwa bis zur Hälfte mit UHQ-Wasser befüllt, im Ultraschallbad gelöst und anschließend bis zur Markierung aufgefüllt.
- 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat:
1,7799 g des Dinatriumhydrogenphosphats-dihydrats ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) werden in einem 50 mL Messkolben eingewogen, diesen bis zur Hälfte mit UHQ-Wasser befüllen, im Ultraschallbad lösen und bis zur Markierung mit UHQ-Wasser auffüllen.

Zur Herstellung des 0,1 M Phosphatpuffers werden 57 mL der Natriumdihydrogenphosphatstammlösung mit 43 mL der Dinatriumhydrogenphosphatstammlösung in einem 200 mL Messkolben vereinigt und bis zur Markierung mit UHQ-Wasser aufgefüllt.

- 2 M HCl

In einem 200 mL Messkolben etwa 100 mL UHQ-Wasser vorlegen, danach 33,12 mL der 37 %igen HCl hinzufügen und mit UHQ-Wasser bis zur Markierung auffüllen.

Laufmittel:

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

In einem 500 mL Messkolben ca. 350 mL UHQ-Wasser vorlegen, 500 µL Trifluoressigsäure hinzufügen und anschließend bis zur Markierung mit UHQ-Wasser auffüllen.

- Laufmittel B: Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure

Für 500 mL Laufmittel werden in einem 500 mL Messkolben ca. 350 mL Acetonitril vorgelegt, 500 µL Trifluoressigsäure beifügen und bis zur Markierung mit Acetonitril auffüllen.

- Laufmittel C: 100% Acetonitril

- Laufmittel D: 20% Acetonitril

Für 500 mL Laufmittel werden separat 100 mL Acetonitril und 400 mL UHQ-Wasser in einem Messzylinder abgemessen und anschließend in einer Glasflasche vereinigt.

Anschließend werden alle Laufmitte durch den 0,2 µm Filter filtriert, mit Ausnahme des Laufmittels C, da dieses aus 100 %igem AcN besteht.

Die Bestimmung von nativem β -Lactoglobulin wurde bereits im Rahmen von vorhergehenden Diplomarbeiten optimiert [NUSSBAUMER, 2006; MAIER, 2009; SCHMID, 2009].

Folgende Gradientenelution wurde aus diesen übernommen, ebenso wie die Probenaufbereitung.

3.2.2 Chromatographische Parameter zur Bestimmung des nativen β -Lactoglobulins

Injektionsvolumen: 10 μ L

Säulentemperatur: 40 °C

UV - Detektion: 205 nm

Laufmittel:

Laufmittel A: 100 % UHQ mit 0,1 % (v/v) TFA

Laufmittel B: 100 % Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA

Laufmittel D: 20 % Acetonitril

Startgradient:

Time [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
100	0,00	64	36	0	11

Gradientenelution:

Time [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

Die Laufzeit einer Injektion beträgt 25 Minuten, die nächste erfolgt nach einer Laufzeit von 35 Minuten.

Endgradient:

Time [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

3.2.3. Herstellung der Kalibrationsstandards

Chemikalien:

β -Lactoglobulin (90 %), kristallisiert und lyophilisiert, SIGMA

α -Lactalbumin (85 %), lyophilisiertes Pulver, SIGMA

Trifluoressigsäure, > 99,5 % FLUKA

Acetonitril, Rotipuran® HPLC Gradient Grade 99,9%, ROTH®

0,1 M Phosphatpuffer, pH-Wert 6,7 (Herstellung siehe Kapitel 3.2.1)

Helium, Linde, 5.0

Geräte und Hilfsmittel:

Glasgefäße pyrolisiert

Analysenwaage, Mettler Toledo AE 163

Filter, Sartorius Stedim Minisart RC 4 (0,20 μ m)

Einwegspritzen, BRAUN Injekt® 2 mL

Durchführung:

35,55 mg β -Lactoglobulin (90 %) in einen 10 ml Kolben einwiegen und diesen bis zur Marke mit 0,1 M Phosphatpuffer ergänzen. Diese Lösung entspricht einer Konzentration von 32 mg β -Lactoglobulin / 10 mL.

Weiters 37,65 mg α -Lactalbumin (85 %) in einen 10 mL Kolben einwiegen und mit 0,1 M Phosphatpuffer bis zur Markierung auffüllen. Diese Lösung entspricht einer Konzentration von 32 mg α -Lactalbumin / 10 mL. Diese Lösung wird im Verhältnis 1: 2 verdünnt, da nur etwa halb soviel α -Lactalbumin wie β -Lactoglobulin in der Milch enthalten ist.

In einem 20 mL Kolben wird eine 1:10 Verdünnung dieser beiden Lösungen hergestellt, indem jeweils 2 mL β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin in den

Kolben pipettiert werden und dieser mit 0,1 M Phosphatpuffer aufgefüllt wird. Diese dient als Ausgangslösung für die Kalibrationsstandards.

Alle 6 Kalibrationslösungen im Bereich von 0,2 mg bis 3,2 mg β -Lactoglobulin / mL und 0,1 mg bis 1,6 mg / mL α -Lactalbumin werden jeweils dreimal hintereinander injiziert [NUSSBAUMER, 2006].

Tabelle 3.1 Herstellung der β – Lg Kalibrationsstandards

Standard- lösung	β -Lg Milch [mg/mL]	α -La Milch [mg/mL]	Herstellungsverfahren [µL]	Verdünnungs- stufe
I	0,2	0,1	625 SL IV + 9375 PP	16
II	0,4	0,2	1250 SL IV + 8750 PP	8
III	0,8	0,4	2500 SL IV + 7500 PP	4
IV	1,6	0,8	5000 SL IV + 5000 PP	2
V	2,4	1,2	7500 SL IV + 2500 PP	1,3
VI	3,2	1,6	100000	1

Der Gehalt an β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin kann anschließend direkt aus den Chromatogrammen der Millenium-Software abgelesen werden.

3.3 Bestimmung des Furosingehalts in Milch

Chromatographisches System:

Waters 600 System Controller Millipore 600EPA898

Waters TM 600 Pumpe

Waters TM bus SAT/IN Module

Waters TM 2489 UV/Visible Detektor

Waters TM Rheodyne 7725i Injektor

HPLC Säule Waters Symmetry 300 TM C18 3,5 µm, 2,1 x 150 mm, Part. No. 186000200

Filter Sartorius Stedim Minisart RC 4 0,20 µm, Produkt Nummer 17821 - K

Hamilton Spritze 25 µL , Microliter TM Syringes , P/N 80465/00

Chemikalien:

Salzsäure 37 % rauchend, ROTH®

Stickstoff, Linde, 5.0

Methanol, ROTH® Rotisolv® HPLC Gradient Grade

Acetonitril, ROTH® Rotisolv® HPLC Gradient Grade 99,9 %

Ameisensäure, ROTH® Rotisolv® ≥ 98 %

Sodium 1-heptane-sulfonate C₇H₁₅O₃S Na SIGMA (MM: 202,24697 g / mol)

Geräte und weitere Hilfsmittel:

Wasserbad, LHG W16

Glasgefäße pyrolisiert

Pyrex-Röhrchen, Bibby, 15 mL

Universal Container "Sterilin", 30 mL

Bijou Container „Sterilin“, 7 mL

Trockenschrank, Statvis Gossen Pantatherm D

Faltenfilter, Whatman® 595 ½ Ø 150 mm

Sep-Pak® Vac 3cc C₁₈ Cartridges, WATERSTM

Assistent Reagenzgläser 6-6,5 mm Ø

Reaktionsgefäß mit Verschluss für Pico Tag, SunChrom GmbH

Pico Tag Workstation, Waters PTS 3142

Pumpe Pico Tag, Model DS5

Eppendorf Zentrifuge, 5415R

Laufmittelfilter, MAGNA, Nylon, Supported, Plain, 0,20 µm, 47 mm

Analysenwaage, AND Electronic Balance FX 300

Analysenwaage, Mettler AE 163

Lösungen:

- Herstellung der Verdünnlösung, in welcher die eingetrocknete Probe wieder in 400 µL aufgenommen wird. Diese sollte jeden Tag frisch hergestellt werden.

In einem 10 mL Messkolben etwa 5 mL UHQ-Wasser vorlegen, 500 µL Acetonitril und 20 µL Ameisensäure hinzufügen. Anschließend bis zur Markierung mit UHQ-Wasser auffüllen.

- 50 mM Heptansulfonsäure:

Einwaage von 2,0224 g Natrium-1heptan-sulfonat $C_7H_{15}O_3S Na$ in einen 200 mL Messkolben und bis zur Markierung mit UHQ-Wasser befüllen.

Laufmittel:

- Laufmittel A: Heptansulfonsäure + 0,02 % Ameisensäure

In einem 500 mL Messkolben etwa 100 mL UHQ-Wasser vorlegen, 50 mL 50 mM Heptansulfonsäure sowie 1 mL 100 %ige Ameisensäure hinzufügen und anschließend bis zur Markierung mit UHQ-Wasser auffüllen.

- Laufmittel B: 100 % Acetonitril

- Laufmittel D: 20 % Acetonitril

Hierzu werden in zwei separaten Messuren jeweils 160 mL UHQ-Wasser und 40 mL Acetonitril abgemessen und anschließend in einer 250 mL Schraubflasche vereinigt.

Laufmittel A und D werden anschließend durch den 0,2 µm Laufmittel-Filter filtriert.

3.3.1. Aufarbeitung der Proben:

Hydrolyse:

- Auftauen der gefrorenen Milchprobe und für 10 min bei 40 °C im Wasserbad temperieren
- In einem 25 mL Becherglas mit Magnetrührer vorsichtig durchmischen und 2 mL entnehmen
- In einem 15 mL Pyrex-Röhrchen die 2 mL Milch mit 6 mL HCl (10,6 mol/L) mischen
- vortexen
- 2 min mit Stickstoff begasen
- Abwiegen
- Anschließend für 23 Stunden bei 110 °C Im Trockenschrank erhitzen, wobei nach 1 Stunde die Probe zu vortexen ist
- Auskühlen lassen
- Die Probe abwiegen und eventuelle Verluste mit der 8 M HCl ausgleichen
- vortexen
- Die Probe durch einen Faltenfilter mit einem Durchmesser von 150 mm filtrieren
- Sammeln der Probe in einem kleinen „Sterilin“

Sep-Pak Säule:

- 5 mL Methanol in die Sep-Pak Säule pipettieren und den Inhalt in einem 25 mL Becherglas sammeln
- anschließend 10 mL UHQ-Wasser in die Säule füllen und ebenso wieder in dem Becherglas sammeln
- anschließend 500 µL Probe in die Säule pipettieren, sobald diese aufgehört hat zu tropfen, das Becherglas entfernen und den Inhalt verwerfen
- ein kleines „Sterilin“ unter die Säule stellen
- 3 mL HCl (3 mol/L) in die Säule pipettieren und den Inhalt in dem „Sterilin“ sammeln

Anschließend erfolgt das Eintrocknen von 200 µL Probe in der Pico-Tag.

Pico-Tag:

- 200 µL Probe in ein Assistenz- Reagenzglas pipettieren
- Reagenzglas wird in Reaktionsgefäß gestellt und die Probe in der Pico-Tag eingetrocknet
- Getrocknete Probe in 200 µL Verdünnlösung, siehe Kapitel 3.3, aufnehmen
- vortexen
- Abzentrifugieren
- Aufgenommene Probe durch 0,2 µm Filter durchfiltrieren

Probe kann nun in die HPLC injiziert werden. Die Detektion der Probe erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm und einem isokratischen Fluss von 0,35 mL/ min.

3.3.2. Chromatographische Parameter zur Bestimmung von Furosin

Injektionsvolumen: 20 µL

Säulentemperatur: 35 °C

Absorption: 280 nm

Startgradient:

Time [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	89	11	0	6
76	0,35	89	11	0	6
160	0,00	89	11	0	11

Isokratische Elution:

Time [min]	Flussrate [mL/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Laufmittel D [%]	Kurventyp
0	0,35	89	11	0	*
20	0,35	89	11	0	6
50	0,00	89	11	0	11

Endgradient:

Time [min]	Flussrate [mL/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Laufmittel D [%]	Kurventyp
Initial	0,35	89	11	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	0	0	100	11

3.3.3 Berechnung des Furosingehalts in Milchproben

Um den Furosinanteil jeder Milchprobe in mg / 100 g Protein angeben zu können, muss der Gesamtproteingehalt zuerst mittels *Kjeldahl*-Bestimmung, siehe Kapitel 3.4.1, ermittelt werden und anschließend die folgende Berechnung erfolgen. Diese wurde von meinen Kollegen [MAIER, 2009; SCHMID, 2009] ermittelt.

Ermittlung des Furosingehalts bei Rohmilch, pasteurisierter Milch und ESL - Milch

$$\text{mg Furosin / 100 g Protein} = \frac{pM \cdot 50 \cdot 24 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot 100 \cdot MM}{P \cdot 10^{12}}$$

$$\frac{pM \cdot 1200 \cdot 10^7 \cdot MM}{P \cdot 10^{12}}$$

$$\frac{pM \cdot 0,012 \cdot MM}{P}$$

Tabelle 3.2: Erklärung der Furosinberechnung [SCHMID,2009]

pM	Die Fläche des Furosinpeaks kann direkt aus der Millenium – Software abgelesen werden. Diese berechnete Fläche entspricht pMol je 20 µL (entspricht dem Injektionsvolumen)
50	Umrechnung von 20 µL Injektionsvolumen auf 1 mL
24	Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors während der Milchprobenvorbereitung. Bei der Hydrolyse entsteht eine 1:4 Verdünnung und während der Festphasenextraktion durch die Sep-Pak Säule eine erneute 1:6 Verdünnung. Ergibt eine Gesamtverdünnung von 1:24
1000	Umrechnung von g auf mg Furosin
100	Berechnung von g auf 100 g Protein
100	Gehalt an g Protein in 1 mL Milch
MM	Die molare Masse des Furosin beträgt 254,28 g / mol
P	Gesamtproteingehalt in %
10 ¹²	Umrechnung von pMol auf Mol

3.4 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Chemikalien:

Wasser, destilliert

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

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

Kupfer-(II)-sulfat, wasserfrei p.A. MERCK

Schwefelsäure 98 % Rotipuran für N-Bestimmung ROTH

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

Salzsäure 4 mol/l-4 N Lösung Maßlösung ROTH

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

Natriumhydroxid $\geq 99\%$ ROTH

Material:

Destillationsapparatur BÜCHI 315

Heizblock BÜCHI 430

Aufschlusskolben

Tiegelzange

Analysenwaage, AND Electronic Balance FX 300

Weithals-Erlenmeyerkolben

Abzugrohr

Wasserstrahlpumpe

Lösungen:

- 35 % ige Natronlauge:

1000 mL destilliertes Wasser in einem Gefäß vorlegen und 700 g Natronlauge hinzugeben, vorsichtig umrühren und mit destilliertem Wasser auf 2000 mL auffüllen.

- 2 % ige Borsäure:

20 g Borsäure in einem 1000 mL Messkolben einwiegen und diesen zu zwei Drittel mit destilliertem Wasser auffüllen, einen Magnetrührer hinzugeben und mischen bis sich die Borsäure vollständig aufgelöst hat. Nach dem Entfernen des Magnetrührers, den Messkolben mit destilliertem Wasser bis zur Markierung füllen.

- 0,1 M HCl

In einem 1000 mL Messkolben etwa 500 mL destilliertes Wasser vorlegen, 25 mL Salzsäure (4 mol / L) hinzufügen, den Kolben mit destilliertem Wasser auffüllen und mischen.

- Katalysatorgemisch:

1000 g Kaliumsulfat mit 4 g Kupfersulfat gut vermischen.

3.4.1.Aufarbeitung der Proben:

Alle Proben werden nach der *Methode nach Kjeldahl* im Doppelansatz analysiert.

Prinzip:

Das organische Material der Probe wird durch Schwefelsäure zu Kohlendioxid oxidiert, wobei diese selbst zu Schwefeldioxid reduziert wird. Der Stickstoff liegt nach dem Aufschluss als Ammoniumsulfat gelöst in der Schwefelsäure vor. Durch Zugabe von Natriumhydroxid wird die Schwefelsäure neutralisiert und Ammoniak quantitativ ausgetrieben, welcher anschließend durch die Wasserdampfdestillation in die Borsäure eingeleitet wird. Anhand der verbrauchten Menge an 0,1 M Salzsäure bei der Titration kann der Proteingehalt der Probe berechnet werden [MATISSEK und STEINER, 2006].

Probenaufschluss:

- Aufschlusskolben beschriften
- $2 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ Probe auf Analysenwaage einwiegen
- 1 Löffel Katalysatorgemisch in jeden Aufschlusskolben geben und zwei Glasperlen hinzufügen
- Probe mit 20 mL 98 %iger Schwefelsäure mittels Dispenser im Abzug versetzen
- Abzugrohr auf Kolben aufsetzen und mit Klemmen befestigen
- das vordere Ende des Abzugrohrs mit einem Taschentuch locker verschließen und am hinteren Ende die Wasserstrahlpumpe anschließen
- Wasserstrahlpumpe einschalten
- Heizblock auf Stufe 2 einstellen
- Kochen der Probe für etwa 1,5 Stunden bis das Probengemisch braun wird
- Sobald die Probe nicht mehr schäumt, Heizblock auf Stufe 4 aufdrehen
- Kochen für weitere 1,5 bis 2 Stunden bis die Probe eine leicht grünliche Färbung annimmt
- Für weitere 1,5 Stunden auf Stufe 7 kochen
- Heizblock abschalten
- Aufschlusskolben für etwa 20 Minuten abkühlen lassen
- Wasserstrahlpumpe abschalten und Abzugrohr entfernen
- Aufschlusskolben aus Heizblock nehmen
- Probe mit 50 mL glasdestilliertem Wasser vorsichtig vom Rand aus versetzen

Destillation:

- In etwa 30 Minuten vor Ende des Aufschlusses die Destillationsapparaturen einschalten
- Wasserhahn aufdrehen
- In jeden Weithals-Erlenmeyerkolben 20 mL 2 %ige Borsäure mittels Dispenser vorlegen

- Borsäure mit 2 Tropfen Mischindikator versetzen
- Weithalskolben unter Kühlapparatur stellen und das Kühlende in die Borsäure eintauchen
- Aufschlusskolben in Destillationsapparatur einspannen und vorsichtig Natronlauge hinzufügen bis sich Probengemisch braun und schließlich leicht bläulich verfärbt
- Beginn des Kochvorgangs
- Sobald ein Drittel des Erlenmeyerkolbens gefüllt ist kann der Kochvorgang beendet werden, Lösung verfärbt sich grün
- Aufschlusskolben vorsichtig entnehmen, Inhalt auskühlen lassen und verwerfen

Titration:

Hinzufügen der 0,1 M HCl zum Probengemisch bis sich dieses von grün wieder nach leicht rosa verfärbt.

3.4.2 Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl

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

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

Die Berechnung des Gesamtprotein- oder Rohproteingehalts erfolgt nach der folgenden Formel unter Berücksichtigung des Faktors 6,38 für Milch und Milchprodukte [MATISSEK und SPRINGER, 2006].

$$P = \frac{(a - b) \cdot 1,4008 \cdot 6,38}{E}$$

Tabelle 3.3: Erläuterungen zur Berechnung des Gesamtproteingehalts [MATISSEK und STEINER, 2006]

<i>a</i>	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/L) im Hauptversuch in mL
<i>b</i>	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/L) im Blindversuch in mL
<i>F</i>	Umrechnungsfaktor zu Errechnung des Proteingehalts
<i>E</i>	Proteineinwaage in g
1,4008	1 mL Salzsäure-Maßlösung (0,1 mol/L) entspricht 1,4008 mg Stickstoff

3.5 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in

Sojaprodukten mittels HPLC

3.5.1. Probenmaterial

Alle Versuche zur Bestimmung der löslichen Ballaststoffe in Sojaprodukten wurden mit entfetteten, getrockneten Sojabohnen durchgeführt. Sojabohnen der Sorten Cordobar, Eссор-Cardiff und Kent wurden verwendet.

3.5.2. Aufarbeitung der Sojaprobe

- **Methode I [Jangechud und Bunnag, 2001]**

Chemikalien:

UHQ-Wasser

Oxalsäure-Dihydrat, p.A. $\geq 99,5\%$, ACS, ISO-Reag., MERCK

Blei(II)-acetat-Trihydrat, p.A. $\geq 99,5\%$, ACS, ISO, ROTH®

Ethanol absolut, p.A., MERCK

Geräte und weitere Hilfsmittel:

Analysenwaage, ANP Electronic Balance FX 300

Wasserbad VWR™

Beckmann-Zentrifuge JS-HS, USA

Eppendorf Centrifuge 5415 R

SpeedVac, Savant

SOCOREX Swiss Pipette 0,5-5 mL

Kulurröhrchen PYREX 50 mL, Barloworld Scientific Ltd

Eppendorf Zentrifuge 5415 R

Sep - Pak®, Vak 3cc C-18 Cartridges, WATERS™

Universal Container "Sterilin", 30 mL

Lösungen:

10%iges Bleiacetat: 11,66 g der Blei(III)acetat-Trihydrats in 100 mL Messkolben einwiegen und mit UHQ-Wasser auffüllen

10%ige Oxalsäure: 14,001 g des Oxalsäure-Dihydrats in 100 mL Messkolben einwiegen und mit UHQ-Wasser auffüllen

80%iges Ethanol: in einem 500 mL Messkolben 400 mL Ethanol (100 %) vorlegen und mit UHQ-Wasser auffüllen

Extraktion:

- Einwaage von 2 g Probe in 30 mL Pyrex-Röhrchen
- Zugabe von 10 mL 80 %igen Ethanol
- vortexen
- 15 min im Wasserbad bei 80 °C erhitzen, gelegentlich schütteln
- Pyrex-Röhrchen abkühlen lassen
- 5 min bei 5000 rpm und 20 °C zentrifugieren (Beckmann-Zentrifuge)
- Überstand (I) mit 5 mL Socorex-Pipette in 25 mL Messkolben überführen
- 5 mL 80 %igen Ethanol zu Rückstand hinzufügen
- vortexen
- 15 min unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad bei 80 °C erhitzen
- Pyrex-Röhrchen abkühlen lassen
- 5 min bei 5000 rpm und 20 °C zentrifugieren (Beckmann-Zentrifuge)
- Überstand (II) erneut in 25 mL Messkolben überführen
- 10 mL 80 %igen Ethanol wieder zu Rückstand hinzufügen
- vortexen
- 15 min im Wasserbad bei 80 °C unter gelegentlichem Schütteln wieder erhitzen
- Pyrex-Röhrchen abkühlen lassen
- 5 min bei 5000 rpm und 20 °C zentrifugieren (Beckmann-Zentrifuge)
- Überstand (III) zu den vorigen 2 Fraktionen in 25 mL Messkolben hinzufügen
- 25 mL Messkolben mit 80 %igen Ethanol auffüllen

- Aliquot von 0,75 mL aus Messkolben entnehmen und in 2 mL Eppendorfgefäß überführen
- 0,5 mL 10 %iges Blei-Acetat hinzufügen
- vortexen
- Zentrifugation der Probe für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C
- Überstand von 0,75 mL in neues Eppendorfgefäß überführen
- 0,5 mL 10 %ige Oxalsäure beifügen
- vortexen
- Zentrifugation der Probe für 10 min bei 5000 rpm sowie 4 °C
- 1 mL Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen

Sep-Pak Säule:

- 5 mL Methanol in die Säule pipettieren und den Inhalt in einem Becherglas sammeln
- 5 mL UHQ-Wasser ebenfalls in die Sep-Pak Säule pipettieren und ebenfalls in einem Becherglas auffangen
- 0,5 mL der Probe in die Säule pipettieren, sobald das UHQ-Wasser vollständig in die Säule eingesogen wurde
- kleines Sterilin unter die Sep-Pak Säule stellen, wenn diese aufgehört hat zu tropfen
- 3 mL UHQ-Wasser in die Säule pipettieren und den Inhalt in einem „Sterilin“ auffangen

SpeedVac:

- 0,5 mL der Probe in Eppendorfgefäß überführen
- Eintrocknen der Probe in SpeedVac für etwa 2 Stunden
- Wiederaufnahme der getrockneten Probe in 0,5 mL Laufmittel (70 % AcN)
- Probe durch 0,2 µm Filter filtrieren
- Injektion von 20 µL in die HPLC

- **Methode II [CICEK, 2001]**

Chemikalien

UHQ-Wasser

Acetonitril HPLC Gradient Grade $\geq 99,9\%$, VWR, Prolabo®

Geräte und weitere Hilfsmittel:

SpeedVac, Savant

Kühlfalle, Savant

Laborschüttler KS 125 basic, IKA - Labortechnik

Pyrex-Röhrchen 15 mL

Eppendorf Centrifuge 5415 R

SOCOREX Swiss Pipette 0,5-5 mL

Extraktion:

- 1 g der Probe in 30 mL Pyrex-Röhrchen einwiegen
- 10 mL UHQ-Wasser hinzufügen
- vortexen
- 15 min im Schüttler bei ca. 330 rpm schütteln
- Zentrifugation bei 5000 rpm bei 20 °C für 5 min (Beckmann-Zentrifuge)
- 5 mL des Überstands in neues Pyrex-Röhrchen pipettieren
- 7 mL Acetonitril hinzufügen
- vortexen
- Röhrchen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min bei 20 °C
- 1 mL des Überstands in 1,5 mL Eppendorfgefäß überführen
- Eintrocknen der Probe in der SpeedVac für ca. 1,5-2 Stunden
- Aufnahme der Probe in 400 μ L 70 %igem AcN
- vortexen
- Filtration durch 0,2 μ m Filter
- Injektion von 20 μ L in die HPLC

Alle nachfolgenden beschriebenen Versuche zur Verbesserung der Extraktionskraft von Zuckern wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Versuch I:

Um die beiden Methoden besser vergleichen zu können, wurden diese etwas modifiziert. Bei der ersten Methode wurde die Anwendung der Sep-Pak Säule ausgeschlossen und die Trocknung der Probe erfolgte ebenfalls in der SpeedVac. Weiters wurde die dritte Extraktion weggelassen, bei der Methode nach CICEK wurde jedoch eine zweite Extraktion eingeführt.

Bei beiden Methoden wurde eine zweimalige Extraktion durchgeführt, wobei die Einwaage in beiden Fällen jeweils 1,5 g Sojabohnenprobe je 10 mL 80 %igen Ethanol beziehungsweise UHQ - Wasser betrug. Bei der Analyse von Sojamilch ist eine Einwaage von 1g lyophilisierter Sojamilch ausreichend.

Die genaue Durchführung erfolgte nach folgendem Prinzip:

Methode I :

- 1,5 g gemahlene Sojabohnen in 30 mL Pyrex-Röhrchen einwiegen
- Zugabe von 15 mL 80 %igem Ethanol
- vortexen
- 15 min unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad bei 80 °C im Wasserbad erhitzen
- abkühlen
- 5 min bei 5000 rpm und 20 °C zentrifugieren
- Überstand in 25 mL Messkolben überführen
- 10 mL 80 %igen Ethanol zum restlichen Überstand der Sojabohnen hinzufügen
- vortexen, erhitzen, abkühlen, zentrifugieren nach denselben Vorgaben
- Überstand in 25 mL Messkolben überführen und diesen mit 80 %igem Ethanol bis zur Markierung auffüllen
- Aliquot von 0,75 mL des Extrakts in Eppendorfgefäß überführen

- Zugabe von 0,5 mL des Blei-Acetats
- vortexen
- Zentrifugieren der Probe für 10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm
- Aliquot von 0,75 mL des Übersandes entnehmen
- Zugabe von 0,5 mL Oxalsäure
- Zentrifugieren der Probe für 10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm
- 1 mL des Überstandes in der SpeedVac eintrocknen
- getrocknete Probe in 400 µL 70 %igem AcN aufnehmen
- vortexen
- Filtration der Probe durch 0,2 µm Filter
- Injektion von 20 µL in die HPLC

Methode II:

- 1,5 g der Probe in 30 mL Pyrex-Röhrchen einwiegen
- 15 mL UHQ-Wasser hinzufügen
- vortexen
- 15 min im Kreisschüttler bei ca. 330 rpm schütteln
- Zentrifugation bei 5000 rpm bei 20 °C für 5 min
- Überstand in 25 mL Messkolben pipettieren
- Zugabe von 10 mL UHQ-Wasser zum Überstand der Sojabohnen
- vortexen, schütteln, zentrifugieren
- Zweite Fraktion des Überstandes in den 25 mL Messkolben überführen und diesen mit UHQ-Wasser auffüllen
- Entnahme von 5 mL Extrakt
- 7 mL Acetonitril hinzufügen
- vortexen
- Röhrchen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min bei 20 °C
- Überstand in 1,5 mL Eppendorfgefäß überführen
- 1 mL dieses Überstands in der SpeedVac für ca. 1,5-2 Stunden eintrocknen

- Aufnahme der eingetrockneten Probe in 70 %igem AcN
- vortexen
- Filtration der Probe durch 0,2 µm Filter
- Injektion von 20 µL in die HPLC

Versuch II:

Bei jener zuletzt erläuterten Methode wurde auch versucht, die Ausbeute durch Erwärmen des UHQ-Wassers auf 50 °C zu verbessern.

Versuch III:

Ein weiterer Versuch bestand darin das erbeutete Extrakt nach der Methode I nach *Jangchud und Bunnagt* direkt zu injizieren (ohne Eiweißfällung)

- 1 mL Aliquot des Extrakts aus dem 25 mL Messkolben entnehmen und in der SpeedVac eintrocknen
- eingetrocknete Probe in 400 µL 70% igem AcN aufnehmen
- vortexen
- Filtration durch 0,2 µm Filter
- Injektion von 20 µL in die HPLC

Da jedoch eine deutliche Eiweißfällung, durch Zugabe von 100 %igem AcN, bei dem gewonnen Extrakt erkennbar war, sollte diese unbedingt vor dem Eintrocknen der Probe durchgeführt werden, da es sonst zu Ablagerungen in der Säule kommen kann.

Versuch IV:

Um die Wichtigkeit einer zweiten Extraktion zu verdeutlichen, wurde versucht einen möglichst gleiche Menge an Extraktionsmaterial bei nur einer einmaligen Extraktion zu erreichen.

Hierzu wurden jeweils 1,5 g Sojabohnen eingewogen und jeweils 20 mL, auf

60 °C erhitztes, 80 %iges Ethanol oder UHQ-Wasser bei Raumtemperatur hinzugefügt und nach dem zuvor beschriebenen Schema in Versuch I extrahiert.

Versuch V:

Um die Konzentration der, in dem Sojaextrakt, enthaltenen Zucker (Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose und Stachyose) zu erhöhen, wurde die eingetrocknete Probe sowohl nach der Aufarbeitungsmethode I und II in 200 µL 70 %igem AcN aufgenommen.

3.5.3 Versuche zur Löslichkeit der ZuckerstandardsChemikalien:

D(+)-Glucose, ≥ 99,5 %, MM 180,16 g / mol, SIGMA

D(-)-Fructose, ≥ 99,0 %, MM 180,16 g / mol, FLUKA

Sucrose, ≥ 99,5 %, MM 342,3 g / mol, SIGMA

D(+)-Raffinose pentahydrate, ≥ 99,0 %, MM 594,51 g / mol, FLUKA

Acetonitril, Rotipuran®, HPLC Gradient Grade 99,9 %, ROTH®

UHQ-Wasser

Endkonzentration: 5 mg / mL

Einwaagen:

- Glucose/Fructose/Saccharose: 25 mg / 5 mL
- Raffinose: 29,429 mg / 5 mL

Die Einwaage muss hier erhöht werden, da es sich bei dem Raffinose - Zuckerstandard, um ein Tetrahydrat-Präparat handelt.

Lösungen:

- Acetonitril :
 - o 60 % Acetonitril
 - o 70 % Acetonitril
 - o 75 % Acetonitril
 - o 80 % Acetonitril
- UHQ-Wasser: 100 %

Die Lösung der Zuckerstandards erfolgt nach dem folgenden Prinzip.

- Einwaage des Zuckerstandards in 5 mL Messkolben
- Hinzufügen des 50 % igen Acetonitrils
- Lösen des Zuckers im Ultraschallbad für 5 bis 10 Minuten
- Auffüllen des Messkolben mit 100 % igem Acetonitril, um die erwünschte Konzentration zu erreichen
- 0,5 mL des gelösten Zuckerstandards durch 0,2 µm Filter filtrieren
- Injektion von 20 µL in die HPLC

Tabelle 3.4: Versuche zur Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses der Lösungsmittel

<i>Endkonzentration [%]</i>	<i>50 %iges AcN [mL]</i>	<i>100 %iges AcN [mL]</i>
60	4,0	1,0
70	3,0	2,0
75	2,5	2,5
80	2,0	3,0

Die in der Tabelle 3.2 beschriebenen Konzentrationen wurden mit Hilfe des Mischungskreuzes berechnet.

Die Zuckerstandards werden zuerst in 50 %igem Acetonitril gelöst, da es so zu einer optimierten Lösung des Zuckers kommt.

Versuche mit TEA (Triethylamin):

- o Einwaage von 25 mg Raffinose bzw 29,429 mg Glucose, Fructose und Saccharose in 5 mL Messkolben
- o Auffüllen mit 70 %igem AcN
- o Hinzufügen von 0,8 % TEA (20µL)
- o Filtrieren von 0,5 mL durch 0,2 µm Filter
- o Injektion von 20 µL in die HPLC

3.6 Optimierung der chromatographischen Einstellungen zur Analyse von löslichen Kohlenhydraten in SojabohnenChromatographisches System:

Waters 600 System Controller Millipore 600EPA898

Waters TM 600 Pumpe

Waters TM bus SAT/IN Module

Waters TM 2489 UV/Visible Detektor

Waters TM Rheodyne 7725i Injektor

HPLC Vorsäule Bondapak TM, NH₂, 3,9 x 20 mm, 10 µm, WATERS, Lot. Nr. 0062382701

HPLC Säule LiChrospher® 100, NH₂, 250 x 4 mm, 5 µm, Lot.Nr. L 58105803

RID-6A Refractive Index Detector, SHIMADZU, No. 70647 LP

Filter Sartorius Stedim Minisart RC 4 0,20 µm,

Hamilton Spritze 25 µL, Microliter TM Syringes , P/N 80465/00

Chemikalien:

D(+)Glucose, ≥ 99,5 % , MM 180,16 g / mol, SIGMA

D(-)Fructose, ≥ 99,0 % , MM 180,16 g / mol, FLUKA

Sucrose, ≥ 99,5 % , MM 342,3 g / mol, SIGMA

D(+)Raffinose pentahydrate, ≥ 99,0 % , MM 594,51 g / mol, FLUKA

Acetonitril, Rotipuran®, HPLC Gradient Grade 99,9 %, ROTH®

UHQ-Wasser

Laufmittel:

- Laufmittel A: 70 % AcN

500 mL: In zwei separaten Messzylindern jeweils 350 mL UHQ-Wasser sowie 150 mL 100% iges Acetonitril abmessen und anschließend in einem Vorratsgefäß zusammenmengen.

- Laufmittel B : 100 % AcN
- Laufmittel D : 100 % UHQ-Wasser

Bei jeder Injektion betrug die Temperatur des Säulenofens 30 °C und das Injektionsvolumen 20 µL. Die Detektionszeit variierte zwischen 20 Minuten und 40 Minuten.

Zur Ermittlung der optimalen Laufmittelkonzentration wurde diese zwischen 70 % AcN und 80 % AcN verändert. Ebenso erfolgte eine Variation der Flussgeschwindigkeiten des Laufmittels zwischen 0,4 mL / min und 1,0 mL / min.

Weiters wurde ermittelt, ob mögliche Auswirkunkungen auf das Detektionsverhalten feststellbar sind, wenn das Laufmittel aus UHQ-Wasser und 100 % igem Acetonitril direkt in der Mischkammer auf die gewünschte Konzentration gemischt wird oder bessere Ergebnisse erzielt werden, sobald das Laufmittel bereits mit der erforderlichen Konzentration direkt aus dem Laufmittelvorratsgefäß gepumpt wird.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kalibration des nativen β -Lactoglobulingehalts in Milchproben

Zur Bestimmung des α -Lactalbumin und β -Lactoglobulingehalts musste vorab eine Kalibration durchgeführt werden. Hierzu wurden 6 Einzelstandards in aufsteigender Konzentration, siehe Tabelle 3.1, hergestellt und diese jeweils dreimal hintereinander injiziert. Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte sowohl für α -Lactalbumin als auch für das native β -Lactoglobulin eine Kalibrationsgerade erstellt werden, welche zur quantitativen Bestimmung von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin diene.

Tabelle 4.1: Konzentrationen und Flächen der Kalibrierung

α – La [mg/L Milch]	Fläche	β – Lg [mg/L Milch]	Fläche
100	486 150	200	724 215
100	476 931	200	721 556
100	481 340	200	723 153
200	946 451	400	1 575 923
200	942 106	400	1 547 312
200	943 671	400	1 552 311
400	1 863 801	800	3 085 755
400	1 864 965	800	3 088 084
400	1 866 474	800	3 088 502
800	3 469 451	1600	5 967 578
800	3 526 109	1600	5 981 917
800	3 320 781	1600	5 521 030
1200	5 249 163	2400	8 977 335
1200	5 351 080	2400	9 312 336
1200	5 273 644	2400	9 019 953
1600	6 827 591	3200	11 589 114
1600	6 987 076	3200	11 806 432
1600	6 915 112	3200	11 751 531

In den Abbildungen 4.1 und 4.2 sind die Kalibrationsgeraden von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin dargestellt, welche aus den ermittelten Werten (siehe Tabelle 4.1) berechnet wurden.

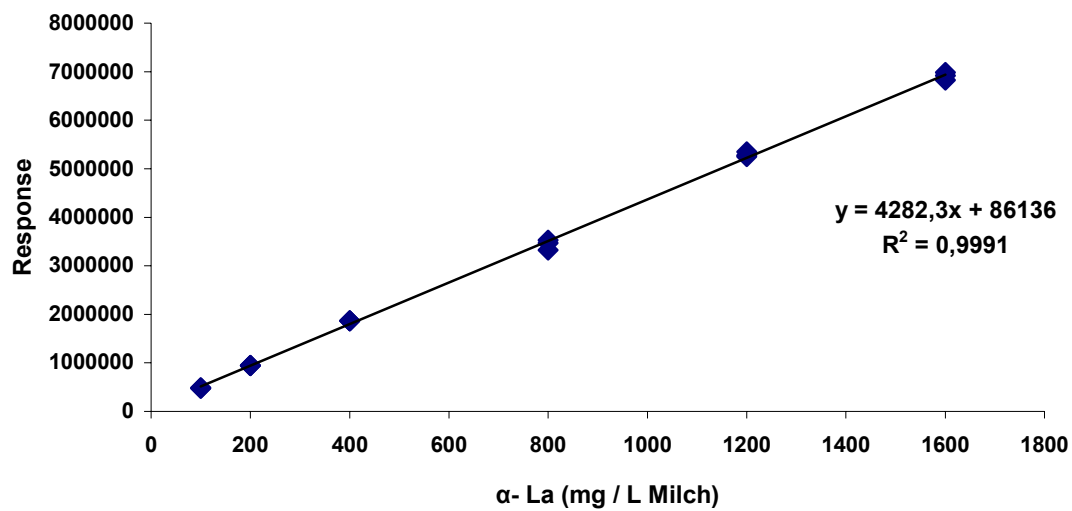


Abbildung 4.1: Kalibrationsgerade α-Lactalbumin

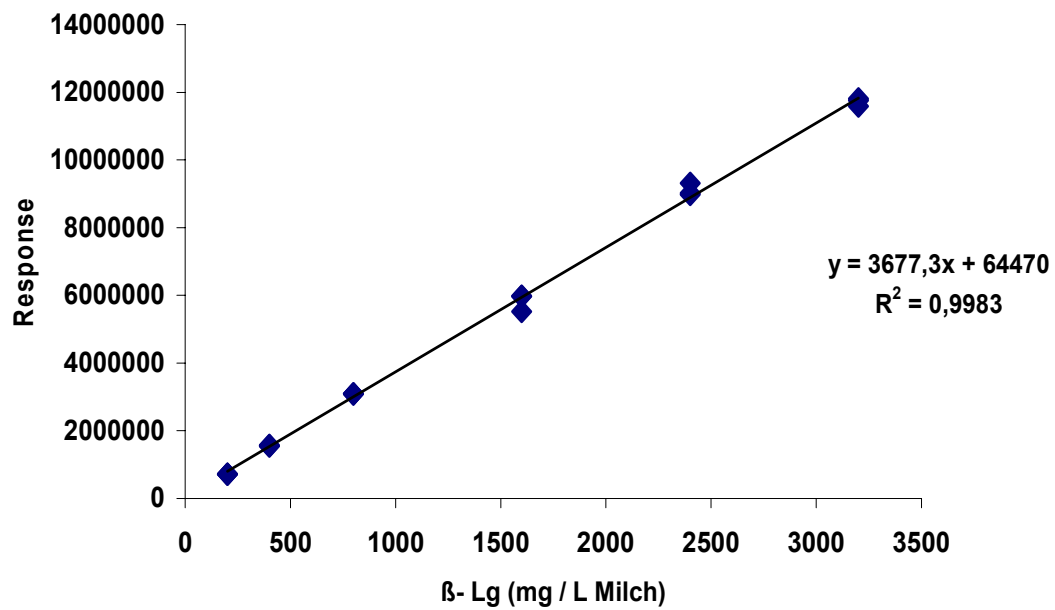


Abbildung 4.2: Kalibrationsgerade β-Lactoglobulin

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Kalibrationsstandardlösungen in aufsteigender Konzentration dargestellt.

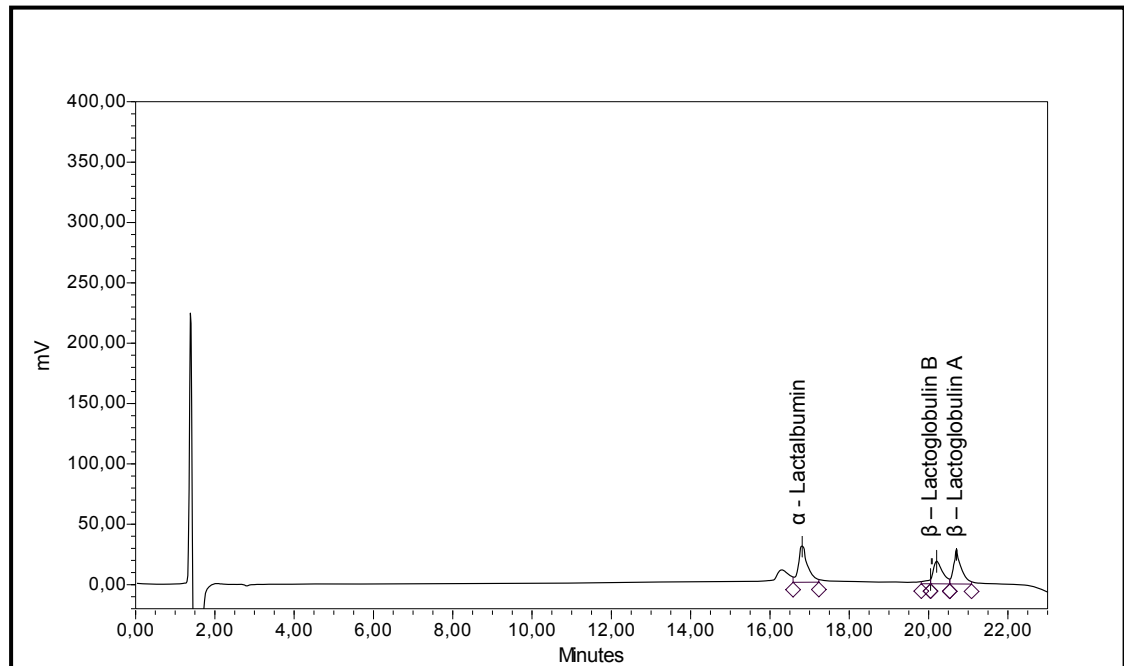


Abbildung 4.3: Standardlösung I (β -Lg 0,2 μ g / 10 μ L, α -La 0,1 μ g / 10 μ L)

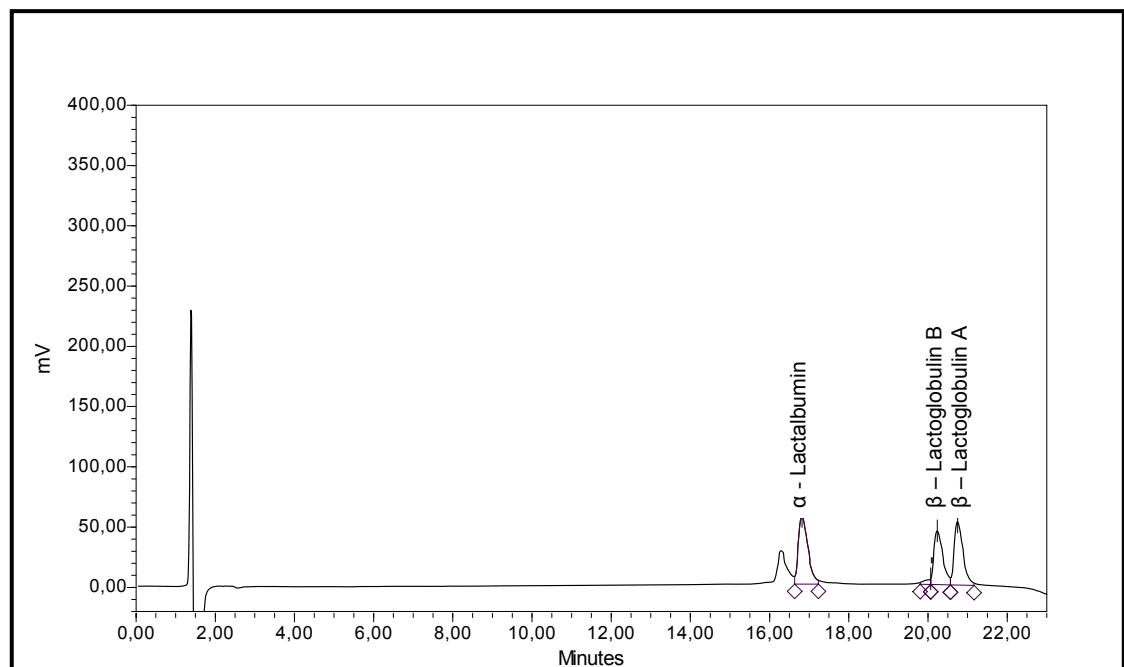


Abbildung 4.4 Standardlösung II (β -Lg 0,4 μ g / 10 μ L, α -La 0,2 μ g / 10 μ L)

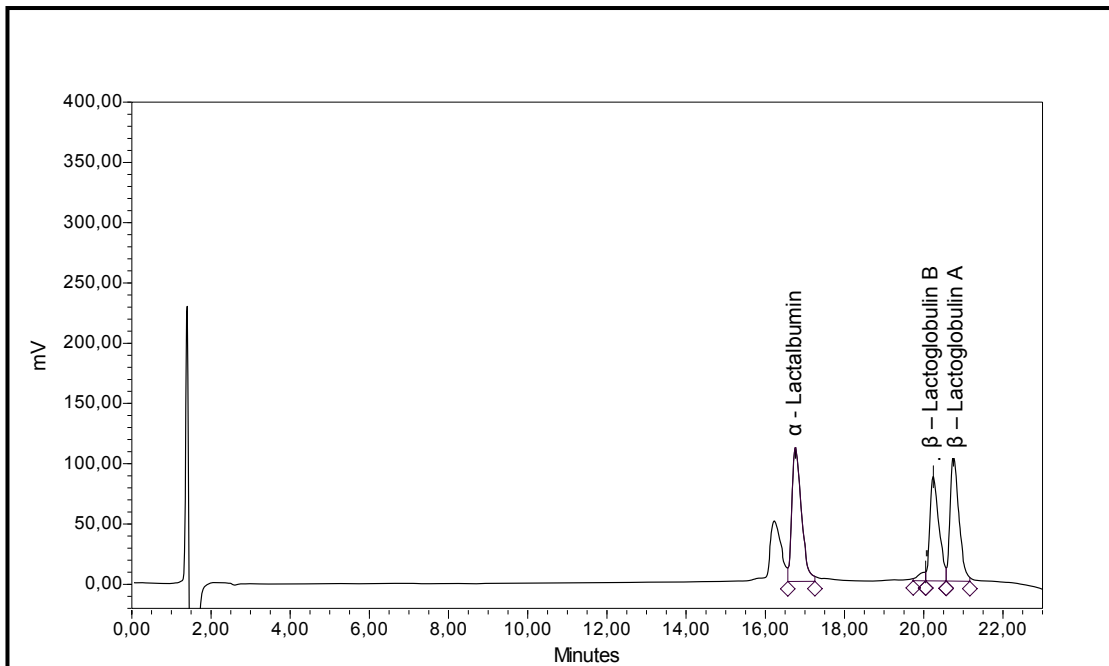


Abbildung 4.5: Standardlösung III (β -Lg 0,8 μ g / 10 μ L, α -La 0,4 μ g / 10 μ L)

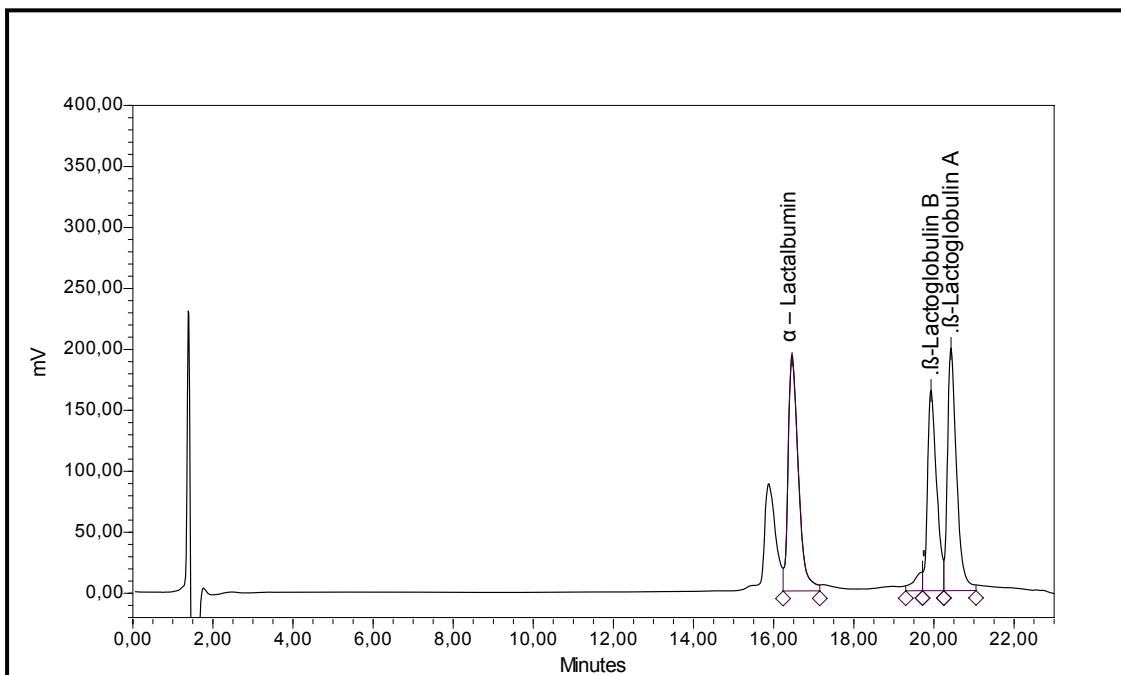


Abbildung 4.6: Standardlösung IV (β -Lg 1,6 μ g / 10 μ L, α -La 0,8 μ g / 10 μ L)

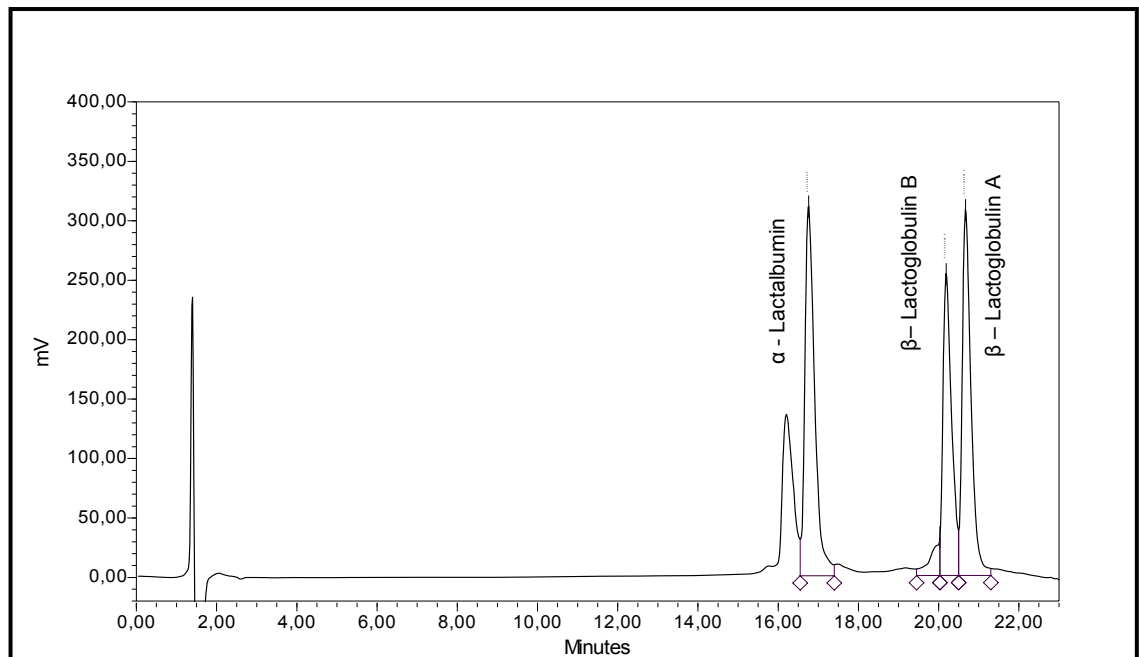


Abbildung 4.7: Standardlösung V (β -Lg 2,4 μ g / 10 μ L, α -La 1,2 μ g / 10 μ L)

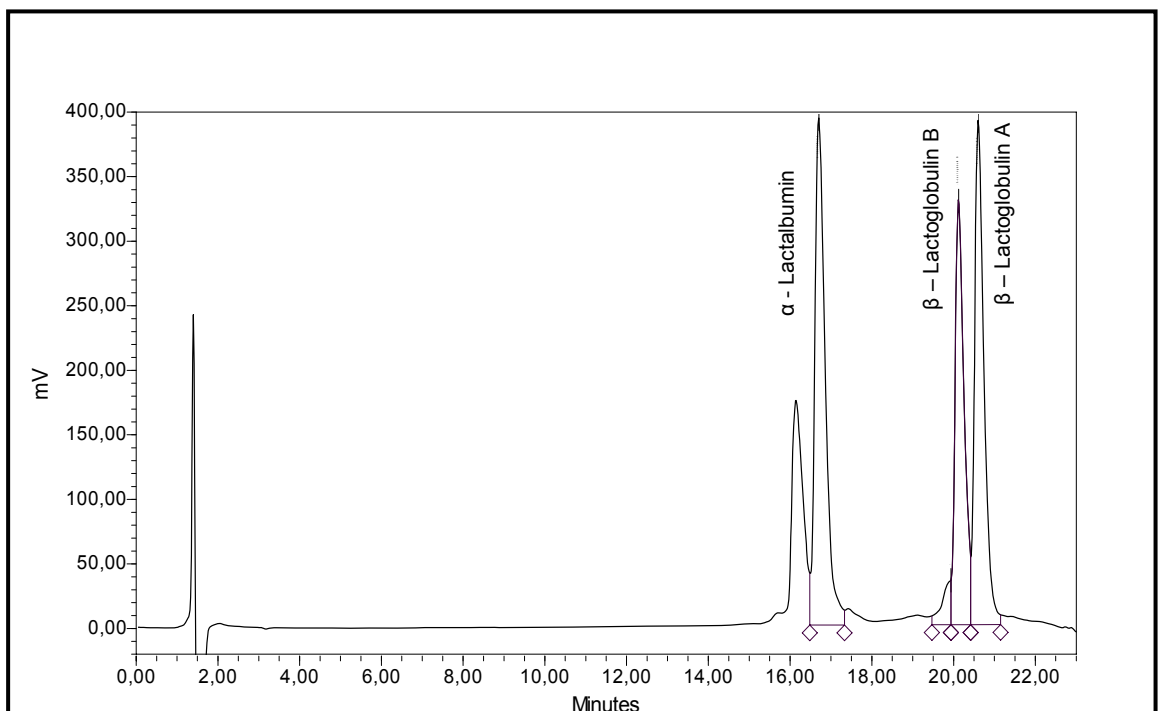


Abbildung 4.8: Standardlösung VI (β -Lg 3,2 μ g / 10 μ L, α -La 1,6 μ g / 10 μ L)

4.2 Ermittlung des nativen β -Lactoglobulingehalts als Erhitzungsindikator in Milch mittels RP-HPLC

Tabelle 4.2: Darstellung der Gesamtergebnisse der untersuchten Milchproben

Nr	Milchart	Probe	β-Lg [mg/L]	Furosin
129	Past	Ja! Natürlich frische VM	3429,0	9,7
130	past	Ja! Natürlich frische VM	3045,0	9,9
131	past	Ja! Natürlich frische VM	3416,5	9,5
132	ESL	Ja! Natürlich VM	226,4	48,3
133	ESL	Ja! Natürlich VM	185,9	39,1
134	ESL	Ja! Natürlich VM	278,4	45,5
135	ESL	Ja! Natürlich LM	217,0	46,9
136	ESL	Ja! Natürlich LM	192,4	52,4
137	ESL	Ja! Natürlich LM	229,7	50,3
138	Past	Ja! Natürlich frische VM	2958,0	7,8
139	Past	Ja! Natürlich frische VM	2865,0	9,0
140	ESL	Ja! Natürlich VM	306,5	51,2
141	ESL	Ja! Natürlich VM	259,1	68,7
142	ESL	Ja! Natürlich LM	243,5	64,3
143	ESL	Ja! Natürlich LM	275,5	49,3
144	Past	Clever VM	3556,5	9,7
145	RM	Rohmilch Danzinger	4299,0	8,1
146	ESL	Clever VM länger frisch	2793,0	11,0
147	ESL	Natur Pur Bio VM länger frisch	277,3	33,8
148	ESL	Natur aktiv Bio VM länger frisch	3156,5	12,7
149	ESL	BioBio VM länger frisch	2534,0	10,6
150	ESL	Bioness länger frische Bio VM	2502,5	11,5
151	ESL	Clever VM länger frisch	2595,5	8,4
152	ESL	Natur Pur Bio VM länger frisch	289,3	29,0
153	ESL	Natur aktiv Bio VM länger frisch	2720,5	10,4
154	ESL	BioBio VM länger frisch	2533,0	10,5
155	ESL	Bioness länger frische Bio VM	2459,5	11,5

Unter den 27 analysierten Milchproben befanden sich sechs pasteurisierte Milchproben, 20 ESL-Milchproben, von welchen 15 ESL-Vollmilch sowie fünf ESL-Leichtmilch waren, weiters eine unbehandelte Rohmilch.

Zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Qualitätsstufen wurden die Werte in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Je höher der Wert des noch vorhandenen β -Lactoglobulins ist, umso ernährungsphysiologisch wertvoller ist diese Milch.

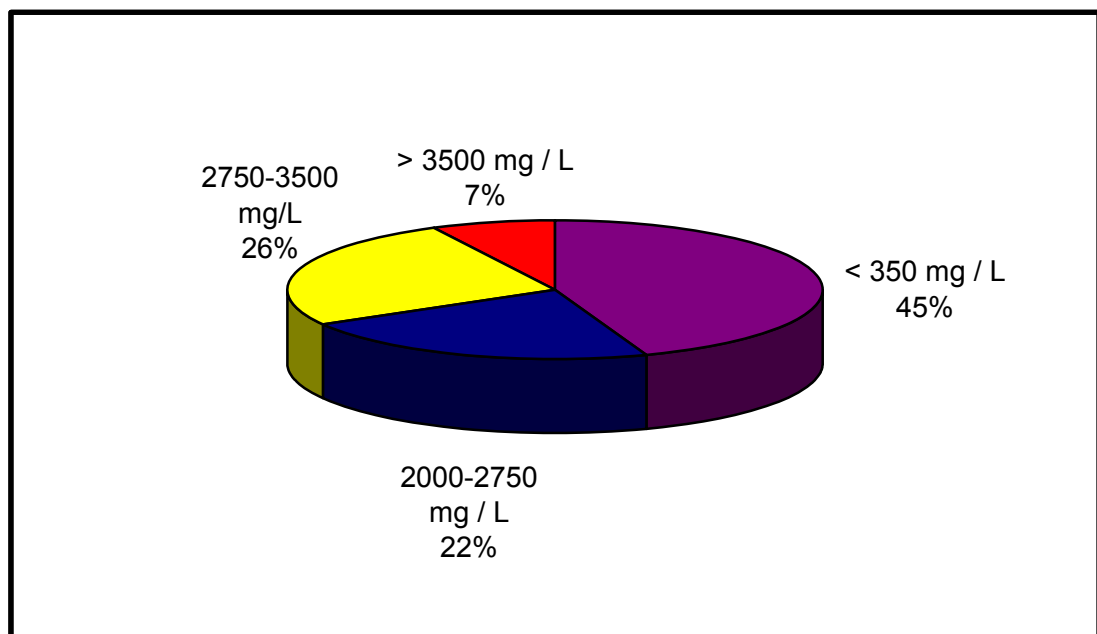


Abbildung 4.9: Verteilung der β -Lactoglobulin Werte aller Milchproben

Wie aus der Abbildung 4.9 ersichtlich ist, enthielt fast die Hälfte der untersuchten Milchproben maximal 350 mg β -Lactoglobulin / L. Diese Werte liegen deutlich unter dem Grenzwert von 1800 mg / Liter Milch, welcher selbst bei den hitzeintensivsten ESL-Milch Herstellungsmethoden, der indirekten Erhitzung und dem modifizierten Pasteur, nicht unterschritten werden sollte [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

Zweiundzwanzig % der untersuchten Milchproben enthielten nach ihrer Hitzebehandlung immer noch zwischen 2000 und 2750 mg β -Lactoglobulin / L. In weiteren 26 % konnten Werte von 2750 bis 3500 mg β -Lg / L ermittelt

werden. Bei einer ESL-Vollmilchprobe, sowie bei der untersuchten Rohmilch, konnten immerhin über 3500 mg β -Lg / L nachgewiesen werden.

Die durchschnittlichen β -Lactoglobulinwerte pasteurisierter Milch betrugen 3211,7 mg / L Milch, die ESL-Vollmilch enthielt im Durchschnitt 1541,2 mg / L und die ESL-Leichtmilch 231,6 mg β -Lg / L Milch. In der Rohmilch konnte ein Wert von 4299 mg β -Lg / L Milch ermittelt werden.

Bei den analysierten Milchproben war, hier vor allem bei den ESL-Milchproben, ein deutlicher Qualitätsunterschied zwischen den einzelnen Milchsorten zu erkennen, wie in der Abbildung 4.10 verdeutlicht wird.

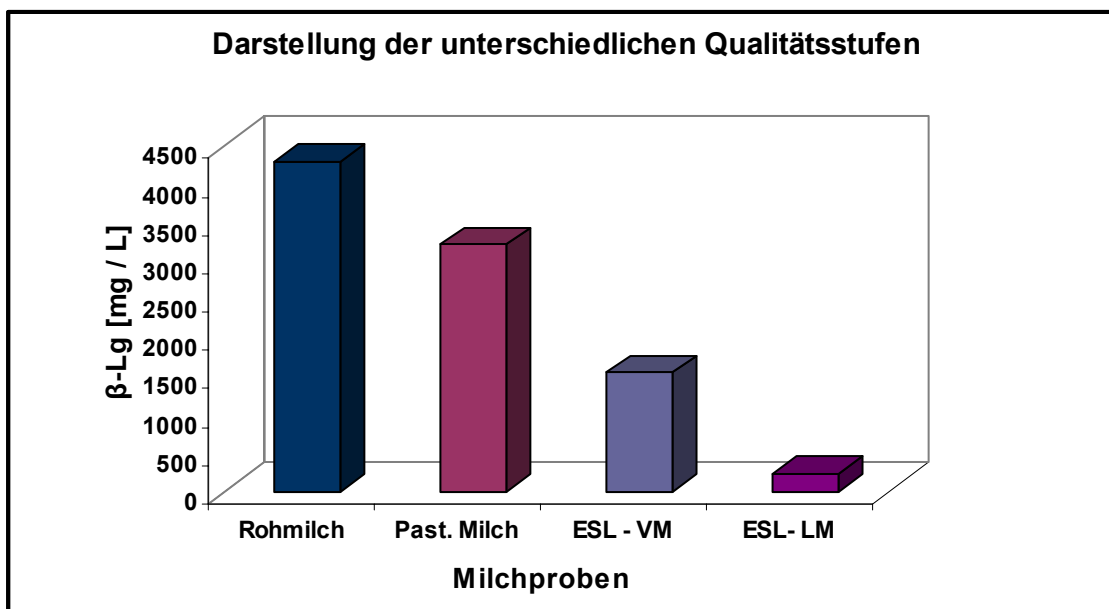


Abbildung 4.10: Durchschnittlicher Gehalt der Milchproben an β -Lactoglobulin

4.2.1 Natives β -Lactoglobulin bei pasteurisierter Milch

Der Mindestanteil an nativem β -Lactoglobulin sollte bei pasteurisierter Milch zwischen 3100 mg und 3400 mg / L Milch liegen, da die Hitzebelastung deutlich unter jener der ESL-Verfahren liegt [GALLMANN et al, 2001; KAUFMANN et al, 2009].

Für die Auswertung der Proben wurden die Daten aus der Tabelle 4.2 herangezogen. Bei den untersuchten Milchproben konnte ein durchschnittlicher Wert von 3211,7 mg β -Lactoglobulin / L ermittelt werden, somit liegen die analysierten Milchproben in jenem angegebenen Bereich.

Wie jedoch aus der Abbildung 4.11 ersichtlich ist, erreichten nicht alle pasteurisierten Milchproben diesen Mindestwert von 3100 mg β -Lg / L. Andererseits hingegen lagen einige Milchproben deutlich über 3400 mg und eine Milchprobe sogar über 3500 mg β -Lg / L Milch.

Somit waren die analysierten Milchproben von guter bis sehr guter Qualität.

Die in Abbildung 4.11 dargestellten Milchproben waren alle pasteurisierte Vollmilchproben mit 3,5 % Fett. Alle Milchproben, ausgenommen die Nummer 144 von Clever, stammen von der Handelsmarke Ja! Natürlich.

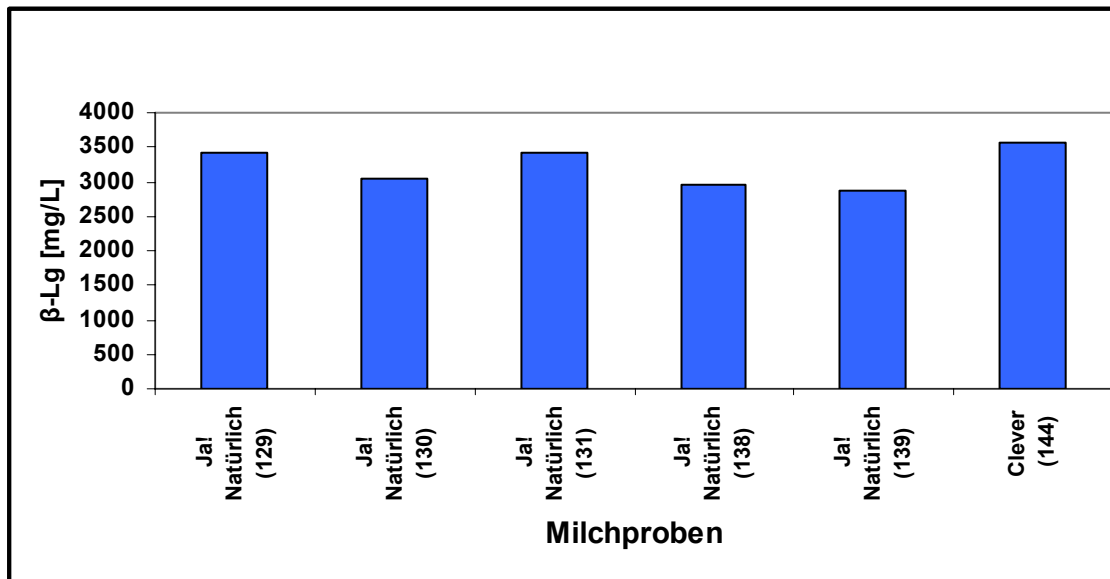


Abbildung 4.11: Darstellung der einzelnen untersuchten pasteurisierten Milchproben

In der folgenden Abbildung ist das Chromatogramm einer pasteurisierten Milchprobe abgebildet.

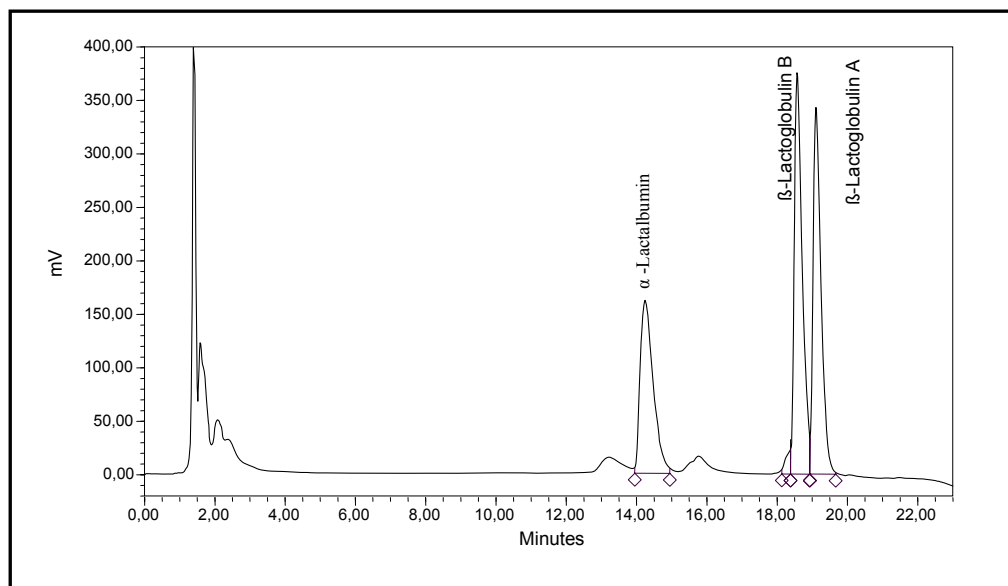


Abbildung 4.12: Chromatogramm einer pasteurisierten Vollmilch mit einem β -Lg Gehalt von 3429 mg/ L Milch

4.2.2 Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in ESL-Milch

Milch, welche durch ein indirektes ESL-Verfahren erhitzt wird, sollte einen Mindestgehalt von 1800 mg β -Lactoglobulin / L Milch enthalten [GALLMANN et al, 2001]. Bei Anwendung eines direkten Erhitzungsverfahrens beträgt der Mindestgehalt an β -Lactoglobulin 2200 mg β -Lg / L, während bei mikrofiltrierter Milch, welche anschließend pasteurisiert wird, ein durchschnittlicher β -Lg Wert zwischen 3000 und 3300 mg erreicht werden sollte. Diese Werte können bereits mit jenen der pasteurisierten Milch verglichen werden [KAUFMANN et al, 2009].

Bei der ESL-Milch wurden Proben unterschiedlichen Fettgehalts analysiert. Es handelte sich hierbei sowohl um Milchproben mit 3,5 % Fett, als auch um Milchproben mit 1 % Fett, so genannte Magermilch oder „Leichtmilch“. Hierbei waren äußerst deutliche Qualitätsunterschiede innerhalb der ESL-Milchproben feststellbar. Jedoch können diese nicht direkt verglichen werden, da die Vollfettproben von unterschiedlichen Herstellern stammen, hingegen bei den Leichtmilchproben nur eine Marke vertreten war.

Um jedoch die deutlichen Qualitätsdifferenzen innerhalb aller ESL-Milchproben zu verdeutlichen, wurden alle Ergebnisse der ESL-Milchproben aus der Tabelle 4.2 statistisch ausgewertet und in der Abbildung 4.13 dargestellt.

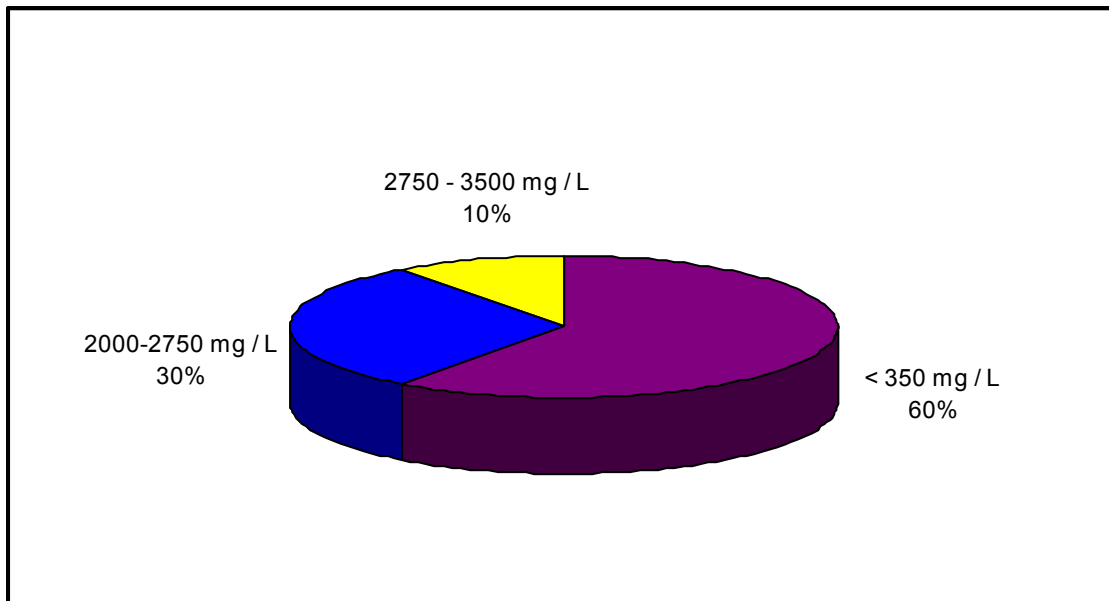


Abbildung 4.13: Einteilung der ESL-Milch in die unterschiedlichen Qualitätsstufen

Wie aus der Abbildung deutlich erkennbar ist, entfallen zwei Drittel der Proben in die niedrigste Qualitätsstufe mit 350 mg β -Lg / L Milch und weniger. Dieses Resultat relativiert sich jedoch dadurch, dass der Großteil dieses Ergebnisses durch die Leichtmilch einer Marke verursacht wird.

Ein weiteres knappes Drittel enthielt zwischen 2000 und 2750 mg β -Lg / L, welches im gelben Bereich der Graphik dargestellt ist, in den letzten 10 % der Milchproben konnten Werte von 2750 bis 3500 mg β -Lg / L ermittelt werden.

Somit weisen diese 40 % der ESL-Milchproben eine zufrieden stellende Qualität auf, da sie deutlich über dem in der Literatur beschriebenen Mindestwert von 1800 mg / L Milch liegen.

Wie entscheidend die Rohmilchqualität, die anschließende Erhitzung sowie die ausreichende Kühlung und sachgemäße Lagerung ist, verdeutlicht die Graphik 4.14. Diese gibt Auskunft wie unterschiedlich Produkte sein können, von denen der Konsument annimmt, sie enthielten dasselbe Lebensmittel von gleicher, zufrieden stellender Qualität.

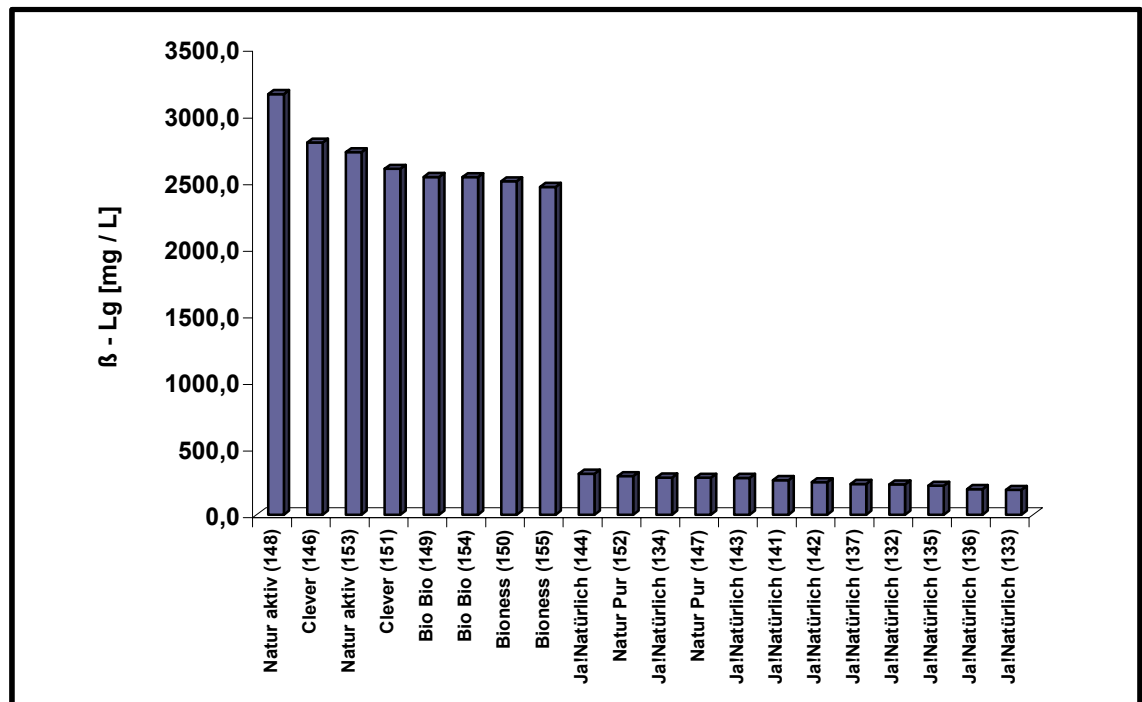


Abbildung 4.14: β -Lactoglobulingehalt der ESL-Milchproben

In dem anschließend angeführten Vergleich, handelt es sich um zwei Bio-Milchprodukte unterschiedlicher Hersteller, welche beide mit der Aufschrift „länger frisch genießen“ gekennzeichnet waren.

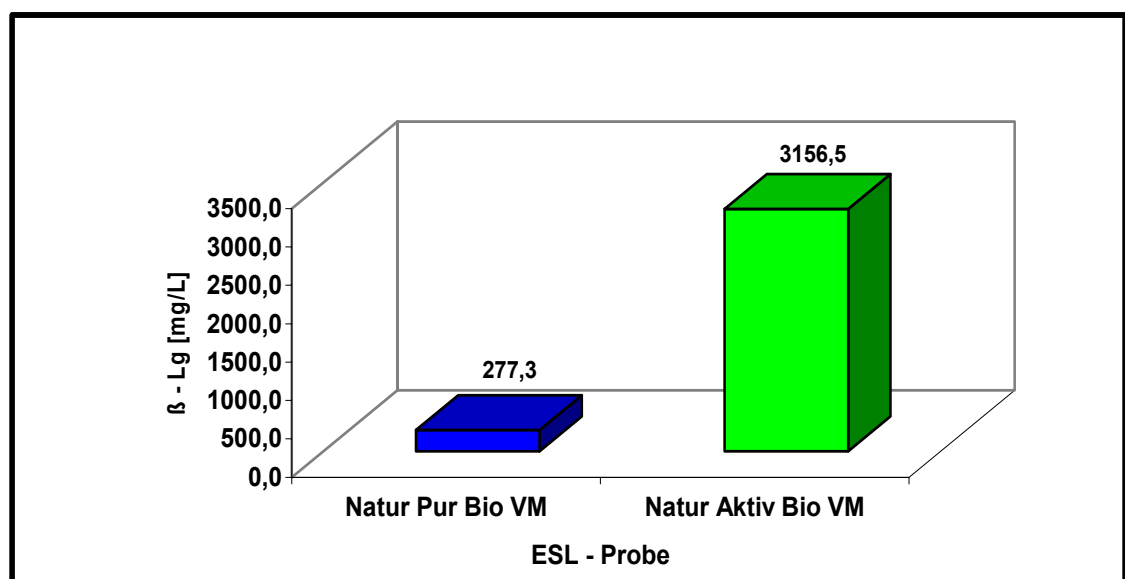


Abbildung 4.15: Gegenüberstellung von zwei ESL-Milchproben

Dieser deutliche Qualitätsunterschied ist auch in den erstellten Chromatogrammen 4.16 und 4.17 ersichtlich.

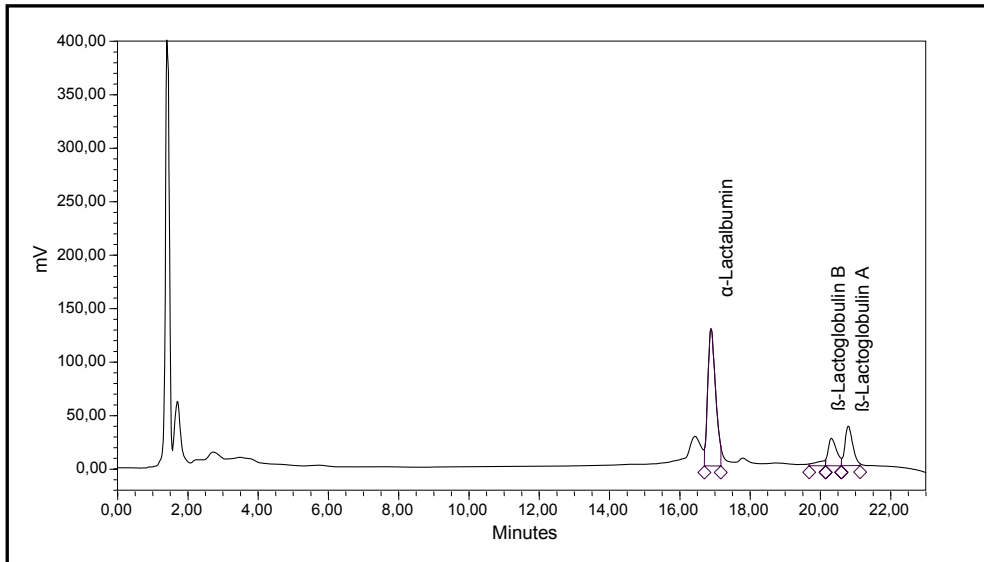


Abbildung 4.16: Chromatogramm einer ESL-Milch mit einem Gehalt von 289,25 mg / L Milch

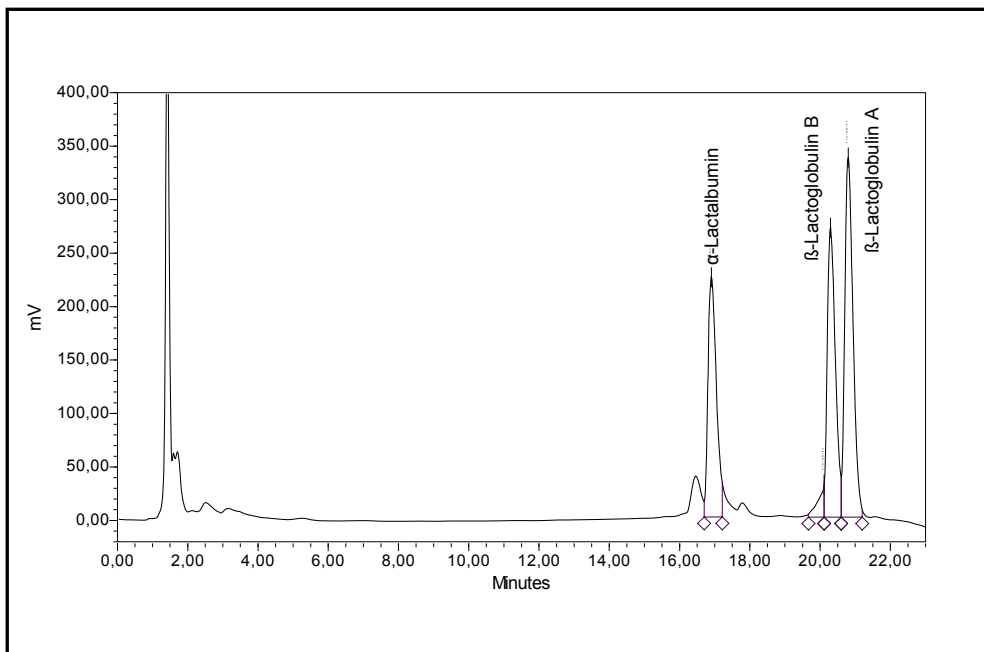


Abbildung 4.17: Chromatogramm einer ESL-Milch mit einem Gehalt von 2720,5mg / L Milch

4.2.3 Gehalt an nativem β -Lactoglobulin in Rohmilch

Im Zuge dieser Arbeit wurde nur eine Rohmilch analysiert, welche aus einem niederösterreichischem Betrieb stammte und das Eutersekret mehrerer Kühe vereinigte.

Bei dieser Rohmilch konnte ein Gehalt an β -Lactoglobulin von 4299 mg je Liter Milch ermittelt.

In der nachfolgenden Gegenüberstellung der Rohmilch zu der pasteurisierten Milch von höchster Qualität, ist der Unterschied zwischen der behandelten und der unbehandelten Milch ersichtlich.

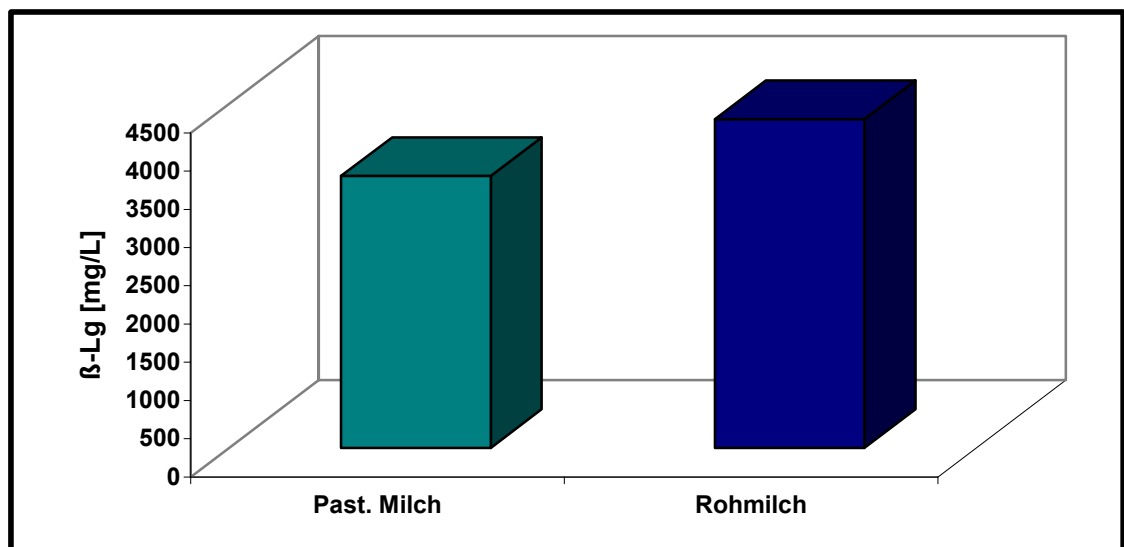


Abbildung 4.18: Vergleich von Rohmilch zu pasteurisierter Milch

4.3 Bestimmung des Furosinsgehalts in Milch

Bei den 27 untersuchten Milchproben wurden folgende, in Tabelle 4.4 dargestellten, Durchschnittswerte ermittelt. Diese wurden den Literaturdaten gegenübergestellt [GALLMANN et al, 2001; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998; TÖPEL, 2004; CLAWIN-RÄDECKER et al, 1996; DYCK, 2001]

Zur Auswertung wurden hier die Werte aus der Tabelle 4.2 herangezogen.

Tabelle 4.3: Vergleich der durchschnittlich ermittelten Furosinwerte [mg / L] mit jenen der Literatur

	Milchproben	Literaturdaten
Rohmilch	8,1	3-7
Pasteurisierte Milch	9,3	6-8
ESL - Milch	33,3	12

Der durchschnittliche Furosinwert der ESL-Milch von 33,3 mg / 100 g Protein setzt sich aus jenem der ESL-Leichtmilch und der ESL-Vollmilchproben zusammen, wobei der Mittelwert der Leichtmilchproben bei 52,6 mg Furosin / 100 g Protein und bei den ESL-Vollmilchproben nur bei 26,8 mg Furosin / 100 g Protein lag. Der überdurchschnittlich hohe Wert der LM-Proben ist darauf zurückzuführen, dass all jene Milchproben von einer einzigen Marke, mit geringerer Qualität stammen.

Der Furosingehalt der Rohmilch lag etwas über dem angegebenen Gehalt. Weiters ist der Mittelwert der pasteurisierten Proben etwas erhöht, wenn man davon ausgeht, dass alle Proben einen *Peroxidase*-positiven Reaktionsnachweis lieferten.

Zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Qualität der erhaltenen Milchproben wurde diese in vier Stufen eingeteilt. Je niedriger hierbei der Gehalt an Furosin in mg / 100 g Protein ist, desto hochwertiger ist die Qualität dieser Milchprobe anzusehen.

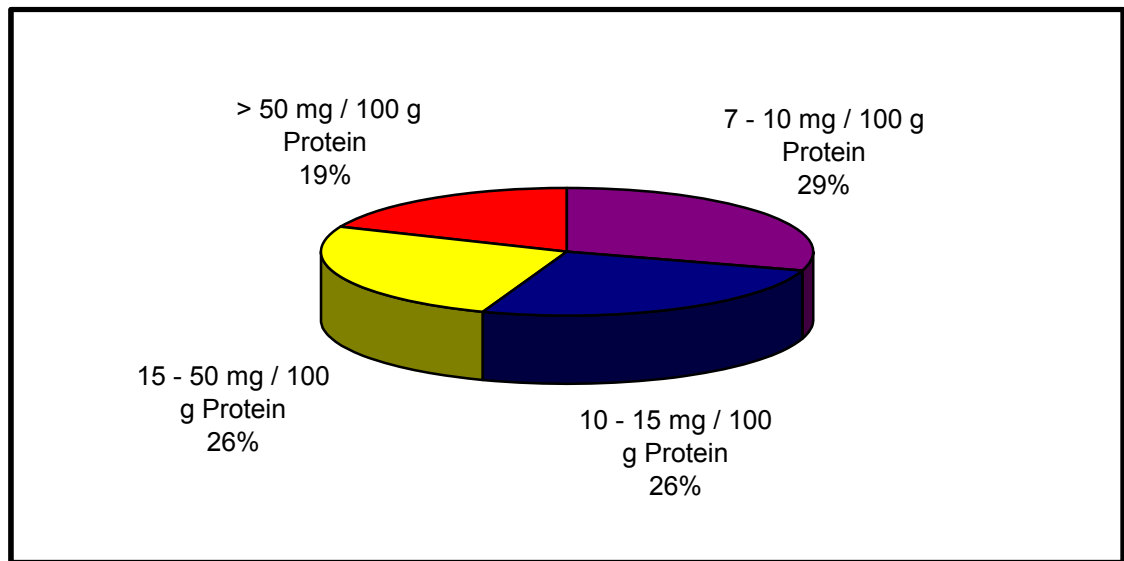


Abbildung 4.19: Einteilung der Furosine-Werte in unterschiedliche Qualitätsstufen

Die Einteilung der Furosine-Werte erfolgte anhand der in Tabelle 4.2 ermittelten Ergebnisse, um den Unterschied zwischen den einzelnen Milchproben deutlicher darstellen zu können.

Wie aus der Abbildung 4.19 ersichtlich ist, lag etwa ein Drittel der analysierten Proben in der ersten Qualitätsstufe von 7-10 mg Furosine / 100 g Protein. Diese Milchproben erfuhren die geringste thermische Belastung und sollten somit aus ernährungsphysiologischer Sicht, die höchste Qualität aufweisen. In diesen Bereich entfallen vor allem die pasteurisierten Milchproben und die Rohmilch.

Jeweils 26 % der Milchproben lagen zwischen 10 und 15 mg Furosine / 100 g Protein sowie bei 15 bis 50 mg Furosine / 100 g Protein, welche in dem blauen beziehungsweise gelben Bereich der Abbildung dargestellt sind. Diesen Bereichen ist die ESL-Milch zuzuordnen.

In die letzte Qualitätsstufe mit mindestens 50 mg Furosine / 100 g Protein entfiel immer noch ein knappes Fünftel aller Proben. Der Großteil dieses Ergebnisses ist wiederum auf die schlechte Qualität der ESL-Leichtmilchproben zurückzuführen.

4.4.1 Furosingehalt bei pasteurisierter Milch

Bei den sechs pasteurisierten Milchproben lagen alle Werte zwischen 7,8 und 9,9 mg / 100 g Protein. Wobei nur eine einzige Milch mit 7,8 mg / 100 g Protein im Bereich der Literaturangaben lag. Alle anderen fünf Proben wiesen einen Furosingehalt von 9,0 mg / 100 g Protein bis 9,9 mg / 100 g Protein auf. Die genaue Darstellung erfolgt in der Abbildung 4.20.

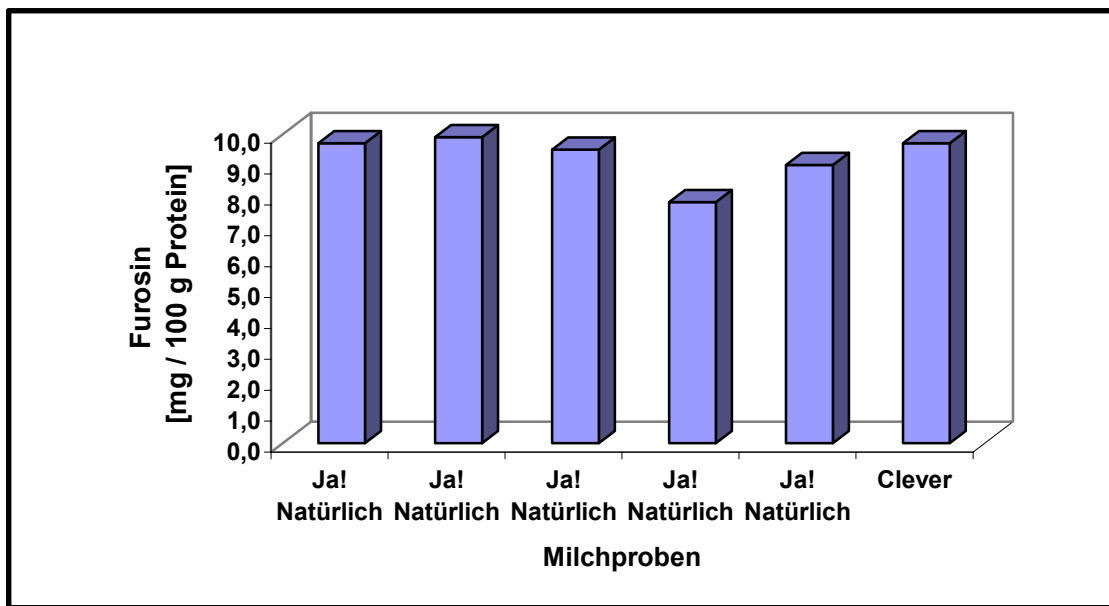


Abbildung 4.20: Furosingehalt in den pasteurisierten Milchproben

Die nachfolgende Abbildung zeigt das Chromatogramm einer pasteurisierten Vollmilch mit einem Furosingehalt von 9,5 mg / 100 g Protein.

Furosin hat eine Retentionszeit von etwa 7,2 Minuten. Bei dieser Probe wurde es nach 7,314 retentiert.

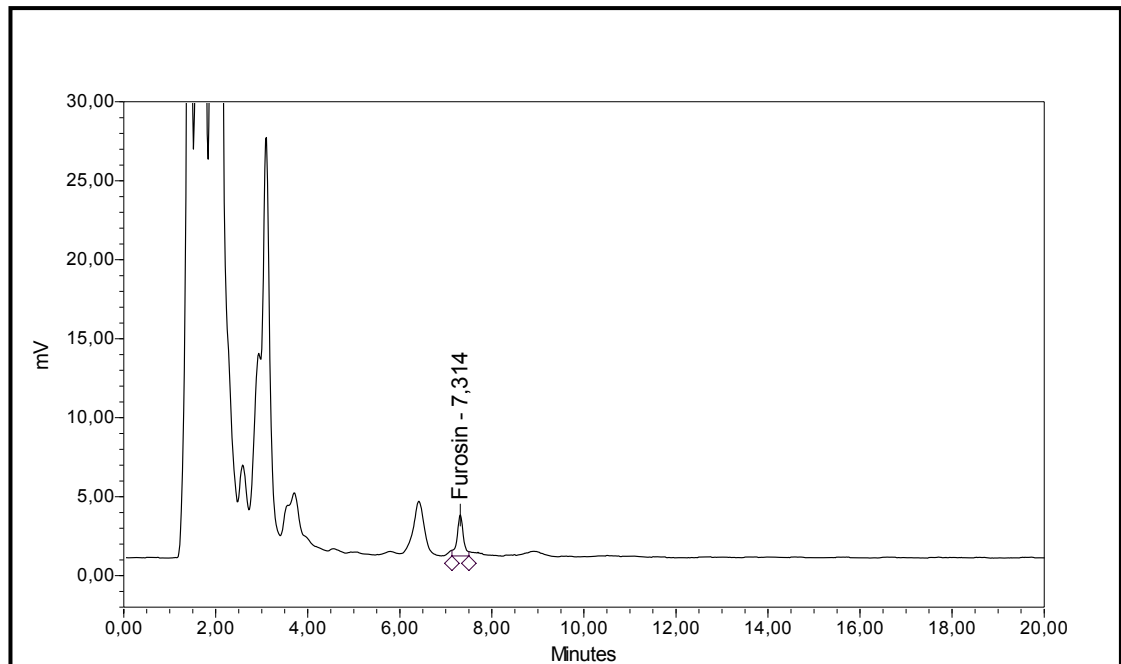


Abbildung 4.21: Chromatogramm einer pasteurisierten VM von „Ja! Natürlich“

4.4.2 Furosingehalt bei ESL-Milch

Von den 20 analysierten Milchproben, lagen nur sieben ESL-Milchproben unter dem Richtwert von 12 mg Furosin / 100 g Protein. Alle übrigen Werte überstiegen deutlich diesen Wert, denn je höher die Hitzebelastung und deren Einwirkungsdauer sind, desto mehr Furosin wird in der Milch gebildet.

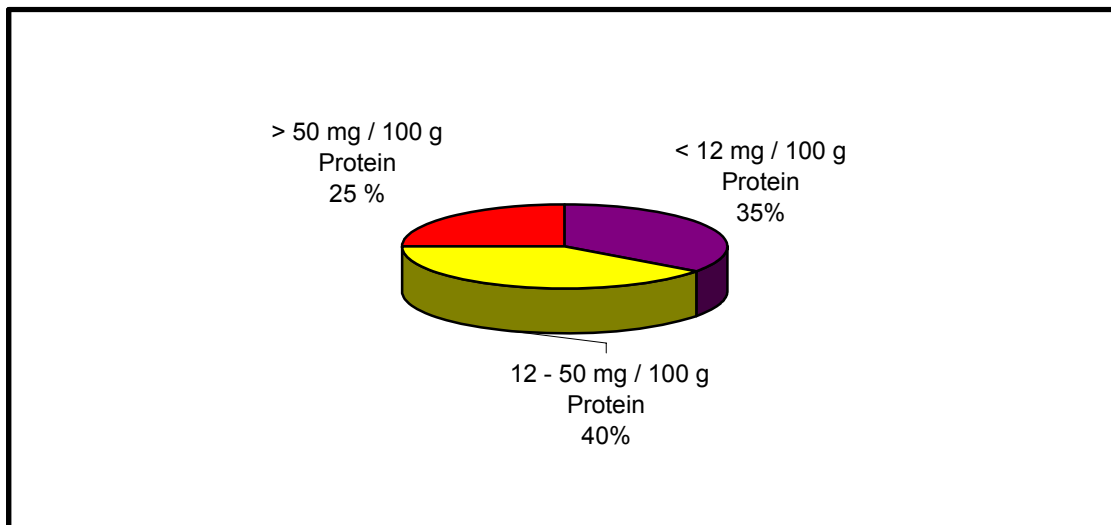


Abbildung 4.22: Verteilung der Furosinwerte bei ESL-Milch

Wie die Abbildung 4.22 verdeutlicht, wiesen 35 % der ESL-Milchproben einen geringeren Wert als 12 mg Furosin / 100 g Protein auf, welcher als Richtwert für sehr gute Milchqualität gilt.

Weitere 40 % hatten einen Furosingehalt zwischen 12 mg Furosin / 100 g Protein und 50 mg Furosin / 100 g Protein. Diese Proben enthielten eine höhere Menge dieses Erhitzungsindikators und waren somit einer höheren thermischen Belastung ausgesetzt. Das letzte Viertel aller ESL-Milchproben wies einen Gehalt über 50 mg Furosin / 100 g Protein auf.

Der Furosingehalt ist stark abhängig von dem ESL-Verfahren, welches zur Verlängerung der Haltbarkeit angewendet wurde.

Die Deutlichkeit dieses Unterschieds ist in der Abbildung 4.23 abgebildet.

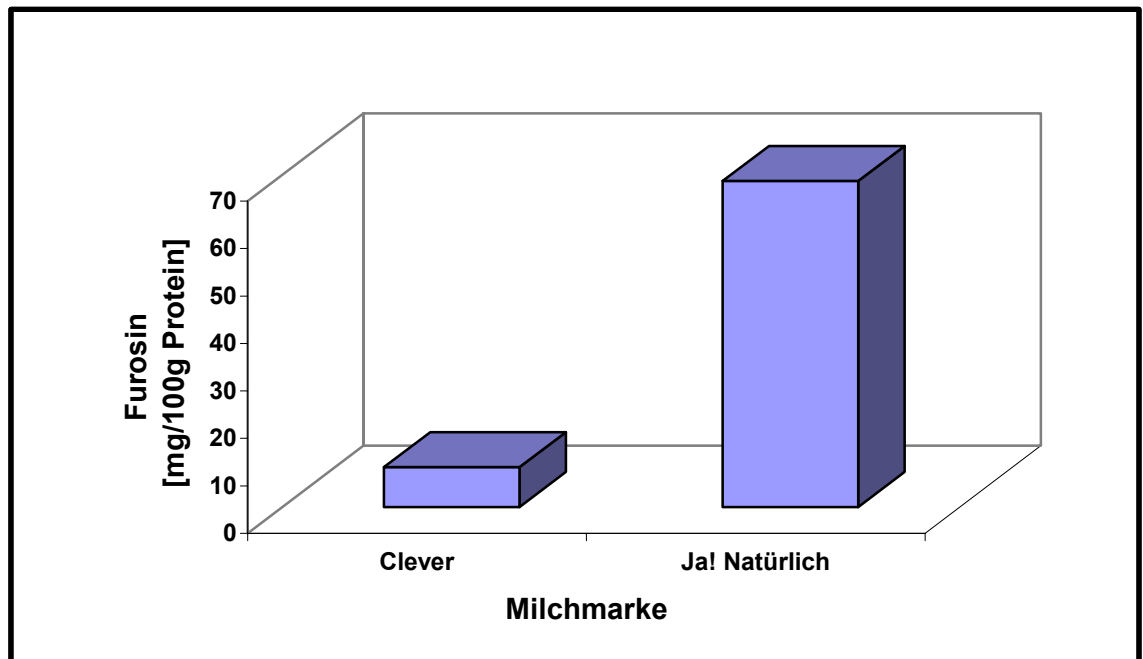


Abbildung 4.23: Vergleich des Furosingehalts von ESL - Milchproben

In der ersten Probe „Clever“ wurde ein Furosingehalt von 8,4 mg Furosine / 100 g Protein nachgewiesen. Bei der zweiten Probe wurden 68,7 mg Furosine / 100 g Protein ermittelt, das ist über das Achtfache gegenüber der ersten Probe.

Diese Differenz ist auch in den aufgezeichneten Chromatogrammen zu erkennen.

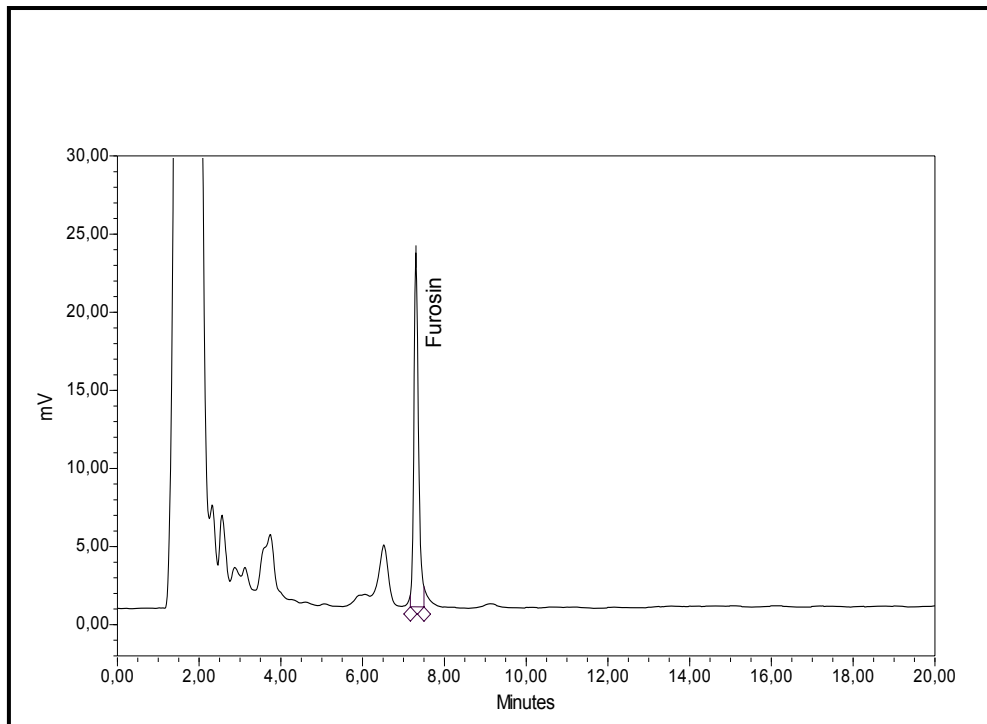


Abbildung 4.24: Chromatogramm einer ESL-VM mit 68, 7 mg Furosin / 100 g Protein

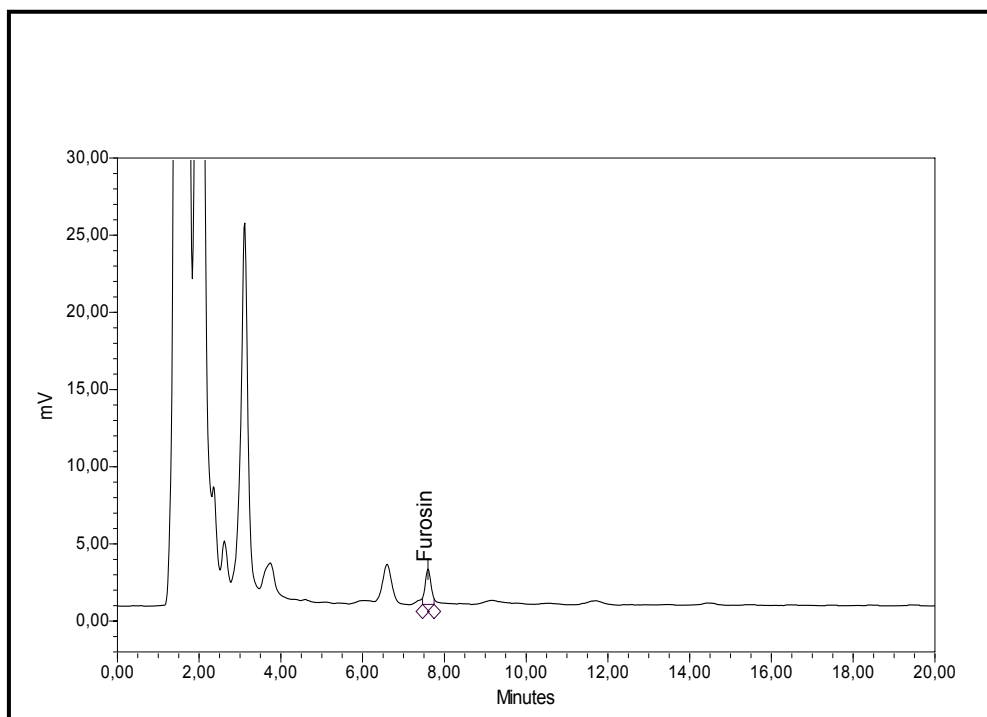


Abbildung 4.25: Chromatogramm einer ESL-VM mit einem Furosingehalt von 8, 4 mg / 100 g Protein

4.4.3 Furosingehalt bei Rohmilch

Rohmilch weist im Durchschnitt einen Furosingehalt von 3-5 mg / 100 g Protein auf [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998]. In dieser analysierten Rohmilch wurde ein Wert von 8,1 mg / 100 g Protein ermittelt, welcher etwas über dem Grenzwert liegt. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein, dass während des Transports die Kühlkette nicht optimal eingehalten wurde und somit es zu einer leichten Erwärmung der Milch kam. Weiters besteht die Möglichkeit, dass diese Milch bereits mit einem erhöhten Furosingehalt gemolken wurde, da die Milchezusammensetzung sowohl durch die Fütterung als auch das Alter der Kuh beeinflusst werden kann.

Das Chromatogramm 4.26 stellt die Rohmilch mit einem Furosingehalt von 8,1 mg / 100 g Protein dar.

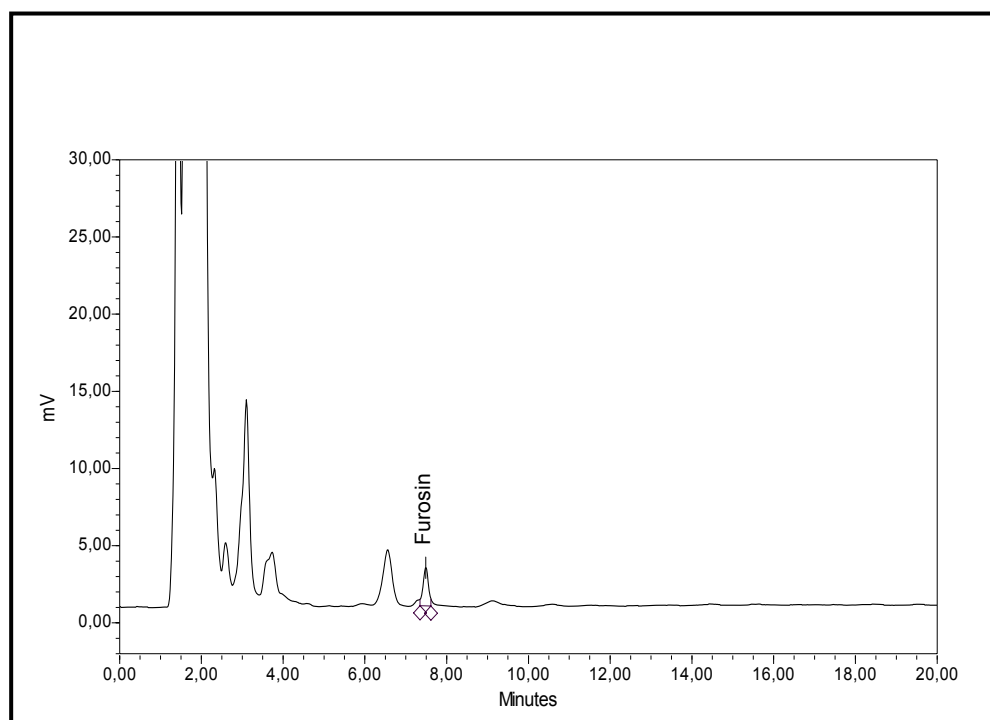


Abbildung 4.26: Chromatogramm der Rohmilch

4.4 Vergleich: Natives β -Lactoglobulin mit Furosin

Um einen besseren Vergleich und möglichen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen darzustellen, wird der Gehalt an nativem β -Lactoglobulin direkt mit dem Furosingehalt in der Milch verglichen.

Um hier ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erzielen, wurden noch die gemeinsam mit [SCHMID, 2009] analysierten Proben hinzugezogen.

Aus der Abbildung 4.25 ist ersichtlich, dass mit steigendem Furosingehalt, der Gehalt an nativem β -Lactoglobulin sinkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit zunehmender Hitzebelastung der Milch mehr Furosin im Zuge der *Maillard*-Reaktion gebildet wird und immer mehr der hitzelabilen Molkenproteine denaturiert werden.

Besonders deutlich ist hier die ausgeprägte Qualitätsdifferenz zwischen den ESL-Vollmilchproben und ESL-Leichmilchproben erkennbar. Die Vollmilchproben enthielten beinahe den siebenfachen Gehalt an β -Lactoglobulin und wiesen gleichzeitig nur den halben Wert an Furosin auf.

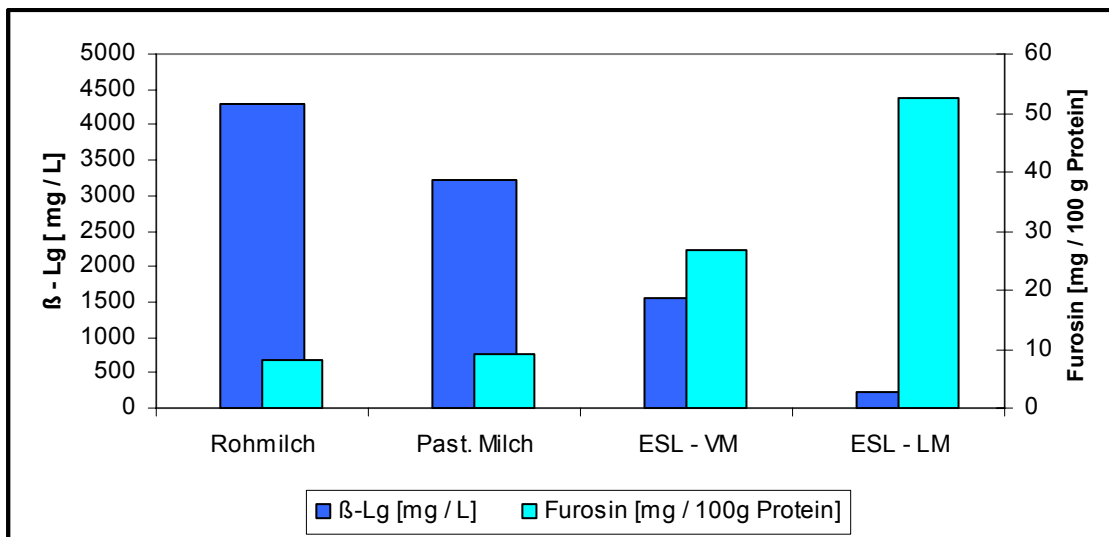


Abbildung 4.27: Vergleich der Mittelwerte von Furosin und β -Lactoglobulin aller Milchproben

Tabelle .4.4: Vergleich des nativen β -Lactoglobulins mit Furosin der pasteurisierten Milchproben

Nr.	Bezeichnung	β-Lg [mg / L]	Furosin [mg / 100 g Protein]
144	Clever	3556,5	9,7
129	Ja! Natürlich	3429,0	9,7
131	Ja! Natürlich	3416,5	9,5
130	Ja! Natürlich	3045,0	9,9
138	Ja! Natürlich	2958,0	7,8
139	Ja! Natürlich	2865,0	9,0

Tabelle 4.5: Vergleich des nativen β -Lactoglobulin mit dem Furosingehalt bei ESL-Milchproben

Nr.	Bezeichnung	β-Lg [mg / L]	Furosin [mg / 100 g Protein]
148	Natur aktiv	3156,5	12,7
146	Clever	2793,0	11,0
153	Natur aktiv	2720,5	10,4
151	Clever	2595,5	8,4
149	Bio Bio	2534,0	10,6
154	Bio Bio	2533,0	10,5
150	Bioness	2502,5	11,5
155	Bioness	2459,5	11,5
140	Ja!Natürlich	306,5	51,2
152	Natur Pur	289,3	29,0
134	Ja!Natürlich	278,4	45,4
147	Natur Pur	277,3	33,8
143	Ja!Natürlich	275,5	49,3
141	Ja!Natürlich	259,1	68,7
142	Ja!Natürlich	243,5	64,3
137	Ja!Natürlich	229,7	50,3
132	Ja!Natürlich	226,4	48,3
135	Ja!Natürlich	217,0	46,9
136	Ja!Natürlich	192,4	52,4
133	Ja!Natürlich	185,9	39,1

Mit den in den Tabellen 4.5 und 4.6 dargestellten Werten, wurde die Korrelation zwischen Furosin und nativem β -Lactoglobulin berechnet, wie in der Abbildung 4.28 dargestellt ist.

Es kann ein Zusammenhang zwischen hohen β -Lactoglobulinwerten und niedrigem Furosingehalt aus der Kurve abgelesen werden. Deutlich erkennbar ist, dass keine Werte zwischen 400 und 2300 mg β -Lg / L aufscheinen. Dies kann auf die unterschiedliche thermische Belastung der verschiedenen Erhitzungsmethoden (direkte und indirekte Verfahren, modifizierter Pasteur) zurückgeführt werden.

Das Ergebnis der Rohmilch konnte nicht berücksichtigt werden, da es als so genannter „Ausreißer“ das Bestimmtheitsmaß des Zusammenhangs drastisch senken würde.

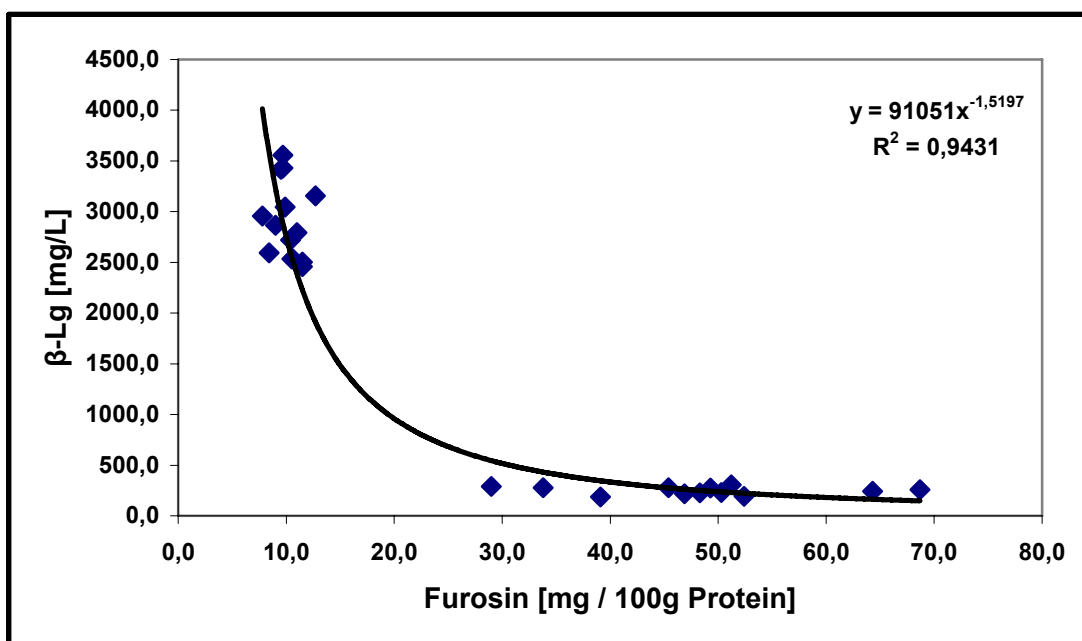


Abbildung 4.28: Zusammenhang zwischen β -Lactoglobulin und Furosin aller pasteurisierten und ESL-Milchproben

Bei pasteurisierter Milch lag der durchschnittliche Gehalt an β -Lactoglobulin bei 3100 mg / L Milch und diese enthielt im Mittel 6 bis 8 mg Furosin / 100 g Protein [GALLMANN et al, 2001; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1998].

Von den sechs analysierten Proben lag nur eine Probe (138) im Bereich dieses Furosingehalts, enthielt jedoch mit 2958 mg β -Lg / L Milch etwas weniger als den Durchschnittsgehalt. Alle übrigen fünf pasteurisierten Milchproben lagen etwas über dem Mittel bei dem Furosingehalt und bis auf zwei Proben auch im durchschnittlichen Molkenproteingehalt, wie in Abbildung 4.29 zu sehen ist.

Auf Grund der geringen Probenanzahl und der abweichenden Ergebnisse besteht zwischen diesen nur ein äußerst geringer Zusammenhang.

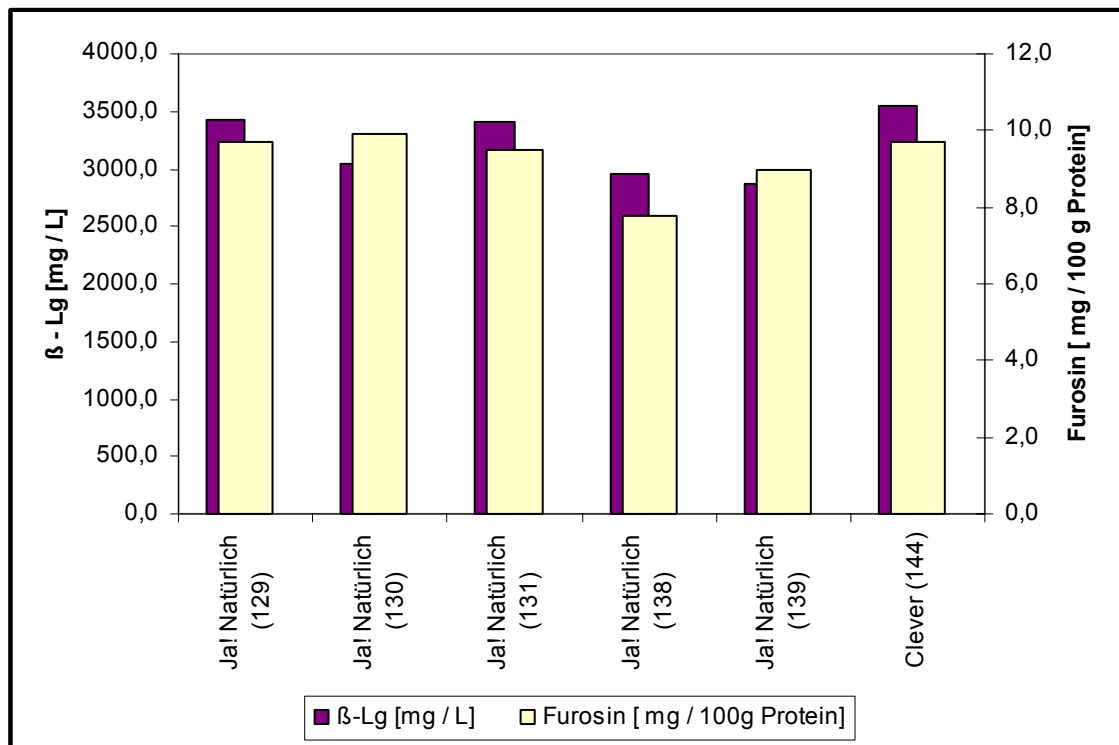


Abbildung 4.29: Vergleich Furosin und β -Lactoglobulin bei pasteurisierten Milchproben

Bei den ESL-Milchproben lagen nur acht aller untersuchten Proben über dem Mindestwert von 1800 mg / L Milch. Des Weiteren wiesen diese, mit Ausnahme einer Probe (148) mit 12,7 mg Furosin / 100 g Protein, auch Furosinwerte unter dem Grenzwert von Furosin von 12 mg / 100 g Protein auf [DYCK, 1999].

An der Abbildung 4.30 ist die deutliche Qualitätsdifferenz zwischen den einzelnen Milchproben zu sehen. Diese ist abhängig von dem angewandten Verfahren, da die indirekte Erhitzung sowie die Anwendung des modifizierten Pasteurs zu einer wesentlich deutlicheren Denaturierung der Molkenproteine führen als die direkten Thermisierungsverfahren [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

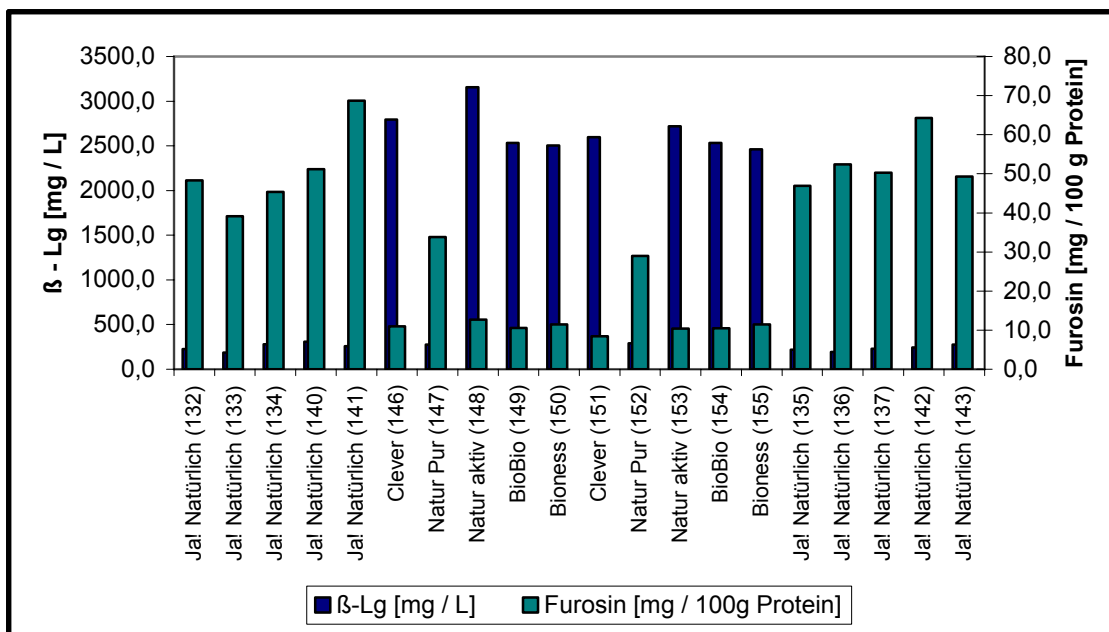


Abbildung 4.30: Vergleich des Gehalts an Furosine und β -Lactoglobulin bei ESL-Milchproben

Bei dem Vergleich aller Ergebnisse der ESL-Milchproben kann ein relativ guter Zusammenhang zwischen hohen β -Lactoglobulinwerten und einem geringen Gehalt an Furosine ermittelt werden, wie in Abbildung 4.31 zu sehen ist.

Auch in dieser Kurve ist die Lücke zwischen 400 und 2300 mg β -Lg / L Milch deutlich ersichtlich, da unterschiedliche Erhitzungsverfahren bei den Milchproben angewandt wurden.

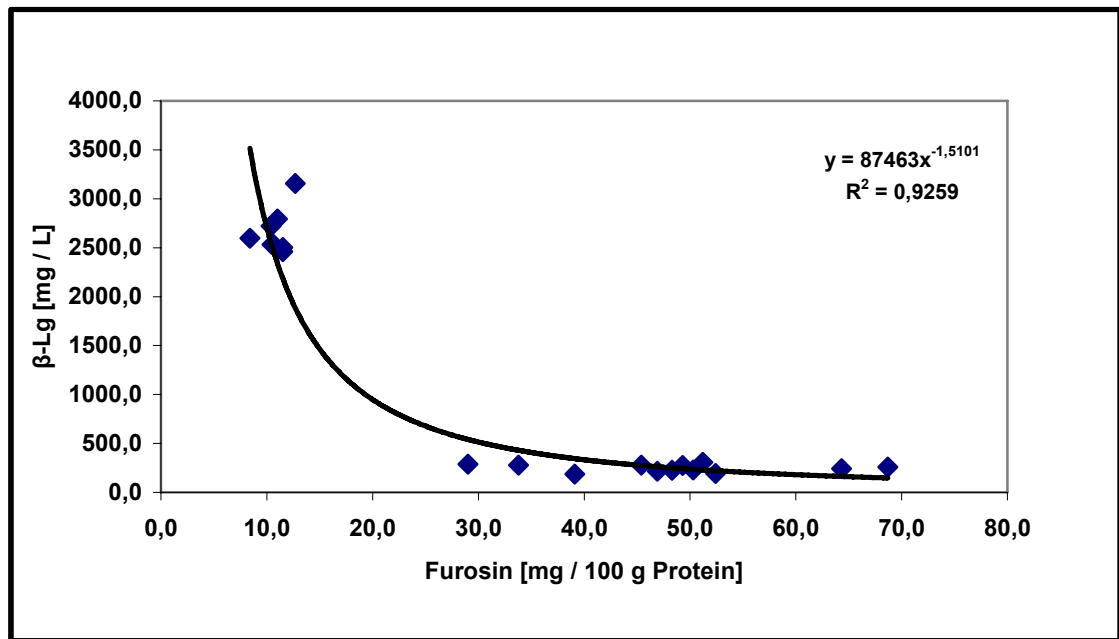


Abbildung 4.31 Zusammenhang zwischen β -Lactoglobulin und Furosine bei ESL-Milchproben

Wenn die Ergebnisse der ESL-Leichtmilchproben aus der Regression genommen werden, sinkt die Korrelation von Furosine und nativem β -Lactoglobulin nur leicht, wie aus der Abbildung 4.32 abzulesen ist.

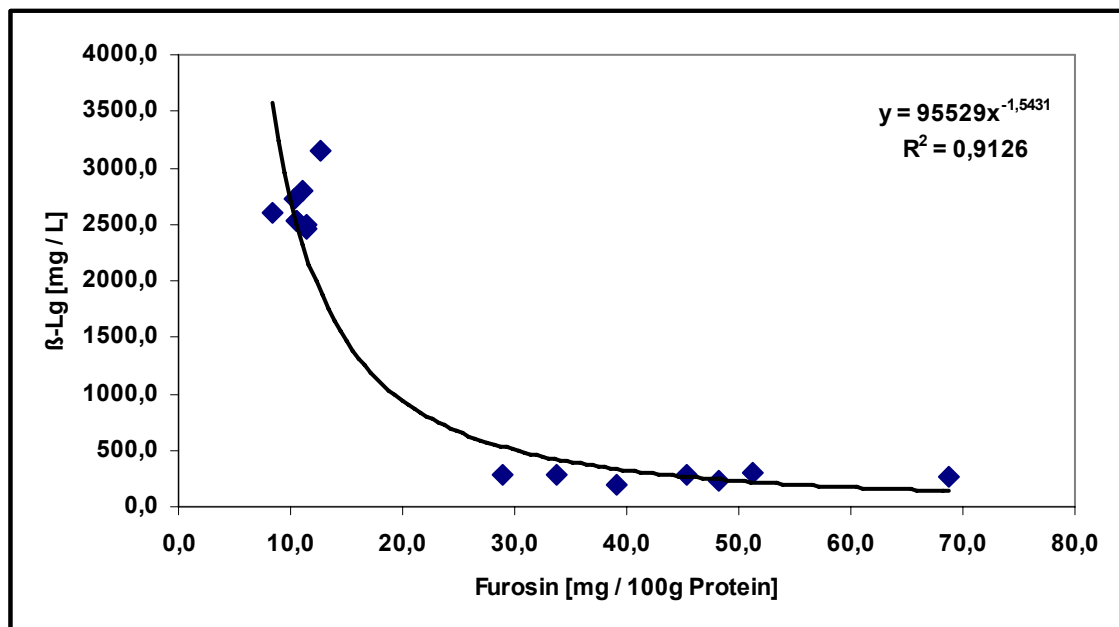


Abbildung 4.32: Zusammenhang zwischen β -Lg und Furosine bei ESL-Vollmilchproben

4.5 Ergebnisse der Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl

<i>Nr.</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>% Stickstoff</i>	<i>% Protein</i>
138	Ja! Natürlich frische VM	0,49	3,11
139	Ja! Natürlich frische VM	0,48	3,06
140	Ja! Natürlich VM	0,48	3,05
141	Ja! Natürlich VM	0,48	3,11
142	Ja! Natürlich LM	0,51	3,23
143	Ja! Natürlich LM	0,50	3,22
144	Clever VM	0,50	3,21
145	Rohmilch Danzinger	0,55	3,50
146	Clever VM länger frisch	0,52	3,30
147	Natur Pur Bio VM länger frisch	0,49	3,15
148	Natur aktiv Bio VM länger frisch	0,51	3,30
149	BioBio VM länger frisch	0,50	3,22
150	Bioness länger frische Bio VM	0,52	3,33
151	Clever VM länger frisch	0,52	3,38
152	Natur Pur Bio VM länger frisch	0,48	3,10
153	Natur aktiv Bio VM länger frisch	0,48	3,07
154	BioBio VM länger frisch	0,51	3,27
155	Bioness länger frische Bio VM	0,51	3,27
Mittelwert:			3,22
Standardabweichung:			0,12
Variationskoeffizient:			3,7 %

Alle Proben wurden im Doppelansatz analysiert und die dargestellten Werte stellen die Mittelwerte der ermittelten Ergebnisse dar.

4.6 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojaprodukten mittels HPLC

Die Sojabohnen wurden, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, nach der Methode nach *Jangchud und Bunnag*, sowie nach der Methode nach *Cicek* aufgearbeitet. Um eine Verbesserung der Extraktion der enthaltenen Kohlenhydrate zu erreichen, wurden beide Methoden modifiziert und die Ergebnisse der Versuchsdurchführungen sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

Ergebnisse des Versuch I:

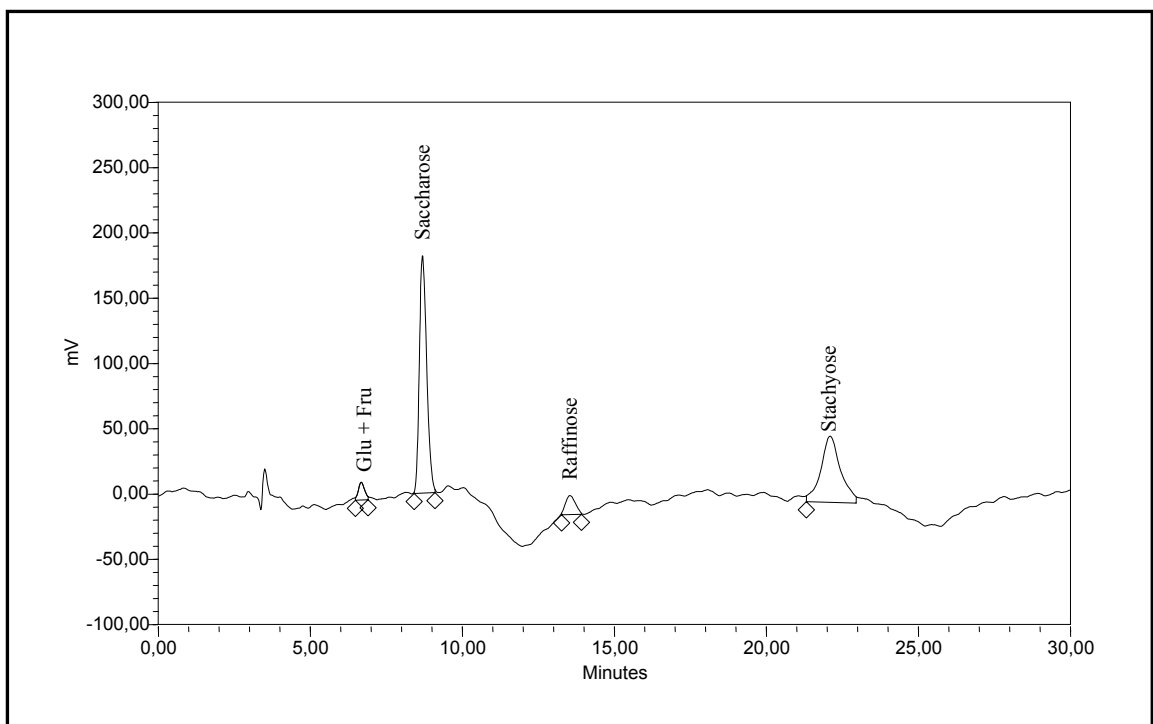


Abbildung 4.33: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach der Extraktion mit UHQ-Wasser [CICEK,2001]

Ein Chromatogramm der extrahierten Zucker, welche nach der Methode nach *Jangchud und Bunnag* aufgearbeitet wurden, kann zum besser Vergleich nicht mehr dargestellt werden, da erst kurz vor Beendigung dieser Arbeit der Verlust der extrahierten Zucker in der Sep-Pak Säule erkannt wurde.

Versuch II:

Die Abbildung 4.34 stellt das Chromatogramm einer Sojabohne dar, welche nach der Methode II, einer einmaligen Extraktion der Kohlenhydrate mit Wasser, aufgearbeitet wurde.

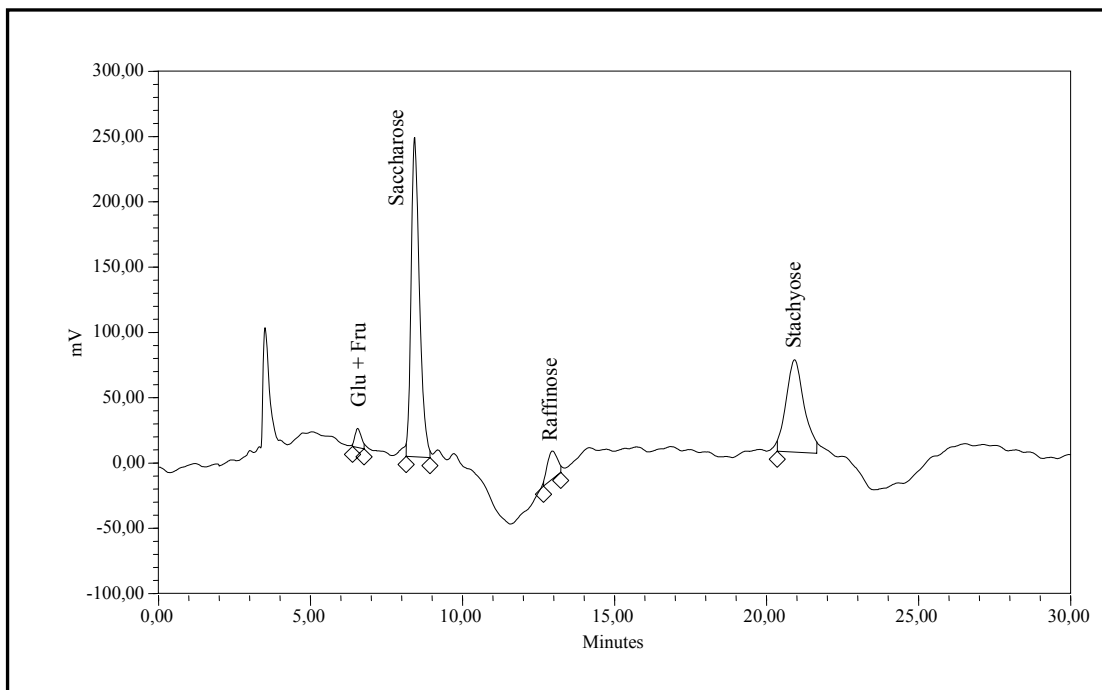


Abbildung 4.34: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach einmaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei RT [1g / 10mL]

Um eine mögliche Optimierung der Zucker-Extraktion zu erreichen, wurde das UHQ-Wasser auf 50 °C erhitzt und das Ergebnis in Abbildung 4.35 zeigt, dass keine eindeutige Verbesserung der Extraktionskraft erreicht werden konnte. Im Gegenteil es ist sogar eine geringe Ausbeute der löslichen Kohlenhydrate, erkennbar.

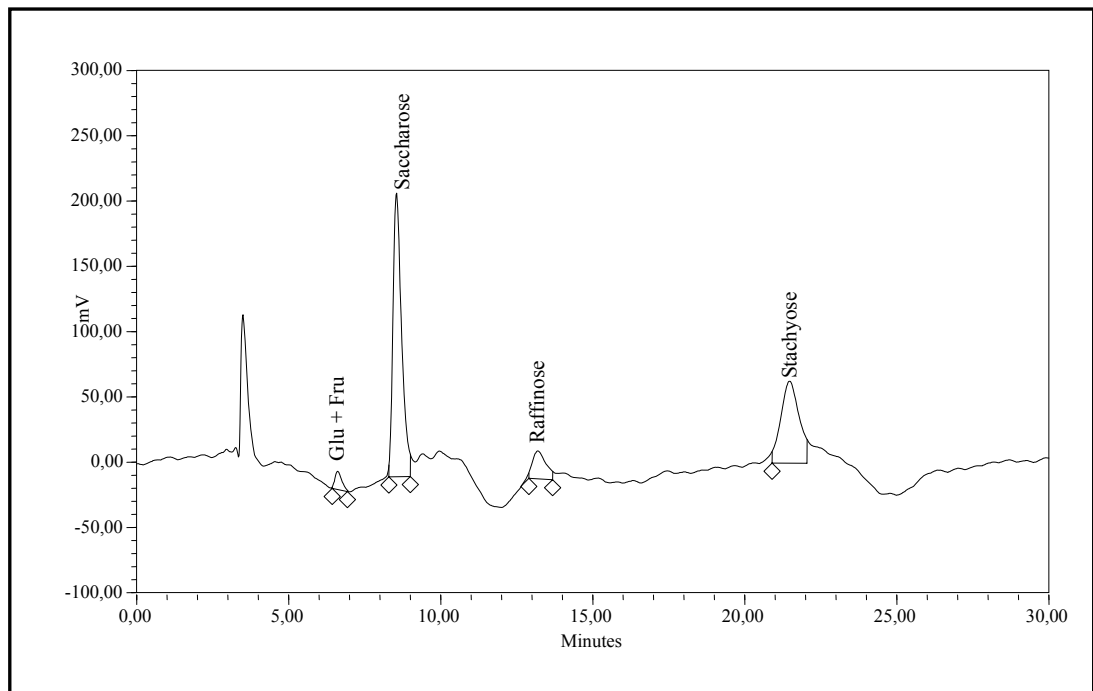


Abbildung 4.35: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach einmaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei 50°C [2g / 25 mL]

Um die mögliche negative Wirkung des erhitzten UHQ-Wassers auf die Extraktion der Kohlenhydrate zu verdeutlichen, wurde jeweils eine zweite Extraktion durchgeführt, wie in Kapitel 3.5.1 unter Versuch IV beschrieben ist. Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis dieses Versuchs und es konnte festgestellt werden, dass bei der zweimaligen Extraktion in beiden Fällen ein schlechteres Ergebnis gegenüber einer einmaligen Extraktion erzielt wurde.

Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die gemahlene Sojabohne sich nicht optimal mit dem Lösungsmittel vermengen konnten und somit weniger Zucker extrahiert werden konnte. Ausgehend von den bisher ermittelten Ergebnissen sollten hier noch weitere Versuche stattfinden, ob eine einmalige Extraktion oder doch zwei Extraktionen zu einem besseren Ergebnis führen, eventuell müssten Versuchsbedingungen, wie die Einwaage oder das Lösungsmittel noch verändert werden, um zu einem optimierten Ergebnis zu führen.

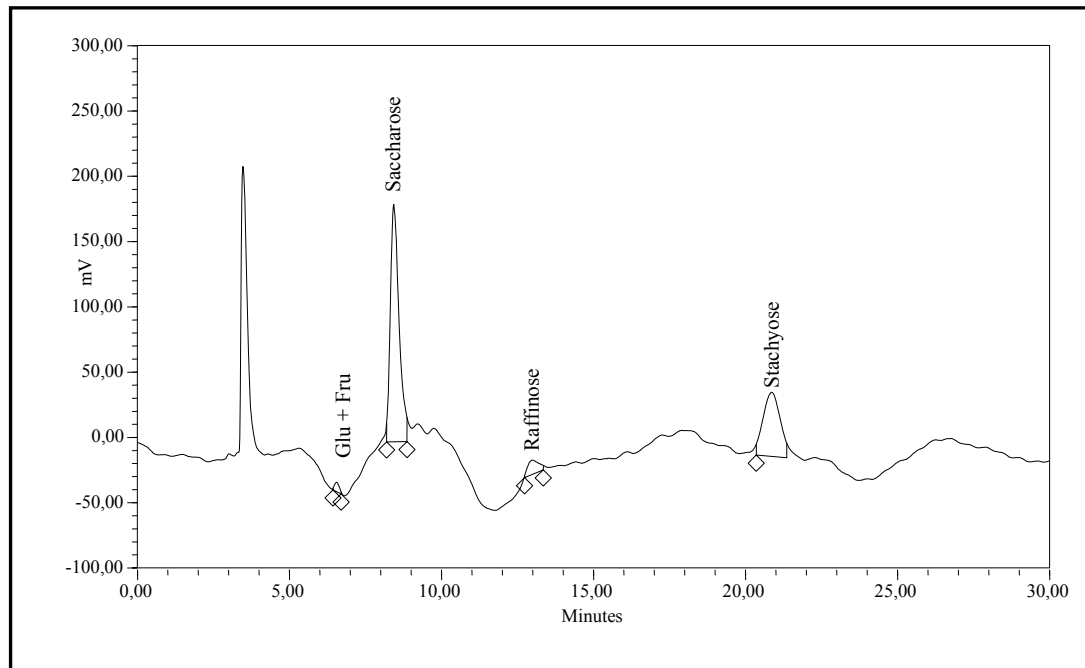


Abbildung 4.36: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach zweimaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei RT [2g / 25 mL]

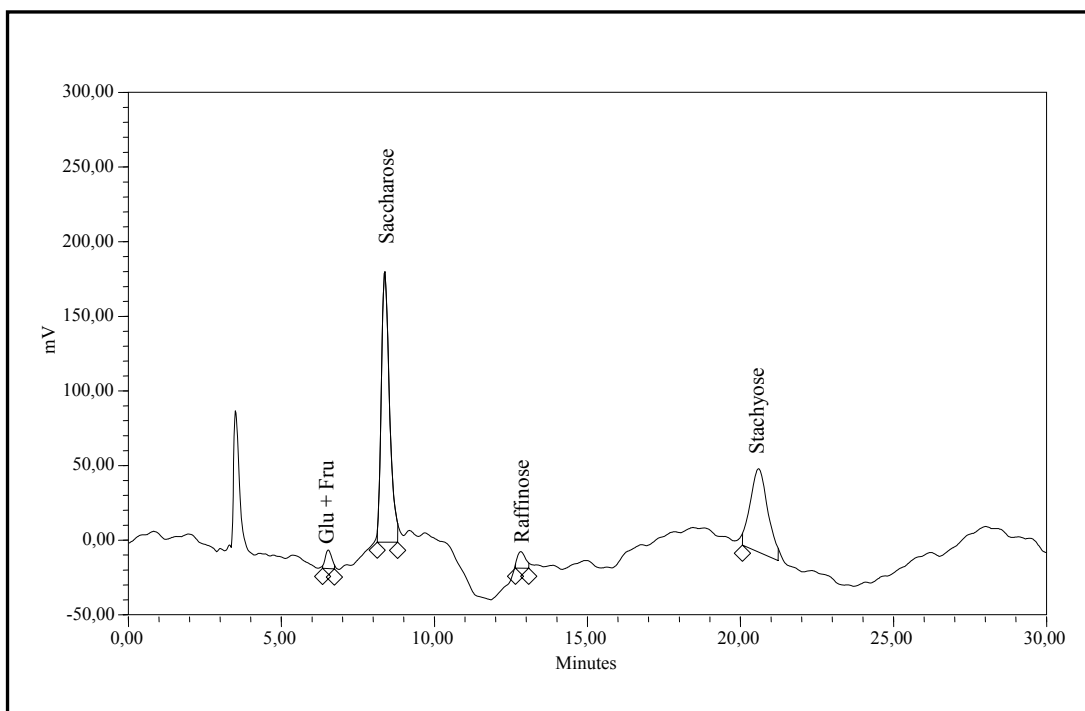


Abbildung 4.37: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach zweimaliger Extraktion mit UHQ-Wasser bei 50°C [2g / 25 mL]

Im Vergleich zu den zuvor besprochenen Methoden konnte das Ergebnis der Extraktion hinreichend verbessert werden, wenn eine „direkte Injektion“ des erbeuteten Extrakts durchgeführt wurde, wie im Versuch III im Kapitel 3.5.1 beschrieben.

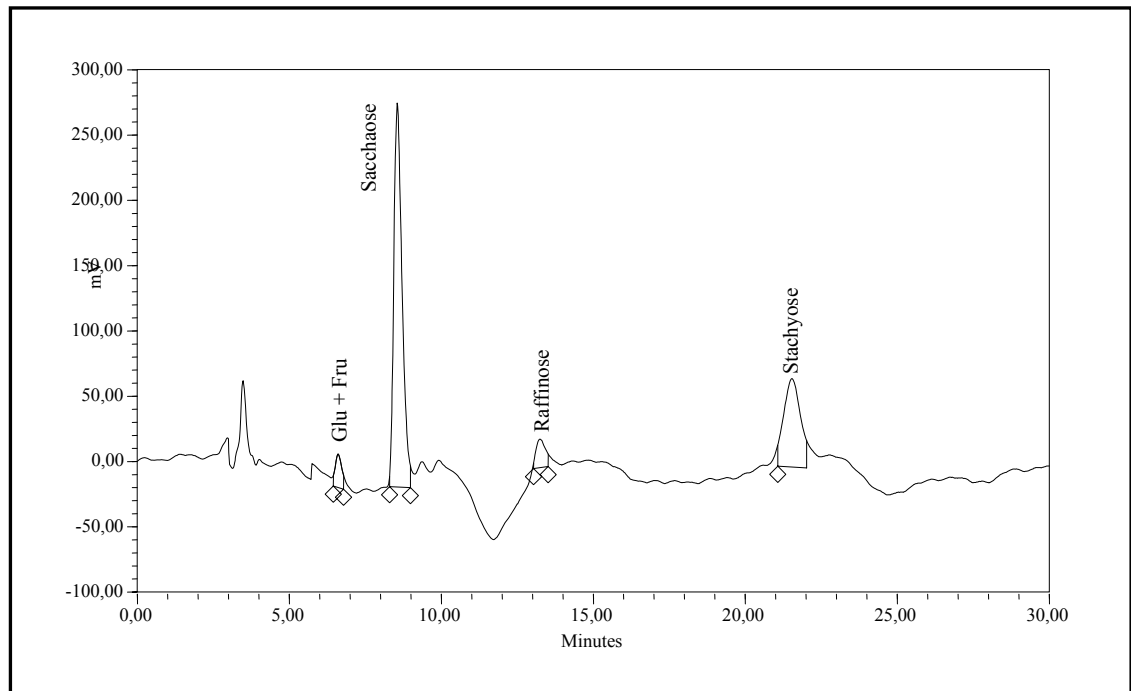


Abbildung 4.38: Chromatogramm der extrahierten Zucker, nach "direkter Injektion" des Zuckerextrakts [1,5g / 25 mL]

Bei dem Versuch die in den gemahlenden Sojabohnen enthaltenen Zucker in einer höheren Konzentration in den Chromatogrammen darzustellen, wurde festgestellt, dass eine vollständige Auflösung des eingetrockneten Zuckerextrakts in 200 μ L 70 % igem AcN nicht mehr möglich war, da hier offensichtlich die Sättigungsgrenze bereits überschritten war.

Im Gegensatz hierzu war es jedoch möglich das eingetrocknete Extrakt in 200 μ L UHQ-Wasser zur Gänze zu lösen. Dies kann wahrscheinlich auf die höhere Polarität des Lösungsmittels zurückzuführen sein.

Bei der Analyse der Sojamilch konnte geringere Menge an enthaltenen Zuckern gewonnen werden. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Daten aus der Literatur überein.

Diese Sojamilch wurde, vor der Analyse nach *Cicek*, für 24 Stunden lyophilisiert und anschließend wie bereits in der zuvor beschriebenen Methode aufgearbeitet. Bei den Versuchen mit Sojamilch wurde jedoch die Einwaage auf 1 g lyophilisierte Probe reduziert.

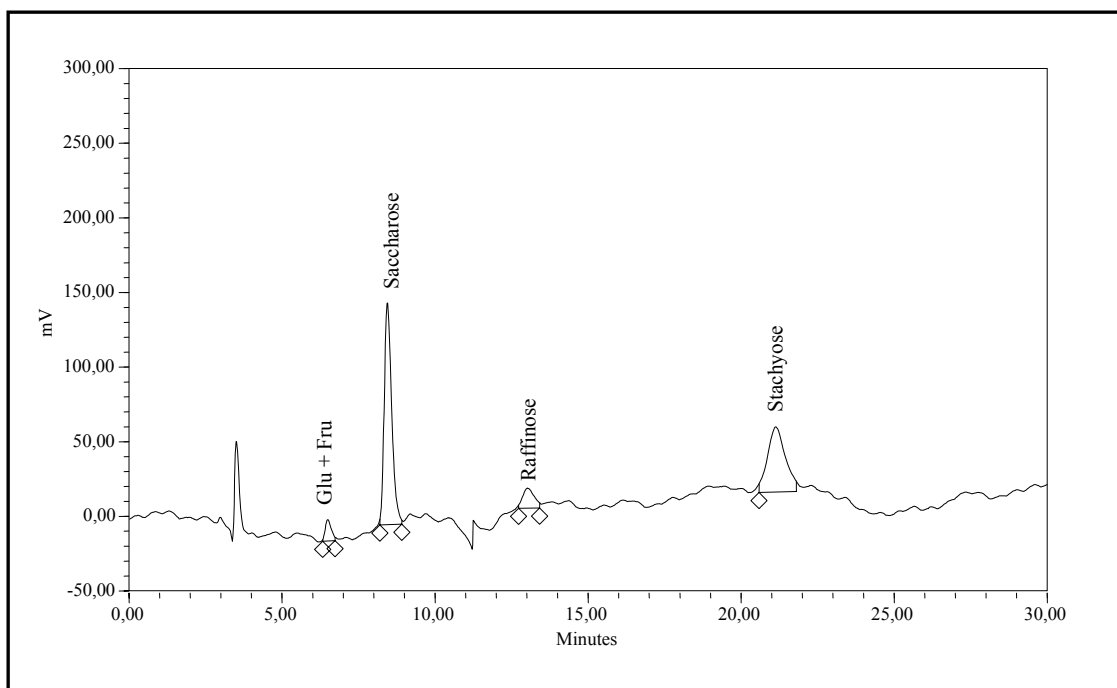


Abbildung 4.39: Chromatogramm der extrahierten Zucker aus Sojamilch [1g / 10 mL]

4.7 Optimierung der chromatographischen Einstellungen zur Analyse von löslichen Kohlenhydraten in Sojabohnen

An den folgenden Chromatogrammen von Vierfach-Zuckerstandards (Fructose, Glucose, Saccharose, Raffinose) sind die Auswirkungen des Lösungsmittels auf die zu analysierten Stoffe besonders deutlich an Hand der unterschiedlichen Retentionszeiten der einzelnen Zuckerstandards zu erkennen.

Alle nachfolgenden Abbildungen zeigen Zuckerstandards in einer Konzentration von 5 mg / mL.

Die erste Abbildung zeigt den Vierfach-Zuckerstandard, gelöst in 70 % AcN und in selbigem Laufmittel bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.8 mL / Minute.

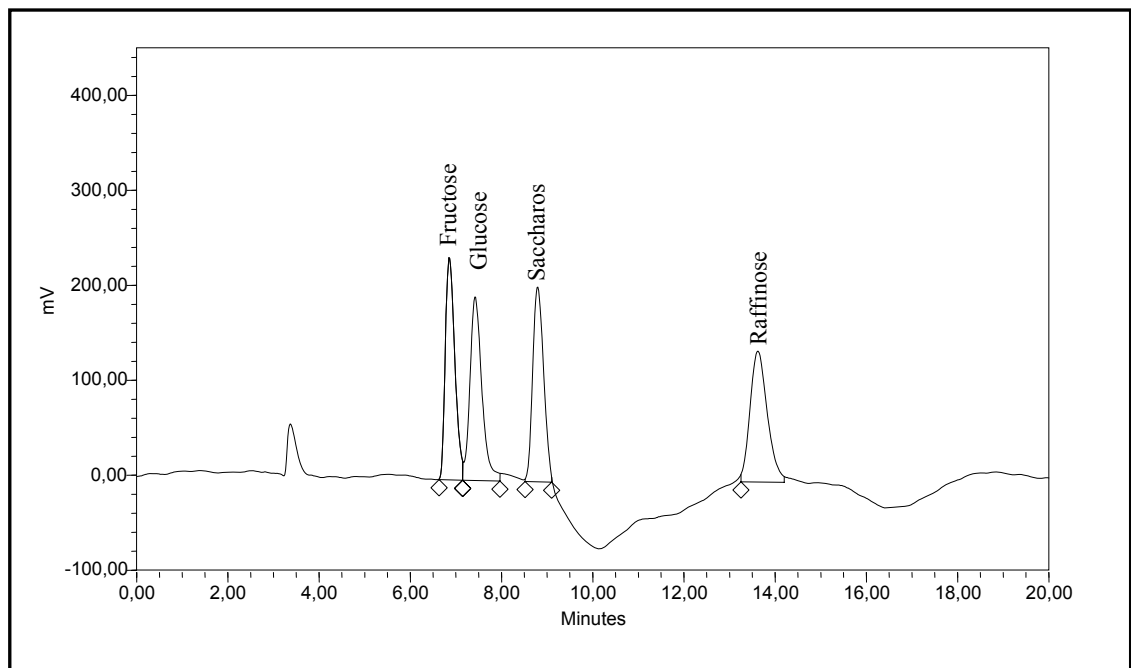


Abbildung 4.40: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards (LM 70% AcN)

Im Vergleich zur Abbildung 4.40, ist in der Abbildung 4.41 die deutlich längere Retentionszeit der einzelnen Zuckerstandards zu erkennen. In dem folgenden Chromatogramm wurden die Zuckerstandards in 80 %igem Acetonitril gelöst und auch das Laufmittel wies eine Konzentration von 80 % AcN auf. Alle weiteren Versuchsbedingungen waren identisch.

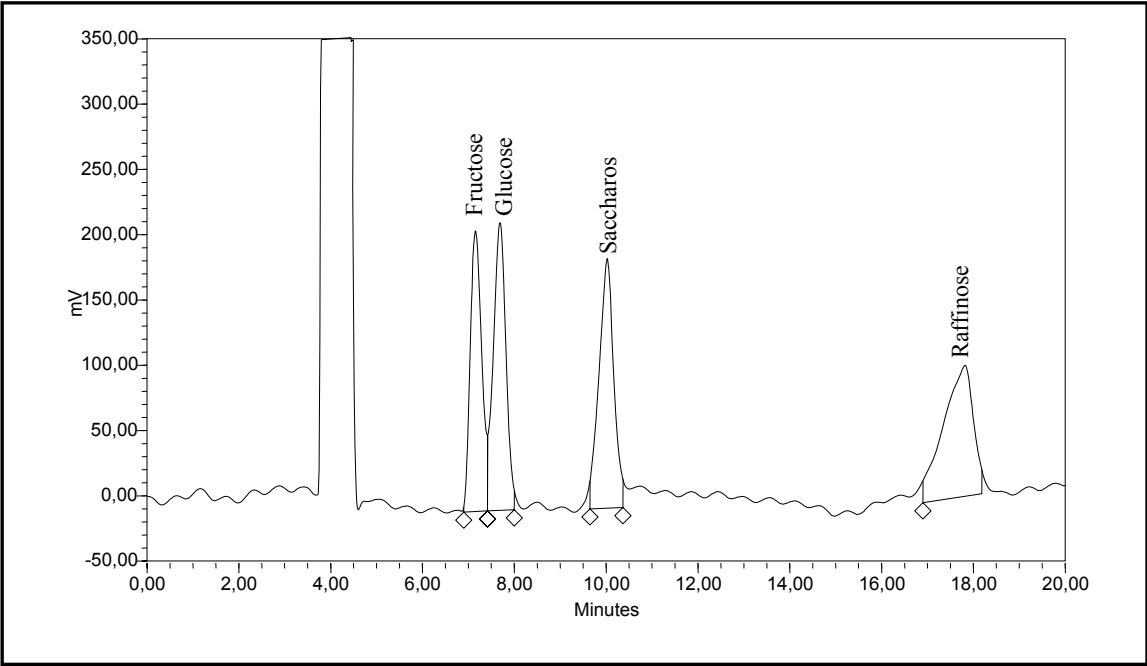


Abbildung 4.41: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards (LM 80% AcN)

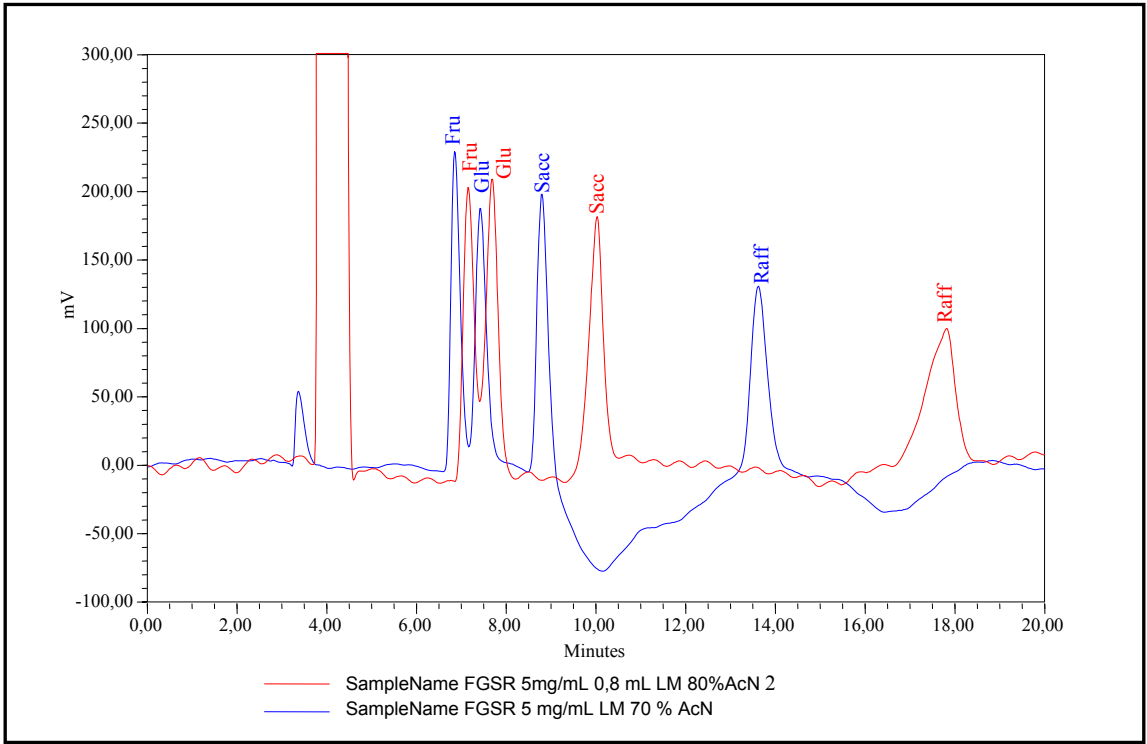


Abbildung 4.42: Vergleich beider 4-fach Zuckerstandards

Wie aus der Abbildung 4.42 ersichtlich ist, wirken sich die Änderungen der Laufmittelkonzentrationen mit zunehmender Retentionszeit deutlicher aus. Sind bei den beiden ersten detektierten Zuckern, Fructose und Glucose, nur geringe Unterschiede in der Retentionszeit erkennbar, können bereits bei der Saccharose und vor allem bei der Raffinose sehr deutliche Unterschiede in der Retentionsdauer festgestellt werden. Bei der Verwendung des Laufmittels von 70 % AcN beträgt die Retentionszeit von Raffinose in etwa 13 Minuten, bei einer Konzentration von 80 % AcN immerhin schon beinahe 18 Minuten.

Auf Grund der kürzeren Retentionszeiten und der besseren Auftrennung der Zuckerstandards, erfolgten alle weiteren Versuch bei einer Laufmittelkonzentration von 70 % AcN. Die folgende Abbildung zeigt nun den Vergleich des Laufmittels, welches in der Mischkammer auf die gewünschte Konzentration gemischt wird (blaue Linie) und einem von Hand gefertigten Laufmittel (rote Linie). In beiden Fällen betrug die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels 0,8 mL / Minute.

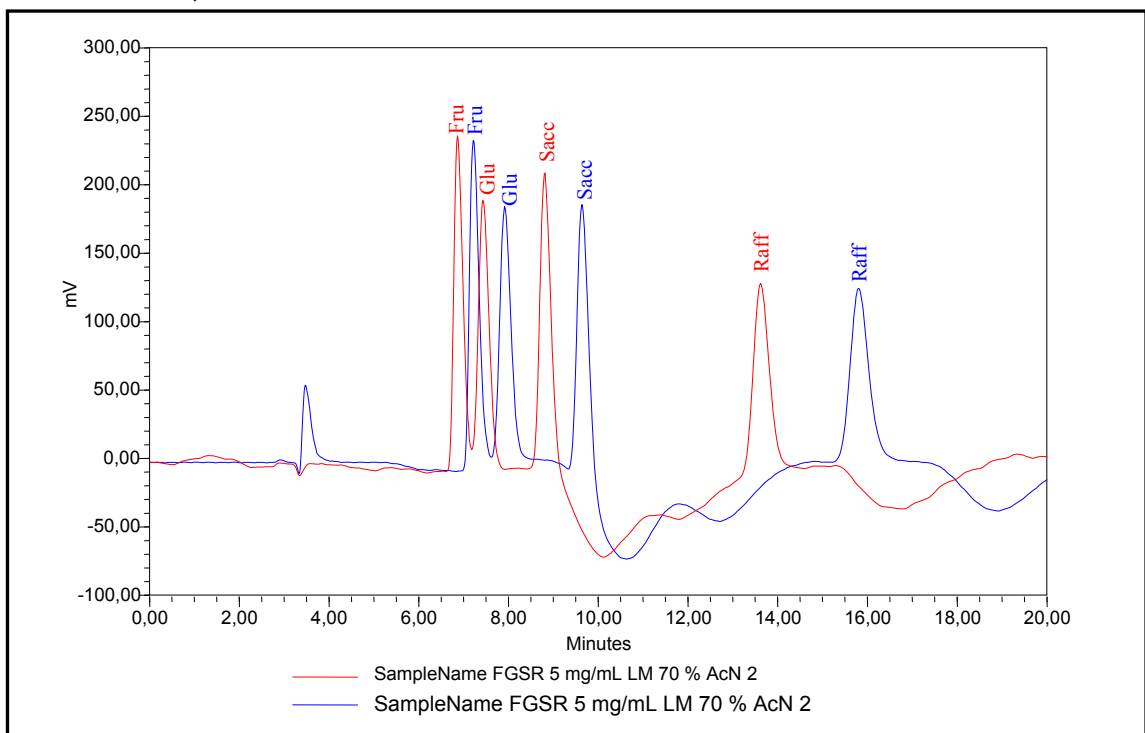
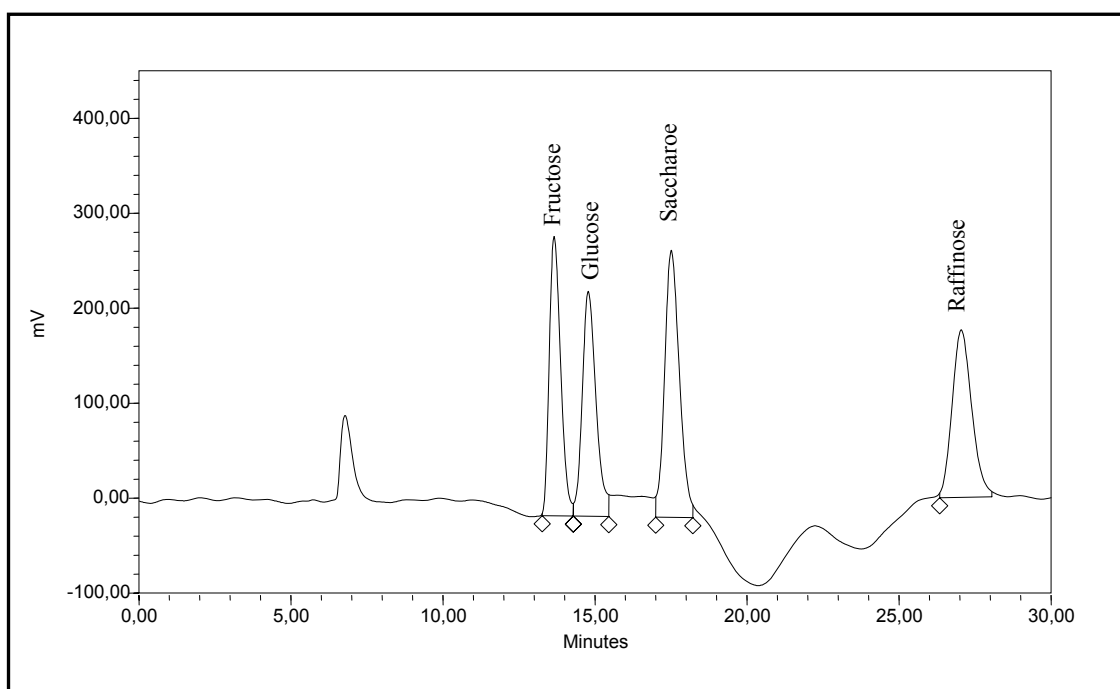


Abbildung 4.43: Vergleich der Chromatogramme von direkt und indirekt gemischtem LM

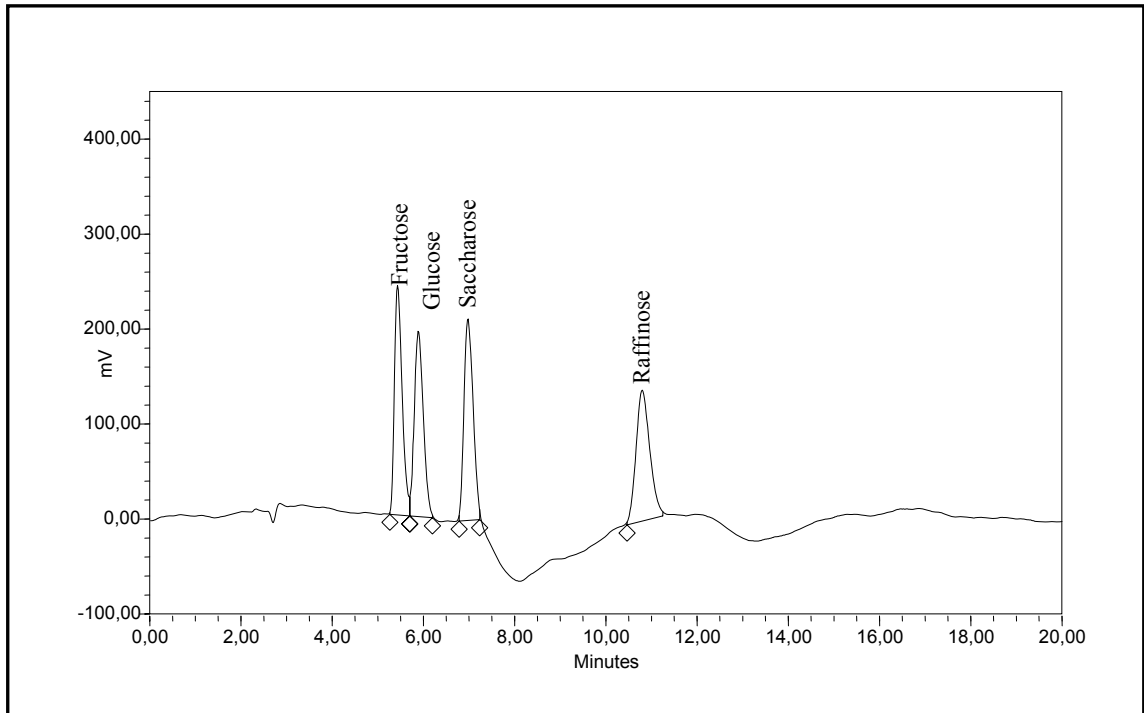
Um die Auftrennung der einzelnen Peaks zu verbessern, wurde zu den jeweiligen Zuckerstandards 0,8 % Triethylamin zugefügt. Doch es konnte kein Unterschied zu Auftrennung der Zuckerstandards ohne TEA festgestellt werden.

Weitere Versuche bestanden darin, eine verbesserte Auftrennung der einzelnen Peaks mittels veränderter Flussgeschwindigkeit zu erzielen.

Wie deutlich sich unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten auf die Auftrennung der einzelnen Peaks und deren Retentionszeit auswirken, ist in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Erstere zeigt das Chromatogramm eines Vierfach-Zuckerstandard bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 mL 70 % AcN pro Minute, während zweiteres mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL pro Minute aufgenommen wurde.



**Abbildung 4.44: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards,
LM 70 % AcN, Fluss 0,4 mL/ min**



**Abbildung 4.45: Chromatogramm eines 4-fach Zuckerstandards, LM 70% AcN,
Fluss 1,0 mL/ min**

In Betrachtung aller ermittelten Ergebnisse, sowohl die Laufmittelzusammensetzung als auch die Flussgeschwindigkeit betreffend, war 70 % iges AcN , welches erst in der Mischkammer der HPLC auf die gewünschte Endkonzentration gemischt wird, bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL / Minute, die bestmöglichen Trennungsmethode der Zuckerstandards als auch der gewonnen.

Somit waren die EndEinstellungen für die Analyse der Zuckerstandards beziehungsweise der gewonnenen Sojaextrakte aus Sojabohnen oder Sojamilch folgende:

Chromatographische Endeinstellungen zur Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten in Sojaprodukten mittels HPLC:

Injektionsvolumen: 20 µL

Säulentemperatur 30 °C

Laufzeit: 20 Minuten (Vierfachzuckerstandard)

30 Minuten (Zuckerextrakten, da Stachyose erst bei etwa 23 Minuten detektiert wird)

RI-Detektor

Laufmittel: gewünschte Endkonzentration 70 % AcN

Laufmittel B : 100 % AcN

Laufmittel D: 100 % UHQ-Wasser

5. Schlussbetrachtung

Abschließend betrachtet sind die Bestimmung der Hitzeindikatoren, hier besonders des Furosins, sowie des nativen β -Lactoglobulins mittels RP-HPLC geeignete Parameter zur Bestimmung der Qualitätsstufen in Milch, welche nach unterschiedlichen Erhitzungsverfahren behandelt wurde.

Bei den pasteurisierten Milchproben waren alle Milchproben von guter Qualität, da sie mindestens 2800 mg β -Lg / L Milch enthielten und der Furosinwert maximal 9,9 mg / 100 g Protein betrug. Diese Ergebnisse liegen etwas unter den angegebenen Literaturwerten von 3100 mg bis 3400 mg β -Lactoglobulin / L Milch, sowie geringfügig über 8 mg Furosin / 100 g Protein, welcher hier als Grenzwert gehandelt wird.

Bei den ESL-Milchproben konnte eine erhebliche Qualitätsdifferenz zwischen den einzelnen analysierten Handelsmarken festgestellt werden. Bei den ESL-Leichmilchproben lagen alle weit unter dem Grenzwert von 1800 mg / L Milch, während bei zwei Drittel der ESL-Vollmilchproben ein Wert von mindestens 2400 mg β -Lg / L Milch ermittelt werden konnte. Diese deutlich von einander abweichenden Ergebnisse der unterschiedlichen Handelsmarken könnten auf die Anwendung weniger produktschonender Erhitzungsverfahren, besonders der indirekten Verfahren, zurückgeführt werden. Auf Grund dessen würden sich auch die erheblichen Differenzen der Furosinwerte erklären lassen, welche von einem Minimalwert von 8,4 mg / 100 g Protein bis zu einem Höchstwert von 68,7 mg / 100 g Protein reichen. Die im Vergleich hierzu untersuchte Rohmilch enthielt 4299 mg β -Lg / L Milch und wies einen Furosingehalt von 8,1 mg / 100 g Protein auf. Diese Milch ist von sehr guter Qualität, wobei der erhöhte Furosinwert auf eine Unterbrechung der Kühlkette deuten könnte.

Bei der Gewinnung von löslichen Kohlenhydraten aus Sojabohnen und Sojamilch, lieferten die Extraktionen mittels UHQ-Wasser als auch mit 80 % igen Ethanol, welcher auf 60 °C erhitzt wurde, die besten Ergebnisse. Es bedarf jedoch noch weiterer Analysen, ob eine einmalige Extraktion ausreichend ist

oder doch eine doppelte Extraktion zu einem signifikant besseren Ergebnis führen würde.

Des Weiteren wurden auch zahlreiche chromatographische Versuche zur Erstellung eines geeigneten Analysenprogramms der extrahierten Zucker mittels HPLC durchgeführt. Die aussagekräftigsten Ergebnisse konnten bei der Verwendung von 70 %igem AcN als Laufmittel mit 0,8 mL Flussgeschwindigkeit je Minute erzielt werden. Diese Laufmittelkonzentration stellt auch ein geeignetes Lösungsmittel für die Zuckerstandards Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose und Stachyose, bei einer Konzentration von 5 mg / mL, dar.

In den Sojabohnen sind die Kohlenhydrate Saccharose und Stachyose vorherrschend, Raffinose ist ebenso gut nachweisbar. Glucose und Fructose ist sowohl in Sojabohnen als auch in Sojamilch nur in sehr geringen Mengen enthalten.

6. Zusammenfassung

Die Qualität der Milch wird maßgeblich von einigen Kriterien, wie der Rohmilchqualität, dem Erhitzungsverfahren und der produktgemäßen Lagerung und Verpackung beeinflusst. Im Zuge der unterschiedlichen Erhitzungsverfahren werden die Inhaltsstoffe, hier vor allem das native β -Lactoglobulin (β -Lg), in unterschiedlichem Ausmaß denaturiert, wobei gleichzeitig Erhitzungsindikatoren wie Furosin, Hydroxymethylfurfural (HMF) und Lactulose gebildet werden. Je höher der Gehalt an Molkenproteinen und je geringer die Menge der Erhitzungsindikatoren nach der thermischen Belastung ist, desto wertvoller ist diese Milch, aus ernährungsphysiologischer Sicht.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden pasteurisierte und Extended Shelf Life (ESL)-Milchproben, sowie eine Rohmilch auf ihren Gehalt an nativem β -Lg und Furosin mittels RP-HPLC analysiert. Hierbei konnten besonders innerhalb der ESL-Milchproben sehr deutliche Qualitätsunterschiede festgestellt werden. Diese wiesen einerseits β -Lactoglobulinwerte weit unterhalb des Grenzwertes von 1800 mg / L Milch auf, andererseits lagen einige Milchproben über 3000 mg β -Lg / L Milch. Diese Differenzen spiegelten sich auch in den Furosinwerten wieder. Die analysierte Rohmilch, sowie die pasteurisierten Milchproben waren durchwegs von sehr guter Qualität. Diese wiesen einen Durchschnittswert von 3211,7 mg β - Lg / L Milch und 9,3 mg Furosin / 100 g Protein auf.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem nativen β -Lg und Furosin, konnte vor allem bei Milchproben, welche einer geringen thermischen Belastung ausgesetzt waren, festgestellt werden.

Erste Ergebnisse bei der Extraktion von löslichen Kohlenhydraten aus Sojabohnen und Sojamilch konnten durch Extraktionen mit UHQ-Wasser und 80 %igem Ethanol erzielt werden. Hierbei müssen jedoch noch weitere Versuchsreihen durchgeführt werden, um das optimale Extraktionsverfahren zu ermitteln. Die beste Löslichkeit der Zuckerstandards, ebenso der gewonnenen Extrakte lag bei 70 % AcN.

7. Abstract

Milk quality is influenced by criteria like raw-milk quality, thermal impact as well as specific product package and storage. As a result of the thermal load nutritional components like the native β -lactoglobulin (β -lg) are differently inactivated whereas concomitant heat load indicators, like furosine, hydroxymethylfurfural (HMF) and lactulose are generated. The higher the content of whey proteins and the lower the level of heat load indicators, the better is the milk quality regarding the nutritional grade.

In the course of this thesis, pasteurized and Extended Shelf Life (ESL)-milk samples, even one raw milk sample were analyzed by RP-HPLC and their content of native β -lactoglobulin and furosine was evaluated.

At this, considerable differences occurred especially regarding ESL-milk samples. On the one hand, detected native β -lactoglobulin contents were clearly under the lower threshold limit of 1800 mg β -lg / L, on the other hand β -lg amounts over 3000 mg β -lg / L were also measured. These results were compared to the detected furosine amounts. The pasteurized milk samples exhibited 3211 mg β -lg / L milk and 9 mg furosine / 100 g protein on average. Moreover, milk samples with a low thermal impact showed a good accordance between native β -lg and furosine.

Soluble carbohydrates of soy beans and soy milk could be extracted by using UHQ-water and ethanol of 80 %, but further studies are still necessary.

Sugar-standards showed the best solubility by using acetonitril of 70 % and following detection by HPLC.

8. Literaturverzeichnis

BAINY E M, TOSH S M, CORREDIG M, POYSA V, WOODROW L. Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. Carbohydrate Polymers, 2008, 72; 664-668.

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

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

CEDERROTH C R, NEF S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 304; 30-35.

CICEK, M. Genetic Marker Analysis of three major carbohydrates in soybean seeds. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Virginia, Dissertation, 2001; 38-40.

CLAEYS W L, SMOUNT C, VAN LOEY A M, HENDRICKX M E. From Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator Tolerance Levels: Heat-Treated Milk. Biotechnology Programm 2004, 20; 4-9.

CLAEYS W L, VAN LOEY A M, HENDRICKX M E. Intrinsic Time Temperature integrators for heat treatment of milk. Trends in Food Science & Technology 2002, 13; 299-304.

CLAWN-RÄDECKER I, KOEHN A, SCHLIMME E. Furosin: Hitzeindikator in Milch und Frischkäse. Deutsche Milchwirtschaft, 1996, 47; 902-904.

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

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

EBERHARD P, REHBERGER B. Milcherhitzungsverfahren nachweisen. Alimenta, 2005, 20; 4-5.

EBERMANN R, ELMADFA I. Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer Verlag, Wien, 2008; 378-382.

EISENBRAND G, SCHREIER P. RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie. 2.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2006; 1078-1079.

ELMADFA I, LEITZMANN C. Ernährung des Menschen. 4. Auflage, Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 2004; 146-151, 161-166, 226-234.

EN ISO 9001: 2008 EU_ Richtlinie

ERBERSDOBLER H F, SOMOLZA V. Fourty Years of furosine-Fourty Years of using *Maillard* Reaction products as indicators of nutritional quality of foods. Mol. Nutr. Food Res., Kiel, 2007, 51; 423-430.

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

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

FRANZKE C. Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage, B.Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, 1996; 428-429.

GALLMANN P, EBERHARD P, SIEBER R. Vor- und Nachteile der ESL (Extended Shelf Life)-Milch. Fam Info Nr. 423, Bern, 2001; 3-9.

JANGECHUD K, BUNNAG N. Effect of soaking Time and Cooking Time on Qualities of Red Kidney Bean Flour. Kasestart Journal, 2001; 409-412.

KAUFMANN V, KULOZIK U. Sterilfiltration und Keimabreicherung durch Mikrofiltration und Kombinationsverfahren. Deutsche Milchwirtschaft 2008,7; 234-235.

KAUFMANN V, SCHERER S, KULOZIK U. Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Konsummilch und ihre stofflichen Veränderungen: ESL-Milch. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Basel, 2009;1-3.

LEBENSMITTELSICHERHEITS- und VERBRAUCHERSCHUTZGESETZ - LMSVG, 2. Abschnitt, 2006;7-8.

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

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.

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

MORALES V, OLANO A, CORZO N. Ratio of Maltose to Maltulose and Furosine as Quality Parameters for Infant Formula. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52; 6732.

MULSOW B. Struktur-Eigenschaftsbeziehungen nicht-enzymatisch glykosylierter Molkenproteine. Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, Dissertation, 2008; 8-9.

NUßBAUMER K. Analytik biogener Amine und freier Aminosäuren in Milchproben sowie Bestimmung des nativen β -Lactoglobulin als Hitzeindikator in ESL-Milch mittels HPLC und UPLC. Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Lebensmittelchemie, Diplomarbeit, 2006; 68-69.

Prozessverfahren für die Produktion von ESL-Milch. GEA TDS GmbH, Sarstedt, 2009; 3-4,10-11.

RYSSTAD G, KOLSTAD J. Extended Shelf life milk-advances in technology. International Journal of Dairy technology, 2006; 59; 88-90.

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

SCHLIMME E, CLAWIN-RÄDECKER I, EINHOFF K, KIESNER C, LORENZEN P C, MARTIN D, MEISEL H, MOLKENTIN J, PRECHT D. Unterscheidungsmerkmale zur Bewertung der Wärmebehandlung von Milch. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 1996, 48;18.

SCHMIDT M. Ein Beitrag zur Quantifizierung individueller Milcheiweiß-Fraktionen in Milch und Milchprodukten. Dissertation, Herbert Utz Verlag, München, 2003; 12-16, 79.

SCHWERMANN S, SCHWENZOW U. Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch. Deutsche Milchwirtschaft 2008, 11; 384-390, 462-467.

SIENKIEWICZ T, KIRST E. Analytik von Milch und Milcherzeugnissen. B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 2006; 275-286.

SPREER E. Technologie der Milchverarbeitung. 8.Auflage, B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 2005; 25-129.

STRAHM W, EBERHARD P. Trinkmilchtechnologien. ALP Forum Nr. 72, Bern, 2009; 11-22.

TÖPEL A. Chemie und Physik der Milch. B.Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, 2004; 561-574.

VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. 2002; 7-9.

VERORDNUNG DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR GESUNDHEIT, SPORT UND KONSUMENTENSCHUTZ. Milchhygieneverordnung (ÖMHV 897 / 93), 2002; 1-6.

High Performance Liquid Chromatography. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1992, London, 1-5, 110-115.

ASTRID WUNDERER

Reifeprüfung: 15. Juni 2005 am BG/BRG Hollabrunn

Beginn des Studiums:

01. Oktober 2005: Diplomstudium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

1. Diplomprüfung: 5. Juli 2007

Praktika:

- 09.07.2007-05.08.2007:

Praktikum im Dungal Medical Vital Resort in Gars / Kamp

o Aufgaben:

- Erstellen von spezial Menüplänen
- Berechnen der Nährwerte
- Ernährungsberatung
- Einführung in das DGE-Ernährungsanalyseprogramm
- Literaturrecherche, v.a. TCM, 5-Elemente, Diabetes, Zöliakie, etc.
- Update der Ernährungsunterlagen

- 02.01.2008-31.01.2008:

Praktikum in der Lebensmitteluntersuchungsanstalt Wien

o Aufgaben:

- Probenannahme
- Sensorik : Stammdatenerfassung, Probenprüfung
- Bakteriologie: Probenevidenz, Probenansatz, Verdünnungsreihen, Keimdiagnostik, Arbeit mit pathogenen Keimen

- 01.09.2008-30.09.2008:

Praktikum bei Josef MANNER & Comp. AG

o Aufgaben:

- Labor-Analysen: Fettgehalt, Aschegehalt, Fettkennzahlen, Feuchtkleber, Refraktion, etc. diverser Rohstoffe und Halbfabrikate
- Probenziehung
- Klimaschrank-Dichtigkeitstests (Gewichtskontrollen)

- 1.12.2008-31.12.2008:

Praktikum bei der Lebensmittelversuchsanstalt Wien

o Aufgaben:

- Probenvorbereitung und Logistik
- Probenhomogenisierung
- Extraktion von Obst- und Gemüseproben sowie von Blattproben zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen
- Extraktion von Getreideproben zur Bestimmung von Mykotoxinen

Wien, im Dezember 2009