

**Kombination analytischer Strategien und  
multivariater Datenanalysen zur Beurteilung von  
Milch- und Molkereierzeugnissen  
am Beispiel Schmelzkäse**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Uta Schwietzke  
geboren am 06. Dezember 1979 in Karl-Marx-Stadt

eingereicht am: 30.11.2011

Tag der Disputation: 12.04.2012

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2007 bis September 2011 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie angefertigt.



Wissenschaft wird immer eine Suche sein, niemals wirklich eine Entdeckung. Es ist eine Reise, niemals wirklich eine Ankunft.

Karl Popper (britischer Philosoph, 1902-1994)



## **TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT:**

### **Originalbeiträge:**

SCHWIETZKE, U.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T. (2009). Influence of cheese type and maturation time on the early Maillard reaction in cheese. *Czech J. Food Sci.* 27, S140 - S142

SCHWIETZKE, U.; MALINOWSKI, J.; ZERGE, K.; HENLE, T. (2011). Quantification of Amadori products in cheese. *Eu.r Food Res. Technol.* 233, 243 - 251

### **Poster:**

SCHWIETZKE, U.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2007). Quantifizierung von Orot- und Milchsäure in Schmelzkäsen als Marker für den Käsegehalt. Posterbeitrag im Rahmen des „36. Deutschen Lebensmittelchemikertages“, 10.09.-12.09.2007, Erlangen / Nürnberg.

SCHWIETZKE, U.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2007). Bestimmung von Milch- und Orotsäure in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung als Markersubstanzen für den Käseanteil. Posterbeitrag im Rahmen der „Milchkonferenz 2007“, 17./18.09.2007, Wien / Österreich.

SCHWIETZKE, U.; MALINOWSKI, J.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2008). Formation of furosine and  $\alpha$ -N-(2-furoylmethyl) amino acids during the ripening of Chester cheese. Posterbeitrag im Rahmen des „5th IDF Symposium on Cheese Ripening“; 09.03.-13.03.2008, Bern / Schweiz.

SCHWIETZKE, U.; MALINOWSKI, J.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2008). Untersuchungen zur Bildung von Furosin und  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren während der Reifung von Chesterkäse. Posterbeitrag im Rahmen des „37. Deutschen Lebensmittelchemikertages“, 08.09.-10.09.2008, Kaiserslautern.

SCHWIETZKE, U.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T. (2009). Influence of cheese type and maturation time on the early Maillard reaction in cheese. Posterbeitrag im Rahmen der „Conference Chemical reaction in foods VI“, 13.05.-15.05.2009, Prag / Tschechien.

SCHWIETZKE, U.; ZERGE, K.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2009). Untersuchung von Amadori-Produkten während der Reifung von Camembert. Posterbeitrag im Rahmen des „38. Deutschen Lebensmittelchemikertages“, 14.09.-16.09.2009, Berlin.

SCHWIETZKE, U.; ZERGE, K.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; (2009). Untersuchungen zur frühen Maillard-Reaktion in Käse: Einfluss von Reifung und Käsesorte. Posterbeitrag im Rahmen der „Milchkonferenz 2009“, 17./18.09.2009, Wien / Österreich.

SCHWIETZKE, U.; NECULA, S.S.; HENLE, T.; (2010). Bestimmung von Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und  $\kappa$ -Casein in Schmelzkäse. Posterbeitrag im Rahmen des „39. Deutschen Lebensmittelchemikertages“, 20.09.-22.09.2009, Stuttgart-Hohenheim.

SCHWIETZKE, U.; NECULA S.S.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE T. (2011). Quantification of caseinomacropeptide, para- $\kappa$ -casein and  $\kappa$ -casein in processed cheese. Posterbeitrag im Rahmen der „Milchkonferenz 2011“, 12. / 13.09.2011, Bern / Schweiz

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Milch- und Molkereizeugnisse.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Begriffsklärung und lebensmittelrechtliche Einordnung.....	3
2.1.2	Ernährungsphysiologische und gesundheitliche Aspekte der Milch.....	4
2.1.3	Trends am deutschen Milchmarkt .....	5
<b>2.2</b>	<b>Schmelzkäse .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Definition und lebensmittelrechtliche Einordnung .....	7
2.2.2	Entwicklungen am deutschen Schmelzkäsemarkt.....	9
2.2.3	Grundlagen der Schmelzkäseherstellung .....	11
2.2.4	Charakteristika der Rohwaren und deren Einfluss auf die Schmelzkäse-matrix... 14	
2.2.4.1	Schmelzrohware .....	15
2.2.4.2	Schmelzsalze .....	20
2.2.4.3	Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweißerzeugnisse.....	22
<b>2.3</b>	<b>Analytische Marker zur Kompositionsermittlung von Schmelzkäse.....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Hauptinhaltsstoffe, Mineralstoffe und organische Säuren.....	26
2.3.2	Caseine und Molkenproteine.....	28
2.3.2.1	Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und $\kappa$ -Casein .....	30
2.3.3	Ermittlung des Proteolysegrades .....	33
2.3.4	Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen und deren Rolle zur kompositionellen Ermittlung von Schmelzkäse.....	34
2.3.4.1	Die Maillard-Reaktion im Überblick.....	34
2.3.4.2	Bedeutung der frühen Phase der Maillard-Reaktion in Milcherzeugnissen .	36
<b>2.4</b>	<b>Multivariate Analyseverfahren .....</b>	<b>41</b>
2.4.1	Clusteranalyse .....	42
2.4.2	Korrelationsanalyse.....	43
2.4.3	Varianzanalyse .....	43
2.4.4	Faktorenanalyse.....	44
2.4.5	Diskriminanzanalyse .....	44
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Materialien und Gerätschaften .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Materialien .....	47
3.2.2	Gerätschaften.....	48

<b>3.3</b>	<b>Untersuchungsmaterialien</b> .....	<b>50</b>
3.3.1	Käse .....	50
3.3.1.1	Handelsübliche Käse .....	51
3.3.1.2	Käse der Reifungsstudien .....	53
3.3.2	Schmelzkäse .....	54
3.3.2.1	Handelsübliche Schmelzkäseproben .....	54
3.3.2.2	Schmelzkäsemuster variierender Proteinzusatzbeimischung .....	59
3.3.3	Milcheiweißerzeugnisse .....	61
3.3.4	Trockenmagermilch- und Trockenmolkeerzeugnisse .....	61
3.3.5	Allgemeine Probenvorbereitung und Lagerung .....	62
<b>3.4</b>	<b>Reifungsstudien an Käsen</b> .....	<b>62</b>
<b>3.5</b>	<b>Analytische Methoden</b> .....	<b>62</b>
3.5.1	Methoden zur Ermittlung der Trockenmasse .....	62
3.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes mittels Kjeldahl .....	64
3.5.3	Analytik ausgewählter Zuckerkomponenten .....	64
3.5.4	Enzymatische Bestimmung von Milchsäure .....	66
3.5.5	Quantifizierung von Orotsäure mittels RP-HPLC .....	67
3.5.6	Potentiometrische Analyseverfahren .....	68
3.5.7	Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen .....	70
3.5.8	Nicht-Protein-Stickstoff und wasserlöslicher Stickstoff .....	73
3.5.9	Aminosäureanalyse .....	74
3.5.10	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	76
3.5.11	Bestimmung von Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein mittels RP-HPLC .....	79
3.5.12	Bestimmung des Cystinwertes .....	82
3.5.13	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	83
3.5.14	Sensorische Untersuchungen .....	84
3.5.15	Kopplung HPLC-Massenspektrometrie .....	85
3.5.15.1	$\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren .....	85
3.5.15.2	Caseinomakropeptid und Milchproteine .....	85
3.5.16	Fettbestimmung nach der Röse – Gottlieb – Methode .....	86
<b>3.6</b>	<b>Darstellung und Isolierung von Referenzsubstanzen</b> .....	<b>86</b>
3.6.1	Synthese von $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren .....	86
3.6.2	Isolierung von Säurecasein .....	87
3.6.3	Isolierung von $\kappa$ -Casein .....	87
3.6.4	Isolierung von Caseinomakropeptid und para- $\kappa$ -Casein .....	89
<b>3.7</b>	<b>Chemometrische Verfahren</b> .....	<b>91</b>
3.7.1	Univariate Statistik .....	91
3.7.2	Multivariate Statistik .....	92

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Übersicht zu den analytischen Einzelkomponenten .....</b>	<b>95</b>
4.1.1	Hauptinhaltsstoffe, Mineralstoffe und organische Säuren .....	95
4.1.1.1	Hauptinhaltsstoffe .....	95
4.1.1.2	Mineralstoffe .....	100
4.1.1.3	Organische Säuren.....	103
4.1.2	Caseine, Molkenproteine und Proteolyseparameter .....	108
4.1.2.1	Caseine.....	108
4.1.2.2	Molkenproteine.....	114
4.1.2.3	Proteolyseparameter .....	117
<b>4.2</b>	<b>Caseinomakropeptid und intaktes <math>\kappa</math>-Casein in Milchprodukten.....</b>	<b>123</b>
4.2.1	Isolierung und Charakterisierung der Standardmaterialien .....	123
4.2.2	Etablierung analytischer Methoden zur Bestimmung von Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und intaktem $\kappa$ -Casein in Milchprodukten .....	130
4.2.2.1	Optimierung der enzymatischen Hydrolyse .....	131
4.2.2.2	Chromatographische Bestimmung von Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein in Milchprodukten .....	135
4.2.2.3	Elektrophoretische Bestimmung von para- $\kappa$ -Casein und $\kappa$ -Casein in Milchprodukten .....	142
4.2.3	Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein – Analytische Messgrößen zur Ermittlung der q Rezeptur von Schmelzkäsen.....	144
<b>4.3</b>	<b>Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen.....</b>	<b>149</b>
4.3.1	Synthese und Charakterisierung der Referenzsubstanzen .....	149
4.3.2	Amadori-Produkte in Schmelzkäsen und Schmelzrohwaren .....	153
4.3.2.1	Einflüsse auf den Amadori-Produktgehalt in Schmelzkäsen.....	160
4.3.3	Amadori-Produkte in Käsen – Einfluss von Reifung und Käsesorte .....	164
4.3.3.1	Marktanalyse .....	166
4.3.3.2	Reifungsexperimente .....	172
4.3.4	Zusammenfassung der Untersuchungen von Amadori-Produkten in Milchprodukten .....	179
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassung der univariaten Statistik – Möglichkeiten und Grenzen ...</b>	<b>180</b>
<b>4.5</b>	<b>Analyse der Messparameter mittels multivariater Analyseverfahren.....</b>	<b>184</b>
4.5.1	Clusteranalyse .....	185
4.5.2	Messvariablenreduktion mittels Korrelations- und Varianzanalyse.....	192
4.5.2.1	Korrelationsanalyse .....	192

4.5.2.2	Varianzanalyse.....	194
4.5.3	Faktorenanalyse.....	196
4.5.4	Diskriminanzanalyse .....	201
4.5.5	Zusammenfassung der multivariaten Datenanalyse.....	206
<b>4.6</b>	<b>Analysestrategie und Modell-Berechnungen.....</b>	<b>208</b>
4.6.1	Strategische Überlegungen zur Analyse einer unbekannt Probe .....	208
4.6.2	Modell-Berechnung.....	210
<b>4.7</b>	<b>Orientierende sensorische und mikroskopische Studien .....</b>	<b>214</b>
<b>5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>222</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>223</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>226</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>245</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

In diesem Verzeichnis nicht aufgeführt sind:

- im DUDEN zu findende Abkürzungen
- SI-Einheiten, deren Symbole sowie Zeichen und Kürzel aus mathematischen Formeln.

AA	Acrylamid
abs.	absolut
AP	Amadori-Produkt
AS	Aminosäuren
ASA	Aminosäureanalyse/-analysator
$a_w$ -Wert	Wasseraktivität
bidest.	bidestilliert
$\beta$ -Gal-DH	$\beta$ -Galactosidase-Dehydrogenase
CLA	conjugated linolic acid (konjugierte Linolsäure)
CML	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin
CN	Casein
DTT	Dithiothreitol
dest.	destilliert
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
E160b	Beta-Carotin (Farbstoff)
E160b	Annatto (Farbstoff)
E200 / E202 / E235 / E251 E1105	Konservierungsstoffe (Sorbinsäure, Kaliumsorbat, Natamycin, Natriumnitrat, Lysozym)
E330 / E331 / E339 / E341 E450 / E451 / E452	Schmelzsalze (Citronensäure, Natriumcitrat, Natriumphosphat, Calciumphosphat, Diphosphate, Triphosphate, Polyphosphate)
E407 / E410	Dickungsmittel / Stabilisator (Carrageen, Johannisbrotkernmehl)
E500	Säureregulator (Natriumcarbonat)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMC	enzymatic modified cheese
Fakt.	Faktor
FK	Friskäse
FMAS	N <sup>α/ε</sup> -(2-Furoylmethyl)-aminosäuren
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
CMP	Caseinomakropeptid

HK	Hartkäse
HS	Hauptinhaltsstoffe
ISE	ionenselektive Elektrode
i.d.R.	in der Regel
i. Tr.	in der Trockenmasse
K	Käse (speziell für Schnittkäse)
KäseV	Käseverordnung
KFT	Karl-Fischer-Titration
konz.	konzentriert
LA	$\alpha$ -Lactalbumin
LAB	lactic acid bacteria (Milchsäurebakterien)
LC	Labcasein
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittel-gesetzbuch
LG	$\beta$ -Lactoglobulin
MilchErzV	Milcherzeugnisverordnung
mind.	mindestens
MMP	Magermilchpulver
MP	Molkenpulver
MPC	Milchproteinkonzentrat
MPr	Molkenproteine
MR	Maillard-Produkte
MS	Mineralstoffe
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
n.b.	nicht bestimmbar
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy
n.n.	nicht nachweisbar
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff
OPA	o-Phthaldialdehyd
OS	organische Säuren
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
past.	pasteurisiert
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCA	Perchlorsäure
PER	Ammoniumperoxodisulfat
PKK	Pearson Korrelationskoeffizient
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Proteolyseparameter

PS	Polystyrol
R	Käse der Reifungsexperimente
rec.	recombinant
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SC	Säurecasein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SK	Schmelzkäse
SMK	Sauermilchkäse
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamin
therm.	thermischer
TM	Trockenmasse
UV	Detektion im ultravioletten Bereich
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche dazu
WK	Weichkäse
WLN	wasserlöslicher Stickstoff
z.A. / p.a.	zur Analyse

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 2.1</b>	Darstellung der jährlich in Deutschland produzierten Menge (A) und dem Pro-Kopf verzehrtem Anteil (B) an Milch- und Molkereierzeugnissen aufgeteilt nach weißem und gelbem Sortiment. ....	5
<b>Abb. 2.2</b>	Darstellung der jährlich in Deutschland von 1999 bis 2009 produzierten Menge an Schmelzkäseprodukten. ....	10
<b>Abb. 2.3</b>	Fließschema zur Schmelzkäseherstellung. ....	11
<b>Abb. 2.4</b>	Rohstoffe zur Herstellung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen. ....	14
<b>Abb. 2.5</b>	Schematische Einteilung der Käsesorten. ....	15
<b>Abb. 2.6</b>	Fließschema zur Labkäseherstellung. ....	16
<b>Abb. 2.7</b>	Bildungswege charakteristischer Aromastoffe in Käsen während der Reifung ausgehend von Caseinen, Triglyceriden und Lactose. ....	
<b>Abb. 2.8</b>	Wirkmechanismen von Schmelzsalzen während des Schmelzprozesses am Bsp. von Di-Natriumhydrogenphosphat. ....	21
<b>Abb. 2.9</b>	Darstellung der gewählten analytischen Kenngrößen zur Ermittlung der Zusammensetzung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen. ....	26
<b>Abb. 2.10</b>	Strukturformeln organischer Säuren. ....	27
<b>Abb. 2. 11...</b>	Primärstruktur des $\kappa$ -Caseins A-1P	31
<b>Abb. 2. 12</b>	Bildung von Amadori-Produkten am Beispiel der 1-Amino-1-desoxyfructose	35
<b>Abb. 2.13</b>	Darstellung des nach saurer Hydrolyse aus dem Amadori-Produkt Fructoselysin gebildeten Produktspektrums. ....	36
<b>Abb. 2.14</b>	Strukturformeln der von Penndorf et al. in hypoallergener Säuglingsnahrung quantifizierten $N^{\alpha}$ -(2-Furoylmethyl)-aminosäuren. ....	40
<b>Abb. 2.15</b>	Einteilung der Multivariaten Analysemethoden. ....	41
<b>Abb. 4.1</b>	Darstellung der gewählten analytischen Kenngrößen zur Ermittlung der kompositionellen Analyse von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen. ....	93
<b>Abb. 4.2</b>	<b>links oben:</b> Proteingehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> Trockenmasse von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker 5 % / 95 %) ....	98
<b>Abb. 4.3</b>	Lactosegehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker 5 % / 95 %) ....	99
<b>Abb. 4.4</b>	<b>links oben:</b> Calciumgehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> Kaliumgehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) ....	102
<b>Abb. 4.5</b>	RP-HPLC mit UV-Detektion bei 290 nm zur Orotsäurebestimmung in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. ....	104
<b>Abb. 4.6</b>	<b>links oben:</b> Milchsäuregehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> Orotsäuregehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) ....	105
<b>Abb. 4.7</b>	SDS-PAGE (4-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung von Caseinen, Molkenproteinen und Peptiden in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. ....	109

<b>Abb. 4.8 links oben:</b> Intaktes Casein von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %)- <b>rechts oben:</b> Peptid-Gehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelz käseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / Whisker 5 % / 95 %) .....	111
<b>Abb. 4.9</b> Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Cysteinsäurebestimmung in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung.....	114
<b>Abb. 4.10 oben:</b> Cystinwerte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung, Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 % .....	116
<b>Abb. 4.11</b> Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung.....	118
<b>Abb. 4.12 links oben:</b> NPN von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelz käseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> WLN von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelz käseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) .....	119
<b>Abb. 4.13 oben:</b> Summenparameter der freien Aminosäuren in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker 5 % / 95 %).....	122
<b>Abb. 4.14</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zur Charakterisierung von isoliertem Säurecasein und daraus gewonnenem $\kappa$ -Casein mittels einer PLRP-S Phase. ....	125
<b>Abb. 4.15 A)</b> SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Reinheit von isoliertem Säurecasein (SC) und $\kappa$ -Casein. <b>B)</b> SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion von Rohmilch (1) und Molkenpulver (2). ....	126
<b>Abb. 4.16</b> LC-MS Chromatogramm mit UV-Detektion bei 226 nm zur Charakterisierung des isolierten $\kappa$ -CN-Standards. Darstellung des zugehörigen Massenspektrums (links oben) sowie UV-Spektrums (rechts oben). ....	127
<b>Abb. 4.17</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm / 280 nm zur Charakterisierung von isoliertem CMP mittels einer PLRP-S Phase.....	128
<b>Abb. 4.18</b> Darstellung der Massenspektren von isoliertem CMP: <b>links)</b> genetische Variante CMP-A sowie <b>rechts)</b> genetische Variante des CMP-B ermittelt mittels LC-MS.....	128
<b>Abb. 4.19</b> SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Reinheit von isoliertem para- $\kappa$ -Casein. ....	130
<b>Abb. 4.20</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von Milch mit Labferment (PLRP-S Phase). ....	131
<b>Abb. 4.21</b> Peakflächen der CMP A / B sowie glycosylierten CMP nach Behandlung von Milchproben mit Labferment im Zeitraum von 5 min bis 24 h. ....	133
<b>Abb. 4.22 links)</b> SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der para- $\kappa$ -Casein in Labferment behandelten Milchproben. <b>rechts)</b> % Anteil an para- $\kappa$ -Casein ermittelt nach densitometrischer Auswertung .....	134
<b>Abb. 4.23</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich der enzymatischen Hydrolyse von Milch mit Labferment bzw. Chymosin (PLRP-S Phase). ....	135
<b>Abb. 4.24</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich von Schmelzkäsematrices mit und ohne Zusatz an Molkenpulver.....	136
<b>Abb. 4.25</b> Darstellung der, in den mit 0 % bis 10 % Molkenpulver versetzten Schmelzkäsen, ermittelten Peakflächenanteile an CMP A sowie CMP B.....	137
<b>Abb. 4.26</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich einer mit 10 % SC-versetzten Schmelzkäseprobe vor und nach enzymatischer Behandlung mit Labferment.....	138
<b>Abb. 4.27</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich von Schmelzkäsematrices mit und ohne Zusatz an Säurecasein. ....	139
<b>Abb. 4.28</b> Darstellung der nach enzymatischer Hydrolyse mit Labferment, in den mit 0 % bis 10 % Säurecasein versetzten Schmelzkäsen, ermittelten Peakflächenanteile an CMP A sowie CMP B. ....	140
<b>Abb. 4.29</b> RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich zweier Käsematrices vor und nach enzymatischer Behandlung mit Labferment. ....	141

<b>Abb. 4.30</b>	SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Gehalte an $\kappa$ -Casein und para- $\kappa$ -Casein in Schmelzkäsen mit variierendem Säurecasein-Zusatz (0 % bis 10 %). <b>links)</b> vor Labfermentbehandlung <b>rechts)</b> nach Labfermentbehandlung.....	143
<b>Abb. 4.31</b>	Darstellung des prozentualen Anteiles an $\kappa$ -Casein und para- $\kappa$ -Casein ermittelt nach densitometrischer Auswertung der in <b>Abb. 4. 30</b> dargestellten Schmelzkäse mit variierenden Gehalten an Säurecasein. ....	144
<b>Abb. 4.32</b>	<b>links oben:</b> Caseinomakropeptid in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> Gehalte an $\kappa$ -Casein in Schmelzkäsen zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %).....	145
<b>Abb. 4.33</b>	Verteilung der absoluten und relativen Häufigkeit an Caseinomakropeptid innerhalb der untersuchten kommerziellen Schmelzkäse. ....	146
<b>Abb. 4.34</b>	Verteilung der absoluten und relativen Häufigkeit an $\kappa$ -Casein innerhalb der untersuchten kommerziellen Schmelzkäse.....	148
<b>Abb. 4.35</b>	LC-MS Chromatogramme mit UV-Detektion bei 280 nm zur Charakterisierung der synthetisierten Standards $\alpha$ -FM-Lys, $\alpha$ -FM-Val, $\alpha$ -FM-Ile und $\alpha$ -FM-Leu. ....	150
<b>Abb. 4.36</b>	Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von $\alpha$ -FM-Isoleucin ermittelt mittels LC-MS. ....	150
<b>Abb. 4.37</b>	Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von $\alpha$ -FM-Lysin ermittelt mittels LC-MS. ....	151
<b>Abb. 4.38</b>	Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von $\alpha$ -FM-Valin ermittelt mittels LC-MS. ....	151
<b>Abb. 4.39</b>	Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von $\alpha$ -FM-Leucin ermittelt mittels LC-MS. ....	151
<b>Abb. 4.40</b>	Umsatzraten von $\alpha$ -FM-Ile, $\alpha$ -FM-Leu und $\alpha$ -FM-Lys in Abhängigkeit der Reaktionszeit. ....	152
<b>Abb. 4.41</b>	RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von $\alpha$ -FM-Lysin und $\epsilon$ -FM-Lysin (Furosin) in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung mittels einer RP-8 Phase. ....	154
<b>Abb. 4.42</b>	RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von $\alpha$ -FM-Isoleucin und $\alpha$ -FM-Leucin in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung mittels einer RP-18 Phase.....	155
<b>Abb. 4.43</b>	<b>links oben:</b> $\epsilon$ -AP vom Lysin in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %) <b>rechts oben:</b> Summenparameter der $\alpha$ -AP von Isoleucin und Leucin in käseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker 5 % / 95 %) .....	158
<b>Abb. 4.44</b>	Vergleich der analytisch ermittelten und theoretisch berechneten $\alpha$ - und $\epsilon$ -AP Gehalte (Summenparameter der $\alpha$ -AP aus Lysin, Isoleucin und Leucin) in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen mit Zusatz an Molkenpulver (MP). ....	161
<b>Abb. 4.45</b>	Vergleich der analytisch ermittelten und theoretisch berechneten $\alpha$ - und $\epsilon$ -AP Gehalte (Summenparameter der $\alpha$ -AP aus Lysin, Isoleucin und Leucin) in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen mit Zusatz an Säurecasein (SC). ....	161
<b>Abb. 4.46</b>	RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von $\alpha$ -FM-Lysin und $\epsilon$ -FM-Lysin (Furosin) in Käsen mittels einer RP-8 Phase. ....	165
<b>Abb. 4.47</b>	RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von $\alpha$ -FM-Valin, $\alpha$ -FM-Isoleucin und $\alpha$ -FM-Leucin Käsen mittels einer RP-18 Phase.....	166
<b>Abb. 4.48</b>	Amadori-Produkte in verschiedenen Käsesorten. <b>A)</b> $\epsilon$ -AP von Lysin in Käsen klassiert in 5 Gruppen basierend auf den Herstellungsverfahren. <b>B)</b> Summenparameter von vier $\alpha$ -AP (Lysin, Valin, Isoleucin und Leucin) in Käsesorten klassiert in 5 Gruppen basierend auf den Herstellungsverfahren. .	168
<b>Abb. 4.49</b>	Amadori-Produkte in vier unterschiedlich lang gereiften Gouda-Käsen.....	172
<b>Abb. 4.50</b>	Verfolgung des Reifungsverlaufes in Käsen mittels SDS-PAGE.....	173

<b>Abb. 4.51</b>	Verfolgung der Reifung in Käsen mittels Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Bestimmung der freien Aminosäuren. ....	174
<b>Abb. 4.52</b>	Bildung von freien Aminosäuren, NPN (Nicht-Protein-Stickstoff) und WLN (wasserlöslicher Stickstoff) im Verlauf der Reifung von 5 kommerziell erhältlichen Käsesorten. ....	175
<b>Abb. 4.53</b>	Amadori-Produkte in 4 gelagerten Käsen verschiedener Sorten. ....	177
<b>Abb. 4.54</b>	Entwicklung der Quotienten aus $\alpha$ - zu $\epsilon$ -AP der untersuchten Käse während des Reifungsexperimentes in Abhängigkeit zum absoluten Käsealter. ....	178
<b>Abb. 4.55</b>	Mittelwerte ausgewählter analytischer Messgrößen der Schmelzkäse-Rohwaren, Käse (24), Magermilchpulver (5), Molkenpulver (6), Milchproteinkonzentrat (2), Säurecasein (5) und Labcasein (4) im Vergleich zu Schmelzkäse (60). ....	181
<b>Abb. 4.56</b>	Ermittlung der optimalen Clusteranzahl für die hierarchische Clusteranalyse der handelsüblichen Schmelzkäse anhand des Elbow-Verfahrens. ....	186
<b>Abb. 4.57</b>	Dendrogramm des Ward-Verfahren zur Verdeutlichung der Fusionierung der handelsüblichen Schmelzkäseproben. ....	187
<b>Abb. 4.58</b>	Dendrogramm des Ward-Verfahren zur Verdeutlichung der Fusionierung der untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. ....	190
<b>Abb. 4.59</b>	Darstellung des Scree-Tests und des Kaiser-Kriteriums zur Ermittlung der optimalen Anzahl an Faktorextraktionen. ....	198
<b>Abb. 4.60</b>	Positionierung der analysierten Schmelzkäse anhand der graphischen Darstellung der Faktorwerte. ....	199
<b>Abb. 4.61</b>	Kombinierte Darstellung der gruppierten 50 Schmelzkäse in der Diskriminanzebene. ....	204
<b>Abb. 4.62</b>	Kombinierte Darstellung der gruppierten 50 Schmelzkäse (basierend auf dem enthaltenen Käseanteil) sowie der 10 ungruppierten Proben in der Diskriminanzebene. ....	204
<b>Abb. 4.63</b>	Zuordnung der Variablen zu den übergeordneten Faktoren. ....	207
<b>Abb. 4.64</b>	Darstellung einer Aufwand-Nutzen-Analyse der verbleibenden analytischen Messgrößen zur Bestimmung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen. ....	209
<b>Abb. 4.65</b>	Darstellung der Reihenfolge und Aussagekraft der durchzuführenden analytischen Methoden zur Ermittlung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen mittels eines Entscheidungsbaums. ....	210
<b>Abb. 4.66</b>	SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung von Caseinen, Molkenproteinen und Peptiden in exemplarisch ausgewählten Schmelzkäsen (SK56 und SK3). ....	211
<b>Abb. 4.67</b>	Rasterelektronische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 80 % Anteil an Käserohware und ohne zugesetztes Casein oder Molkenprotein. ....	216
<b>Abb. 4.68</b>	Rasterelektronische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 56 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Säurecasein. ....	216
<b>Abb. 4.69</b>	Rasterelektronische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 53 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Magermilchpulver. ....	217
<b>Abb. 4.70</b>	Rasterelektronische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 53 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Molkepulverpulver. ....	217
<b>Abb. 4.71</b>	Profilprüfung der analysierten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Anteilen an Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen nach DIN 10967-1:1999-10. ....	219
<b>Abb. 4.72</b>	Hedonischer Test der analysierten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Anteilen an Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen. ....	220
<b>Abb. 8.1</b>	Einfluss der Herstellungstemperatur auf die Gehalte an $\alpha$ -AP in Modell-Schmelzkäsen. ....	249
<b>Abb. 8.2</b>	Einfluss der Herstellungszeit bei konstanter Temperatur (80°C) auf die Gehalte an $\alpha$ -AP in Modell-Schmelzkäsen. ....	249

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 2.1</b>	Zusammenstellung ausgewählter Inhaltsstoffe von Milch und Milchprodukten mit deren beschriebenen gesundheitsfördernden Wirkungen. ....	6
<b>Tab. 2.2</b>	Chemisch-physikalische Vorgänge während des Schmelzprozesses, die zur Beeinflussung der resultierenden Schmelzkäseprodukte. ....	13
<b>Tab. 2.3</b>	Proteinfractionen der Kuhmilch. ....	29
<b>Tab. 2.4</b>	Übersicht zu Furosingehalten in Milch- und Milcherzeugnissen als Marker der frühen Phase der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln. ....	38
<b>Tab. 2.5</b>	Übersicht zu N <sup>α</sup> -(2-Furoylmethyl)-aminosäuren (α-FMAS) in Lebensmitteln. ....	40
<b>Tab. 2.6</b>	Übersicht zu ausgewählten Maillard-Reaktionsprodukten der fortgeschrittenen und finalen Phase in Käsen. ....	41
<b>Tab. 3.1</b>	Auflistung der, auf alle 55 Parameter hin, untersuchten handelsüblichen Käse. ....	51
<b>Tab. 3.2</b>	Auflistung weiterer für die Bestimmung von Furoylmethylaminosäuren eingesetzter handelsüblichen Käse. ....	52
<b>Tab. 3.3</b>	Übersicht der zu Reifungsstudien (3.4) eingesetzten Käse. ....	53
<b>Tab. 3.4</b>	Auflistung der, auf alle 55 Parameter hin, untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse. ....	54
<b>Tab. 3.5</b>	Übersicht der zur REM und Sensorik eingesetzten Schmelzkäse variierender Proteinzusatzbeimischungen. ....	59
<b>Tab. 3.6</b>	Auflistung der, auf alle 55 Parameter hin, untersuchten Schmelzkäse variierender Proteinzusatzbeimischungen. ....	60
<b>Tab. 3.7</b>	Übersicht der, auf alle 55 beschriebenen Parameter, hin untersuchten Labcasein- und Säurecaseinproben. ....	61
<b>Tab. 3.8</b>	Übersicht der auf alle 55 beschriebenen Parameter hin untersuchten Trockenmagermilch-, Trockenmolkeerzeugnisse und Milchproteinkonzentrate. ....	61
<b>Tab. 3.9</b>	Messparameter der KFT – Gerätetyp KF 701 Titrino. ....	63
<b>Tab. 3.10</b>	Pipettierschema des enzymatischen Tests zur Lactosebestimmung. ....	65
<b>Tab. 3.11</b>	Pipettierschema des enzymatischen Tests zur Milchsäurebestimmung. ....	66
<b>Tab. 3.12</b>	Trennprogramm zur Bestimmung von Orotsäure in Milchprodukten mittels RP-HPLC. ....	70
<b>Tab. 3.13</b>	Messparameter des 702 SM Titrino zur Ca-Bestimmung mittels Cu-ISE. ....	71
<b>Tab. 3.14</b>	Messparameter des 702 SM Titrino zur Kaliumbestimmung mittels K-ISE. ....	68
<b>Tab. 3.15</b>	Einwaagen zur sauren Hydrolyse. ....	71
<b>Tab. 3.16</b>	Schema der Festphasenextraktion zur Analytik von Furosin, α-FM-Alanin und α-FM-Lysin. ....	71
<b>Tab. 3.17</b>	Trennprogramm zur Bestimmung von Furosin, α-FM-Alanin und α-FM-Lysin in Milchprodukten. ....	72
<b>Tab. 3.18</b>	Trennprogramm zur Bestimmung von α-FM-Isoleucin, α-FM-Valin und α-FM-Leucin in Milchprodukten. ....	73

<b>Tab. 3.19</b>	Eingesetzte Probenmengen, Volumina Citratpuffer sowie Injektionsvolumen zur Bestimmung der freien Aminosäuren mittels ASA. ....	75
<b>Tab. 3.20</b>	Puffer für die Aminosäureanalyse .....	75
<b>Tab. 3.21</b>	Trennprogramm zur Bestimmung der freien Aminosäuren mittels ASA. ....	76
<b>Tab. 3.22</b>	Zusammenstellung der zur SDS-PAGE benötigten Reagenzien und Molmassenmarker. ....	77
<b>Tab. 3.23</b>	Herstellung eines Gradientengels (10-20% AA) für die SDS-PAGE. ....	78
<b>Tab. 3.24</b>	Bedingungen der Optimierungsstudien zum Vergleich der enzymatischen Hydrolyse mit Labferment und Chymosin für Säurecasein- bzw. Milchproben. ....	80
<b>Tab. 3.25</b>	Reaktionsbedingungen der optimierten enzymatischen Hydrolyse mit Labferment für Käse, Schmelzkäse und die analysierten Proteinzusätze. ....	80
<b>Tab. 3.26</b>	Trennprogramm zur Analytik des Caseinomakropeptidgehalts in Milchprodukten mittels RP-HPLC. ....	81
<b>Tab. 3.27</b>	Trennprogramm zur Bestimmung des Cystinwertes mittels ASA. ....	83
<b>Tab. 3.28</b>	Syntheseansätze der $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren. ....	86
<b>Tab. 3.29</b>	Reaktionsbedingungen der enzymatischen Hydrolyse mit Labferment zur Isolierung von Caseinomakropeptid. ....	90
<b>Tab. 4.1</b>	Vergleich ausgewählter chemischer Parameter, der aus pasteurisierter und Rohmilch, isolierter Säurecaseine. ....	124
<b>Tab. 4.2</b>	Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von isoliertem CMP mit Literaturwerten zu CMP A bzw. CMP B gefunden. ....	129
<b>Tab. 4.3</b>	Analytisch ermittelte Kenngrößen (Retentionszeit, $\lambda_{\max}$ , m/z) der synthetisierten vier FMAS Standards .....	152
<b>Tab. 4.4</b>	Lactosegehalte der untersuchten Modell-Schmelzkäse mit Molkenpulver- und Säurecasein-Zusatz. ....	162
<b>Tab. 4.5</b>	Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der $\alpha$ -AP (Summenparameter aus Lysin, Leucin und Isoleucin) sowie $\epsilon$ -AP der untersuchten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Gehalten (0 bis 10 %) an Proteinzusätzen im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freier Aminosäuren. ....	163
<b>Tab. 4.6</b>	Spannweiten der Amadori-Produkte der 42 untersuchten Käse .....	169
<b>Tab. 4.7</b>	Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der AP des Lysins, Valins, Leucins und Isoleucins von 42 kommerziell erworbenen Käsen im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freier Aminosäuren. ....	171
<b>Tab. 4.8</b>	Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der AP des Lysins, Valins, Leucins und Isoleucins der 5 untersuchten Käsen der Reifungsstudie im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freier Aminosäuren. ....	179
<b>Tab. 4.9</b>	Zuordnung der gewählten Messgrößen zu den jeweils charakterisierenden Schmelzkäse-Rohwaren Käse, Magermilchpulver, Molkenpulver und Milcheiweißerzeugnisse .....	182
<b>Tab. 4.10</b>	Zuordnung der untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse zu den ermittelten Clustern. ....	186
<b>Tab. 4.11</b>	Charakterisierung der Homogenität der Cluster und Interpretation der Cluster anhand der F- und t-Werte. ....	188
<b>Tab. 4.12</b>	Zuordnung der untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung zu den ermittelten Clustern sowie die Charakterisierung der Homogenität der Cluster und deren Interpretation anhand der F- und t-Werte. ....	191
<b>Tab. 4.13</b>	Unterteilung der Messgrößen nach thematischen Schwerpunkten. ....	193
<b>Tab. 4.14</b>	Darstellung der erhöhten Korrelationen zwischen Messgrößen der untersuchten Schmelzkäse. ....	194
<b>Tab. 4.15</b>	Ergebnisse der Varianzanalyse und Variablenreduktion der untersuchten Schmelzkäseproben. ....	195

<b>Tab. 4.16</b>	Extrahierte Faktoren mit Eigenwerten und Varianzklärungsanteil der Hauptkomponentenanalyse der Faktorenanalyse.....	197
<b>Tab. 4.17</b>	Ergebnisse der Varimax-rotierten Faktorenmatrix (Rotation in 5 Iterationen konvergiert) mit Kaiser-Normalisierung der Hauptkomponenten-Faktorenanalyse.....	199
<b>Tab. 4.18</b>	Auflistung der Faktorwerte aller analysierten handelsüblichen Schmelzkäse (3 Faktorlösung).....	200
<b>Tab. 4.19</b>	Unterteilung der Schmelzkäse nach dem enthaltenen Anteil an deklariertes Käserohware und Darstellung der sich ergebenden Gruppenstatistik.....	202
<b>Tab. 4.20</b>	Auflistung der fünf ermittelten kanonischen Diskriminanzfunktionen und deren Koeffizienten.....	203
<b>Tab. 4.21</b>	Extrahierte Funktionen mit Eigenwerten und Varianzklärungsanteil der Diskriminanzanalyse.....	203
<b>Tab. 4.22</b>	Klassifikationsmatrix.....	205
<b>Tab. 4.23</b>	Vergleich der rechnerisch ermittelten Anteile an proteinhaltigen Rohwaren in Schmelzkäseerzeugnissen mit den theoretisch enthaltenen Mengen laut Verpackung.....	213
<b>Tab. 8.1</b>	Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE.....	245
<b>Tab. 8.2</b>	Hedonisches Bewertungsschema.....	248
<b>Tab. 8.3</b>	Überföhrungsfaktoren zur Berechnung der Amadori-Produkte als Lactulosylderivate.....	248

## 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Milch und daraus hergestellte Erzeugnisse spielen eine zentrale Rolle in der Ernährung des Menschen. Infolge einer Optimierung der molkereitechnologischen Produktionsprozesse ist eine gesteigerte Qualität sowie eine verlängerte Haltbarkeit dieser Produkte erzielt worden, wobei dies das Fundament des bis heute beständig wachsenden, vielfältigen Produktspektrums an Milch und der daraus hergestellten Erzeugnisse bildet. Die Globalisierung der Märkte sowie die in den letzten Jahren stark ansteigenden Rohstoff- und Energiekosten haben dabei zu einer erheblichen Verschärfung des Konkurrenzdrucks auch zwischen Lebensmittelproduzenten geführt. Um kostensenkend zu produzieren werden zahlreiche Massnahmen ergriffen, welche vorwiegend auf dem Ersatz von Fett- und Proteinanteilen, der Mischung von Milchsorten unterschiedlicher Spezies, dem Zusatz billiger Füllstoffe auf Milchbasis zur Ausbeuteerhöhung sowie einer falschen Deklaration von Produkten geschützter geografischer Herkunft beruhen (De la Fuente et al. 2005). Der Einfluss des globalisierten Milchmarktes macht dabei auch vor Schmelzkäseerzeugnissen und Schmelzkäsen keinen Halt. Produzenten dieser Produkte wurden infolgedessen mehr und mehr dazu verleitet, die in diesen Erzeugnissen wertgebende Rohware Käse anteilig durch günstigere Füllstoffe auf Milchbasis zu ersetzen. Neben ernährungsphysiologischen und technologischen Aspekten spielen in diesem Zusammenhang vor allem ökonomische Interessen eine entscheidende Rolle. Dem Endprodukt Schmelzkäse ist dieser Qualitätsverlust, welcher durch den Austausch von Käse-Protein durch Nicht-Käse-Protein resultiert, dabei auf den ersten Blick nicht unbedingt anzusehen. Bislang existieren auch keine einfachen analytischen Marker zur qualitativen Unterscheidung, geschweige denn quantitativen Bestimmung, dieser Rohwaren in Schmelzkäsen. Die analytischen Herausforderungen welche sich aus der vorliegenden Problemstellung ergeben, sind dabei sehr vielfältig. Nicht nur, dass alle wertgebenden Zutaten von Schmelzkäsen einem gemeinsamen Ausgangsrohstoff Milch entstammen, welcher zudem noch natürlichen Schwankungen in der Zusammensetzung unterliegt, sondern auch die in der wertgebenden Rohware Käse sorten-, reifungs- und lagerungsabhängig ablaufenden Prozesse führen zu starken Schwankungen der Zusammensetzung dieser Produkte. Wie genau die große Gruppe der Käsesorten basierend darauf chemisch charakterisiert werden kann, erscheint aus analytischer Sicht äußerst anspruchsvoll. Darüber hinaus kann eine Beeinflussung der chemischen Zusammensetzung der fertigen Schmelzkäseprodukte auch durch die während des Herstellungsprozesses herrschenden Bedingungen hervorgerufen werden. Das Ausmaß einer solchen Veränderung in handelsüblichen Schmelzkäsen ist jedoch nur schwer abschätzbar und bislang wenig

erforscht worden. Einer Irreführung und Täuschung der Verbraucher sowie einer Verzerrung des Wettbewerbs zwischen den einzelnen Schmelzkäseproduzenten ist somit Tür und Tor geöffnet. Dies wird letztlich auch durch den Gesetzgeber nicht unterbunden, da dieser die Deklaration der eingesetzten Menge und Sorte an Käse sowie der Menge an zugesetztem Proteinzusatz zur Herstellung von Schmelzkäsen und Schmelzkäseerzeugnissen nicht zwingend fordert.

Das Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit besteht somit darin, ein Analysenportfolio verschiedenster, analytischer Parameter zur Bestimmung der kompositionellen Zusammensetzung von Schmelzkäseerzeugnissen zu erarbeiten, mit deren Hilfe eine Unterscheidung der am Markt erhältlichen Produktqualitäten möglich ist. Weiterhin soll anhand der Kombination dieser analytischen Messgrößen sowie deren mathematischer Auswertung mittels multivariater Datenanalyseverfahren eine Bewertung und Priorisierung hinsichtlich deren Aussagekraft vorgenommen werden. Neben der Analyse handelsüblicher Schmelzkäse werden im Rahmen dieser Aufgabenstellung auch verstärkt die Schmelzrohwaren und Proteinzusätze sowie Modell-Schmelzkäse hinsichtlich deren chemischer Zusammensetzung charakterisiert. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Unterscheidung der Rohwaren Käse und den zum Schmelzkäseprodukt weiterhin zugesetzten Proteinpulvern auf Milchbasis. Zu diesen zählen neben den Trockenmilch- und Trockenmolkeerzeugnissen (Magermilchpulver, Milchpulverkonzentrat, Molkepulver) auch Milcheiweiß-erzeugnisse (Säure- und Labcasein). Zusammen stellen diese mengenmäßig den größten Anteil in Schmelzkäsen dar und bestimmen somit maßgeblich deren technologische und sensorische Eigenschaften und damit verbunden die Qualität und den Preis der fertigen Schmelzkäseprodukte.

## 2 THEORETISCHER TEIL

### 2.1 Milch- und Molkereierzeugnisse

Milch und daraus hergestellte Erzeugnisse spielen heutzutage eine zentrale Rolle in der Ernährung des Menschen und erfreuen sich einer stetig wachsenden Beliebtheit beim Verbraucher (Spreer 1999, Milchindustrie-Verband e.V. 2011d). Die früheste Nutzung von Milch und erster daraus hergestellter Produkte als Nahrungsmittel wurde bereits bei den Sumerern vor etwa 6000 Jahren beschrieben (Selz 2005). Eine Optimierung der molkereitechnologischen Prozesse und eine damit einhergehende verbesserte Produktqualität sowie eine verlängerte Haltbarkeit bilden heute die Basis eines stetig wachsenden, geschmacklich vielfältigen Produktspektrums an Milch und daraus hergestellter Erzeugnisse.

#### 2.1.1 Begriffsklärung und lebensmittelrechtliche Einordnung

Definiert und rechtlich geregelt werden aus Milch hergestellte Produkte in einer gesonderten Verordnung über Milcherzeugnisse (MilchErzV), in deren Sinn es sich dabei um alle, in Anlage 1 dieser Verordnung aufgeführten, Produkte handelt<sup>1</sup>. Diese werden ausschließlich aus Milch – zumeist Kuhmilch – gewonnen, wobei jedoch weitere für die Herstellung erforderliche Stoffe eingesetzt werden dürfen. Ausnahmen hierzu bilden Käse und daraus hergestellte Erzeugnisse sowie Butter, welche ebenso aus Milch gewonnen werden, aber gesondert in der Käseverordnung (KäseV)<sup>2</sup> bzw. Butterverordnung (ButtV)<sup>3</sup> geregelt sind. Im Gegensatz dazu werden im Lebensmitteleinzelhandel die in einer Molkerei aus Milch erzeugten Produkte derzeit allgemein unter dem Oberbegriff Molkereierzeugnisse zusammengefasst. Diese werden dann weiter in ein weißes Warensortiment, welches Produkte im Sinne der Milcherzeugnis-Verordnung sowie Milch beinhaltet und ein gelbes (Käse, Butter) eingeteilt.

---

<sup>1</sup>Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung - MilchErzV) vom 15. Juli 1970 (BGBl. I S. 1150), neugefasst durch Bek. v. 24.7.2009 I 2205; zuletzt geändert durch Artikel 2 V. v. 17.10.2010 (BGBl. I S. 2132)

<sup>2</sup>Käseverordnung (KäseV) vom 24. Juni 1965, neugefasst durch Bek. v. 14.4.1986 I 412, zuletzt geändert durch Art. 4 V v. 17.12.2010 I 2132

<sup>3</sup>Verordnung über Butter und andere Milchstreichfette (Butterverordnung – ButtV) vom 03. Februar 1997 (BGBl. I S. 144), zuletzt geändert durch Art. 5 V v. 17.12.2010 I 2132

### 2.1.2 Ernährungsphysiologische und gesundheitliche Aspekte der Milch

Neben der originären Bedeutung von Milch als Nahrungsquelle für Neugeborene und Kleinkinder werden seit Mitte der 1980er Jahre auch vermehrt gesundheitsfördernde Aspekte der Inhaltsstoffe von Milch (Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch) sowie daraus hergestellter Molkereiprodukte für Erwachsene diskutiert. An die Seite der schon weit länger bekannten wertvollen ernährungsphysiologischen Eigenschaften, welche durch eine leicht verdauliche Protein-, Kohlenhydrat- und Fettquelle, das Vorkommen aller essentiellen Aminosäuren sowie hoher Gehalte an Calcium, Jod und fettlöslichen Vitaminen bestimmt werden (Jakob et al. 2008), treten nach neueren Erkenntnissen auch antimikrobielle, anticancerogene, blutdrucksenkende, cholesterinsenkende, antithrombotische und Immunsystem-stimulierende Wirkungen (Ebringer et al. 2008, Michaelidou 2008). Die Wirkstoffe können dabei bereits originär in Milch enthalten sein, aus dieser während der Verarbeitung durch Fermentation und Proteolyse oder erst nach dem Verzehr während des gastrointestinalen Abbaus gebildet werden (Clare et al. 2000). Besonderes intensiv erforscht werden in diesem Zusammenhang bioaktive Peptide, welche für eine Vielzahl der genannten biologischen Wirkungen verantwortlich gemacht werden (Zimecki et al. 2007, Teschemacher et al. 1997, Mullally et al. 1997, Meisel 2005, Lahov et al. 1996, Hartmann et al. 2007, Aimutis 2004).

Neben spezifischen Wirkungen einzelner bioaktiver Peptide sind auch synergistische Effekte in Kombination mit nicht-peptidischen Milchinhaltstoffen (Glycolipide, Oligosaccharide) beschrieben worden (Schanbacher et al. 1997). Tabelle 2.1 gibt einen Überblick zu den bisher beschriebenen gesundheitsfördernden Wirkungen von Milchinhaltstoffen bzw. daraus gebildeter Abbauprodukte.

Neben dem gezielten, pharmazeutischen Einsatz spezieller Substanzen zur Behandlung von Hauterkrankungen und Verdauungsstörungen (Pouliot et al. 2006) wird bioaktiv wirksamen Milchinhaltstoffen eine vorbeugende Wirkung bei Erkrankungen wie beispielsweise Adipositas, Diabetes, Infektionskrankheiten, Dickdarmkrebs, Osteoporose und Bluthochdruck zugeschrieben (Ebringer et al. 2008).

Neben den dargelegten vielfältigen gesundheitsfördernden Wirkungen können auch negative Folgen eines Konsums von Milch und Milchprodukten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Darunter fallen eine allergisch bedingte Unverträglichkeit gegen Milchproteine sowie Lactoseintoleranz. Kontrovers diskutiert wird auch ein Zusammenhang zwischen dem übermäßigen Verzehr fettreicher Milchprodukte (langkettige, gesättigte Fettsäuren C<sub>12:0</sub> bis C<sub>16:0</sub>) und einem erhöhten Cholesterinspiegel, kardiovaskulären Erkrankungen oder Adipositas (Ebringer et al. 2008, Mensink et al. 2003). Die positiven Effekte einer reichhaltigen, ausgewogenen Ernährung mit Milch und Milchprodukten überwiegen jedoch deutlich.

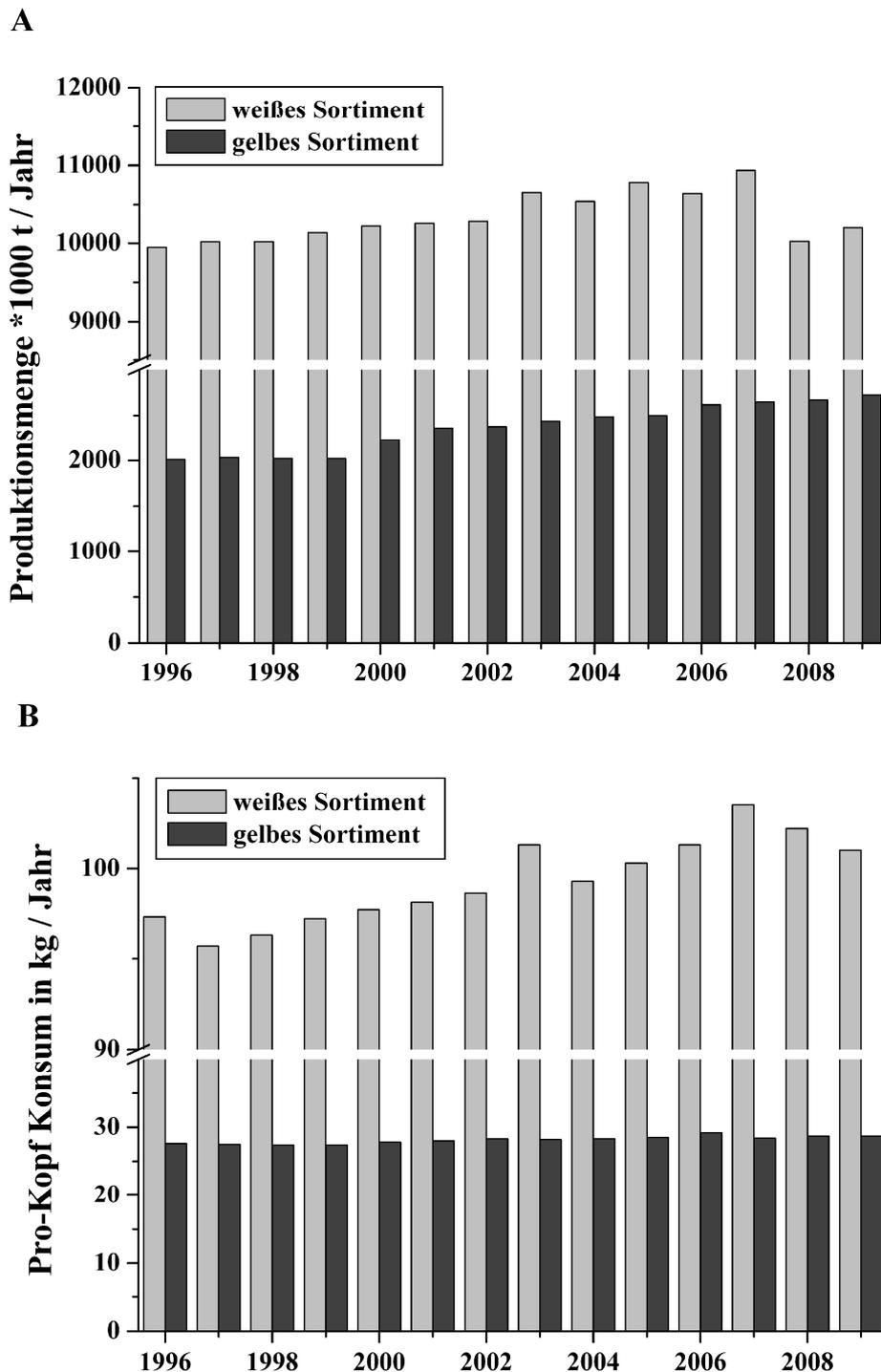
**Tab. 2.1** Zusammenstellung ausgewählter Inhaltsstoffe von Milch und Milchprodukten mit deren beschriebenen gesundheitsfördernden Wirkungen.

Inhaltsstoff	gesundheitliche Aspekte	
<b>Proteine</b>	Immunsystem-stimulierend, gesteigerte gastrointestinale Resorption (Mineralien, Aminosäuren) und Hormonausschüttung, analgetische Wirkung, blutdrucksenkend	Teschemacher et al. 1997, Brandsch et al. 1994, Meisel (1997, 2005), Clare et al. 2000, Fitzgerald et al. 2004, Vegarud et al. 2000, Jaziri et al. 1992
Caseine / daraus gebildete bioaktive Peptide	Karies-hemmend / antimikrobiell, anticancerogen	Reynolds 1999, Aimutis 2004, Brody 2000, Meisel 2001
Molkenproteine / daraus gebildete bioaktive Peptide	antimikrobiell, anticancerogen, cholesterinsenkend, blutdrucksenkend, Radikalfänger, antiulcerativ	Mezzaroba et al. 2006, Pellegrini 2003, Nagaoka et al. 2001, Hernandez-Ledesma et al. 2007
Immunglobuline	Immunsystem stimulierend, Erhöhung des intrazellulären Glutathionlevels, antioxidativ, antimikrobiell	Bounous et al. 1991, Mehra et al. 2006
<b>Oligosaccharide</b>	Immunsystem-stimulierende Wirkung	Newburg et al. 2005
Lactulose	präbiotische und antiinflammatorische Wirkung	Gibson et al. 2004, Macfarlane et al. 2006
<b>Lipide</b>		
kurzkettige und mittelkettige, gesättigte Fettsäuren (C <sub>4:0</sub> bis C <sub>12:0</sub> )	anticancerogene und antimikrobielle Wirkungen	Parodi (1999, 2004), Thormar et al. 1994, Schuster et al. 1980, Thormar et al. 2007
konjugierte Linolsäure (CLA)	anticancerogen, antiatherogen, reduziert Übergewicht	Dhiman et al. 2005, Rainer et al. 2004, MacRae et al. 2005
Sphingolipide	anticancerogen, antimikrobiell, verringerte Cholesterinaufnahme	Vesper et al. 1999, Possemiers et al. 2005

### 2.1.3 Trends am deutschen Milchmarkt

Der Milch- und Molkereimarkt stellt einen der wichtigsten Lebensmittelmärkte im europäischen Raum dar und trägt erheblich zu dessen Wertschöpfung bei (Meixner 2007). Auch in Deutschland ist dies seit Jahren durch konstant hohe Produktionsmengen an Milcherzeugnissen, Käse und Butter gekennzeichnet. Abbildung 2.1 veranschaulicht die zwischen 1996 bis 2009 in Deutschland produzierten und Pro-Kopf verzehrten Mengen an Milch und Milcherzeugnissen (weißes Sortiment) sowie Käse und Butter (gelbes Sortiment). Sowohl die Produktion als auch der Absatz von

Konsummilch, Milch- und Molkereierzeugnissen sind im betrachteten Zeitraum weitgehend konstant bis gering ansteigend.



**Abb. 2.1** Darstellung der jährlich in Deutschland produzierten Menge (A) und dem Pro-Kopf verzehrtem Anteil (B) an Milch- und Molkereierzeugnissen aufgeteilt nach weißem und gelbem Sortiment (weißes Sortiment: Konsummilch, Buttermilch, Sahne und Sahneerzeugnisse, Milchfrischerzeugnisse, Dauermilcherzeugnisse; gelbes Sortiment: Käse und Butter; weißes Sortiment Pro-Kopf Konsum: Konsummilch, Sahne und Sahneerzeugnisse sowie Milchfrischerzeugnisse) (Milchindustrie-Verband e.V. 2011b).

Generell ist dieser Trend auf alle Industrienationen übertragbar. Ursachen hierfür sind vor allem in qualitativen Trends und der gestiegenen Bedeutung von Handelsmarken, forciert vom Lebensmitteleinzelhandel, sowie einem veränderten Verbraucherverhalten, welches sich mehr und mehr in Richtung Gesundheit, Regionalität, Wellness und Convenience orientiert, zu finden (Gerlach et al. 2006, Friedrich 2010, Balling 2004). Klassische Milcherzeugnisse wie Butter, Konsummilch und Quark weisen seit Jahren stagnierende Absatzzahlen auf. Im Gegensatz dazu wachsen die Produktionsmengen im Bereich des Joghurt- und Käsesegementes, v.a. hervorgerufen durch innovative, neue Produkte, seit Jahren weiter deutlich an (Milchindustrie-Verband e.V. 2011a).

Neben der gestiegenen globalen Nachfrage v.a. aus Asien, Lateinamerika und dem Mittleren Osten (Friedrich 2010), sind der Wegfall der EU-Milchquotenregelung bis 2015 sowie die Neustrukturierung, Liberalisierung und Konsolidierung der Land- und Molkereiwirtschaft neue Herausforderungen für den deutschen Milchmarkt (Strecker et al. 2010). Innovative Produktentwicklungen, effizientere Produktionsanlagen aber auch eine vermehrte Nutzung bislang anfallender Neben- und Abfallprodukte sind dabei wichtige Schritte zur Stabilisierung und Steigerung des Absatzes von Milch und Milcherzeugnissen.

Für Molke, einem früher nur als Futtermittel verwendeten Nebenprodukt der Käseherstellung, ist dies beispielhaft gelungen. Heute wird diese zur Verbesserung der ernährungsphysiologischen und strukturellen Eigenschaften in unterschiedlichsten Lebensmitteln eingesetzt (Milchindustrie-Verband e.V. 2011c, Hinrichs 2008). Als Beispiel für ein solches Produkt gilt Schmelzkäse, welcher neben Molke auch noch weitere Milchdauererzeugnisse wie Milchpulver, Molkenpulver und Caseine enthalten kann. Ein Einsatz dieser Zusätze bei der Produktion von Schmelzkäse bringt neben den technologischen auch ökonomische Vorteile.

## **2.2 Schmelzkäse**

### **2.2.1 Definition und lebensmittelrechtliche Einordnung**

Schmelzkäse, welche auch als Prozesskäse bezeichnet werden können, sind Erzeugnisse aus überwiegend gereiftem Käse verschiedener Sorten, welche durch einen wärmeinduzierten Schmelzprozess unter Zusatz von Schmelzsalzen hergestellt werden (Spreer 1999, Foissy 2005). Neben der wert- und geschmacksgebenden Käsekomponente, die zumeist Hart- und Schnittkäse darstellt, können noch andere

Milcherzeugnisse sowie beigegebene Lebensmittel enthalten sein. Ist dies der Fall, so handelt es sich im Sinne des §1 Absatz 4 Ziffer 3 der KäseV<sup>4</sup> nicht mehr um Schmelzkäse, sondern um Schmelzkäsezubereitungen. Als weitere Milcherzeugnisse kommen Magermilchpulver (MMP), Molkenpulver (MP), Milchproteinkonzentrat (MPC), Labcasein (LC) und Säurecasein (SC) in Frage (Agroscope Liebefeld Posieux 2006, Merkenich et al. 1996). Ziele eines solchen Zusatzes können eine Erhöhung des Nährwertes und der Produktionsmenge sowie eine Beeinflussung der sensorischen, strukturellen und technofunktionellen Eigenschaften der Schmelzkäseprodukte sein (Awad et al. 2004, Miralles et al. 2006). Als beigegebene Lebensmittel werden u.a. Kräuter, Gewürze, Fleisch, Seefrüchte und Pilze eingesetzt. Je nachdem welche Rohware und Zusätze eingesetzt werden bzw. welche Verwendung für die Schmelzkäse / -zubereitung eingeplant ist, reicht das angebotene Produktspektrum von schnittfest bis cremig streichbar.

In § 1 Absatz 4 Ziffer 1 der KäseV<sup>5</sup> ist für Schmelzkäse ein Mindestgehalt von 50 % an Käse bezogen auf die Trockenmasse definiert. Für Schmelzkäsezubereitungen, welche diesen Marktsektor mit einem Anteil von mehr als 95 % dominieren, sind hingegen keine Mindestgehalte zum enthaltenen Käse oder Schmelzkäse, sondern nur begrenzende Angaben zur enthaltenen Menge an beigefügten Lebensmitteln (max. 15 %, § 4 Absatz 3 KäseV) geregelt. Für Schmelzkäsezubereitungen werden üblicherweise nicht mehr als 40 % Käse eingesetzt (Mulsow 2008) Ebenso sind bislang keine gesetzlichen Regelungen zur Höchstmenge von anderen, in Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen enthaltenen, Milchtrocken- und Molkeerzeugnissen festgesetzt. Im Gegensatz dazu ist die höchstzulässige Menge an Casein und Caseinat zu Schmelzkäsen / -erzeugnissen seit dem 31.12.2008 auf 10 % begrenzt worden<sup>6</sup>. Der daraus resultierende Spielraum in der Rezeptur von Schmelzkäsen hinsichtlich des Verhältnisses aus eingesetzter Käserohware und weiterer Milcherzeugnisse, scheint dabei nur durch technologische und sensorische Eigenschaften der fertigen Produkte (Merkenich et al. 1996) sowie ökonomische Interessen der Produzenten begrenzt zu sein. Eine Verzerrung des Wettbewerbes zwischen den Schmelzkäseproduzenten ist die Folge, da hochwertige Produkte mit qualitativ „minderwertigeren“, bei denen die wertgebende Käserohware zum Teil durch größere Mengen an günstigeren Füllstoffen

---

<sup>4</sup> Käseverordnung (KäseV) vom 24. Juni 1965, neugefasst durch Bek. v. 14.4.1986 I 412, zuletzt geändert durch Art. 4 V v. 17.12.2010 I 2132

<sup>5</sup> Käseverordnung (KäseV) vom 24. Juni 1965, neugefasst durch Bek. v. 14.4.1986 I 412, zuletzt geändert durch Art. 4 V v. 17.12.2010 I 2132

<sup>6</sup> Verordnung (EG) Nr. 760/2008 der Kommission der europäischen Gemeinschaften vom 31. Juli 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates hinsichtlich der Genehmigungen für die Verwendung Casein und Caseinaten bei der Käseherstellung

(MMP, MP, Caseine) ersetzt wurde, konkurrieren. Für den Konsumenten, der schließlich am Kühlregal entscheidet, ist dies aber nur schwer oder gar nicht nachvollziehbar.

### 2.2.2 Entwicklungen am deutschen Schmelzkäsemarkt

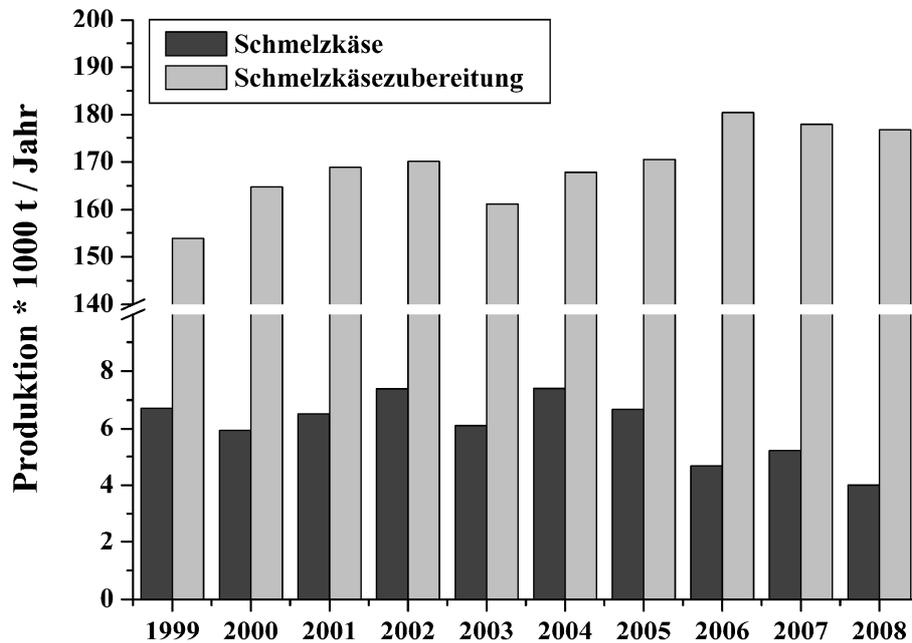
Im Vergleich zu Milch und ersten daraus gewonnenen Fermentationsprodukten wie Joghurt und Käse sind Schmelzkäseprodukte mit ihren etwa 100 Jahren Entwicklungsgeschichte noch relativ jung. Erstmals hergestellt wurde Schmelzkäse vom Niederländer Jan Hendrikzoon 1899, welcher Schnittkäse in Blechdosen einer Wärmebehandlung unterzog. Weiterentwickelt und auf den Markt gebracht wurden Schmelzkäse schließlich 1911 in der Schweiz von Gerber und Stettler (Kammerlehner 2003). In Deutschland wurden Schmelzkäse erstmals 1922 durch die Firma Gebrüder Wiedemann vertrieben (Roeder 1954). In den folgenden Jahren stieg die Produktion von Schmelzkäse stetig an und verzeichnete vor allem in Krisenzeiten und Kriegsjahren sprunghafte Anstiege. Ursachen hierfür sind zum einen die hohe ernährungsphysiologische Wertigkeit der in Schmelzkäse enthaltenen Inhaltsstoffe, das vielfältige Sortenangebot mit unterschiedlichen Aromaintensitäten sowie eine durch den Herstellungsprozess gesteigerte Haltbarkeit (Fox et al. 2000). Als klassische Halbkonzerve kann Schmelzkäse damit auch ohne Kühlung über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden (Berger et al. 1989). Seit 1950 werden Schmelzkäsezubereitungen vermehrt zur Herstellung großindustriell gefertigter Nahrungsmittel eingesetzt. Dieser Trend hält für Deutschland bis heute an und führte zu weiter ansteigenden Produktionsmengen bis ins Jahr 2006 (vergl. Abb. 2. 2). Seitdem stagniert die jährliche Produktionsmenge bei etwa 180.000 t / Jahr (Milchindustrie-Verband e.V. 2011b), was eine Sättigung des Schmelzkäsemarktes vermuten lässt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist Deutschland, gefolgt von Frankreich, damit aber immer noch der größte Produzent von Schmelzkäseerzeugnissen im europäischen Raum (Meixner 2007).

Im gleichen Zeitraum ist der Anteil an qualitativ hochwertigen Schmelzkäseprodukten, bezogen auf alle in Deutschland produzierten Schmelzkäsezubereitungen, mit nur noch etwa 4000 t / Jahr in 2008 (2,3 %) auf dem seit 1999 (4,4 %) niedrigsten Stand angekommen (Abb. 2. 2). Dies spiegelt den Trend der Branche zum Ausbau des Markensektors günstigerer Produkte mit geringerem Anteil an wertgebendem Käse wieder.

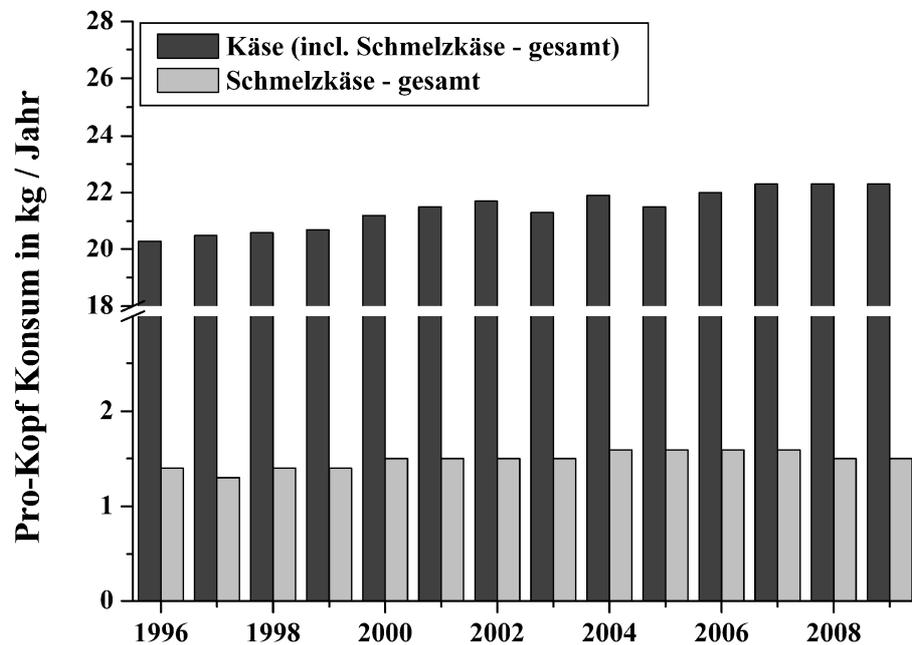
Haupteinsatzgebiete von Schmelzkäseprodukten sind heute vor allem im Fastfood- und Convenience-Bereich zu finden (Mann 2004, Purna et al. 2006). Im Vergleich zu Käse sind vom Anwenderstandpunkt aus gesehen die guten Schmelzeigenschaften, sowie eine verbesserte Haltbarkeit, ein rationeller Verbrauch durch streichbare

Konsistenz und kleinportionierbare Verpackungen sowie geringere Kosten der Schmelzkäseprodukte von Vorteil (Spreer 1999, Mann 2004).

A



B



**Abb. 2.2** Darstellung der jährlich in Deutschland von 1999 bis 2009 produzierten Menge an Schmelzkäseprodukten, unterteilt nach Schmelzkäse und -erzeugnissen (oben) und dem Pro-Kopf verzehrten Anteil an Käse und Schmelzkäse (unten) (Milchindustrie-Verband e.V. 2011b).

Im Gegensatz zur noch bis 2006 in Deutschland gestiegenen Produktion stagniert die jährlich Pro-Kopf verzehrte Menge an Schmelzkäseprodukten bereits seit 1996. Im gleichen Zeitraum ist dagegen ein leichter Anstieg der jährlich verzehrten

Gesamtkäsemenge von knapp 20 kg im Jahr 1996 auf etwa 22 kg im Jahr 2009 zu beobachten (Milchindustrie-Verband e.V. 2011d). Dieser Trend ist in Abbildung 2.2 für Deutschland verdeutlicht. Als Grund dafür wird, die seit einiger Zeit wieder gestiegene Nachfrage der Konsumenten nach frischen, traditionell hergestellten und ursprünglichen Produkten angesehen (BVE 2011). Mit innovativen und speziell auf Verbrauchersegmente zugeschnittenen neuen Produktvarianten versucht die Branche diesem Trend und einer damit einhergehenden Senkung des Absatzes entgegen zu wirken. Inwieweit sie diese Herausforderung, auch in Zeiten einer stetig wachsenden Globalisierung des Milchmarktes, wegfallenden Subventionen und gestiegenen Verbraucheransprüchen, bewältigen kann bleibt abzuwarten.

### 2.2.3 Grundlagen der Schmelzkäseherstellung

Prinzipiell gliedert sich der Schmelzkäseherstellungsprozess in vier Teilschritte, welche im Fließschema in Abbildung 2.3 verdeutlicht sind.

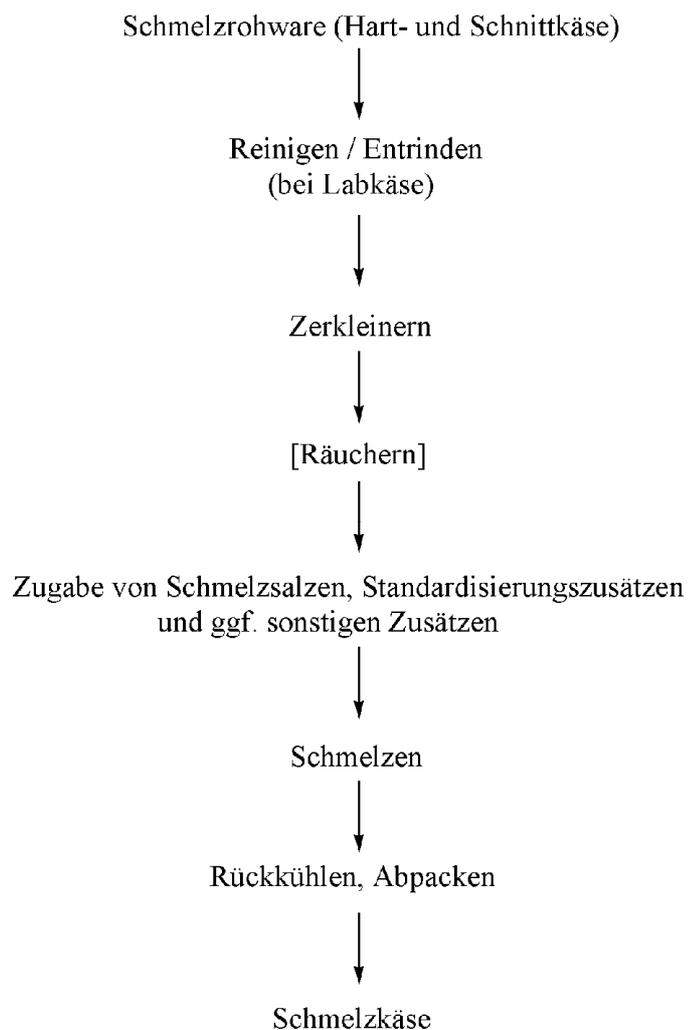


Abb. 2.3 Fließschema zur Schmelzkäseherstellung (Foissy 2005).

Diese können in die Lagerung und das Vorbehandeln der Rohwaren, die Bereitstellung von Schmelzpartien und Zusatzstoffen, den eigentlichen Schmelzprozess sowie eine Nachbehandlung und Verpackung der fertigen Schmelzkäsevarianten unterteilt werden. Die strukturellen und technologischen Eigenschaften der fertigen Produkte werden dabei maßgeblich durch die eingesetzten Rohwaren und die Prozessführung des Schmelzprozesses gesteuert (Spreer 1999, Purna et al. 2006, Gunasekaran et al. 2003). Je nach gewünschten Produkteigenschaften sind diese entsprechend zu kombinieren. Die gewählten Temperaturbedingungen liegen klassisch zwischen 65 bis 140 °C bei Rührzeiten von 3 bis 8 min (Lee et al. 2003).

Für schnittfeste Schmelzkäse, welche durch eine lange, gequollene Teigstruktur gekennzeichnet sind, werden klassisch schonendere Schmelzprozessbedingungen (65 - 100 °C, 4 bis 8 min Schmelzzeit, langsames Rühren), junge und wenig proteolytisch hydrolysierte Rohwaren sowie Schmelzsalze mit geringem Cremierungseffekt verwendet. Im Gegensatz dazu werden streichfähige Schmelzkäse einer stärkeren Bearbeitung (bis 140°C, 7 bis 15 min Schmelzzeit, hohe Rührgeschwindigkeit) unterzogen. Als Rohware für diese Produktklasse werden meist mittel bis lang gereifte Käse sowie Vorschmelzware eingesetzt. Zur Erreichung der für diese Schmelzkäse charakteristischen homogenen, weichen Teigstruktur werden bevorzugt Schmelzsalze mit ausgeprägtem Cremierungseffekt verwendet (Spreer 1999, Klostermeyer et al. 1988).

Ziel des Schmelzprozesses ist die Gewinnung einer homogenen Masse aus vorzerkleinerter Rohware, Wasser, Fett und gegebenenfalls weiteren Zutaten durch Wärme und mechanische Bearbeitung bei gleichzeitigem Eintrag von Schmelzsalzen (Guinee et al. 2004). Qualitativ hochwertige Schmelzkäseerzeugnisse sind dabei durch eine geschmeidige, homogene Struktur, gleichmäßige Farbe und das Fehlen von Gasbläschen infolge unerwünscht ablaufender Fermentationsprozesse charakterisiert (Guinee et al. 2004, Chambre et al. 2000). Ohne den Zusatz an Schmelzsalzen zum Prozess würde infolge der hohen Temperaturen nur ein Aufschmelzen der Rohwaren mit anschließender Trennung der Phasen in Protein (Paracaseinat), Wasser und Fett stattfinden (Klostermeyer et al. 1988). Klassisch wird die Separation der Fettphase von der Käsemasse als „oiling off“ bezeichnet (Shirashoji et al. 2006). Eine Zusammenstellung der Einflussfaktoren der Rohwaren und der Schmelzprozessbedingungen auf die textuellen und strukturellen Eigenschaften des fertigen Endprodukts, welche maßgeblich die Qualität bestimmen, ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Die während des Schmelzprozesses ablaufenden Prozesse können in 3 Hauptschritte unterteilt werden. Zunächst erfolgt durch thermischen Einfluss die Umwandlung der festen, zähen Rohware in einen plastisch, elastischen Weichstoff. Anschließend wird

durch zugesetzte Schmelzsalze ein Ionenaustausch sowie eine Quellung und Hydratisierung der Proteine hervorgerufen, welche bei anhaltender Temperatureinwirkung zur Dispergierung dieser führt. Das in der Rohware bestehende Caseinmicellnetzwerk wird aufgelöst und Teilchen in der Größe von Caseinsubmicellen werden gebildet. Die Käserohware verliert dabei teilweise ihre fest vernetzte Struktur und geht vom Protein-Gel in ein Protein-Sol über (Berger et al. 1989, Klostermeyer et al. 1988). Dieser Prozess, welcher in der Fachliteratur auch als Cremierung bezeichnet wird, tritt nur während des Schmelzvorganges auf und fasst Hydratation, Viskositäts-erhöhung und Teigverkürzung der Schmelzware zusammen (Roeder 1954). Eine mangelnde Prozesskontrolle kann bei diesem sehr komplexen und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärten Prozess rasch zu einem Erschöpfen der Hydratationskapazität der Proteinmatrix führen. In der Folge resultieren unerwünschte feste, pastöse Produkte (Übercremen).

**Tab. 2.2** Chemisch-physikalische Vorgänge während des Schmelzprozesses, die zur Beeinflussung der resultierenden Schmelzkäseprodukte beitragen (Spreer 1999, Purna et al. 2006, Guinee et al. 2004, Shirashoji et al. 2006, Guinee 2002).

Veränderungen durch	
	Schmelzprogramm (Zeit, Temperatur)
<b>physikalische Einflüsse</b>	Druck (Vakuum, Überdruck)
	mechanische Bearbeitung (Rührgeschwindigkeit, Rührzeit)
	Einfluss durch Wasser (Quellung, Hydratation)
	Schmelzsalze (Ionenaustausch, pH-Wert, Menge)
<b>chemische Einflüsse</b>	Käserohware (Reifegrad, pH-Wert, Trockenmasse, % Anteil intaktes Casein)
	Anteil an Molkenpulver, Milchproteinpulver, Vorschmelzware

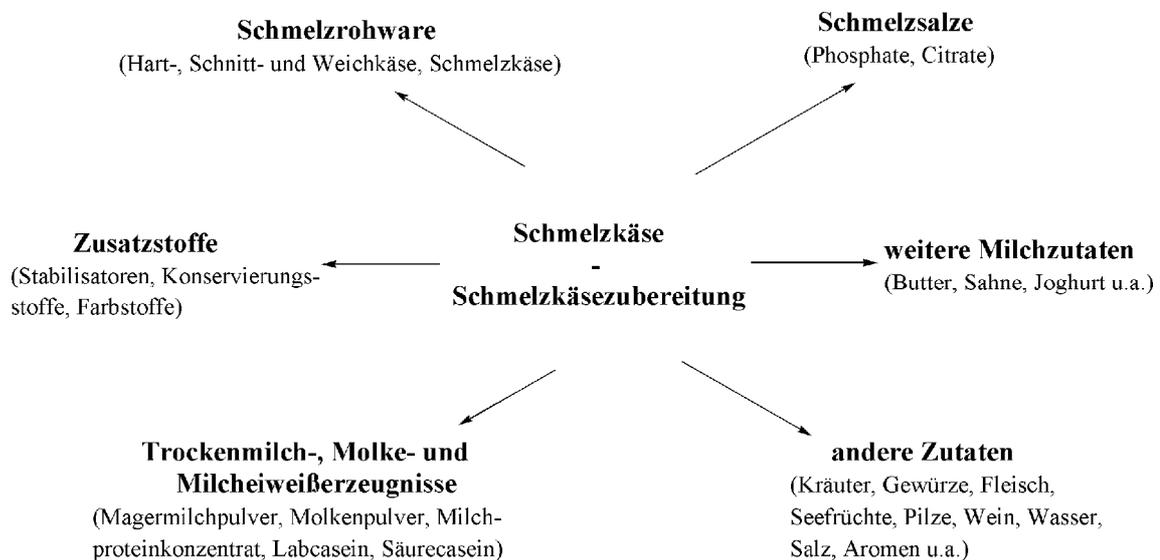
Nach der Abkühlung wird die Schmelzkäsemasse wieder in ein Gel mit homogener, veränderter Struktur und Funktionalität zurückgeführt, welches in hohem Maße von der eingesetzten Rohware und den Prozessbedingungen während des Schmelzvorganges abhängen (Spreer 1999). Eine Beeinflussung der Fettkügelchen-Größenverteilung in Schmelzkäseprodukten durch erhöhte Rührgeschwindigkeiten und Temperaturen während des Schmelzvorganges konnte bereits nachgewiesen werden (Lee et al. 2003, Glenn et al. 2003). Eine Limitierung der Prozessmodifikationen scheint aber gegeben zu sein, da oberhalb bestimmter Rührgeschwindigkeiten Caseinmoleküle koagulieren und eine „puddingartige“ Konsistenz der Schmelzware verursachen, welche in einer erhöhten Viskosität und verringerten Schmelzbarkeit resultiert (Übercremen) (Glenn et al. 2003). Ein ebenso wichtiger Einfluss auf die Funktionalität der Schmelzware kann mit der Steuerung des Gehaltes an löslichem Casein genommen werden, welches mit

fortschreitendem Alter der Rohkäse ansteigt (Lucey et al. 1993). Je höher der Anteil an löslichem Casein, desto weniger strukturgebendes Proteinnetzwerk ist enthalten, was zur Herstellung weicher, streichbarer Schmelzkäseerzeugnisse führt.

Im Folgenden soll auf die einzelnen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung und deren Einflüsse auf die Ausbildung der Schmelzkäsematrix genauer eingegangen werden.

#### 2.2.4 Charakteristika der Rohwaren und deren Einfluss auf die Schmelzkäsematrix

Die typischen zur Herstellung von Schmelzkäsen und Schmelzkäsezubereitungen eingesetzten Rohwaren sind in Grafik 2.4 zusammengefasst.



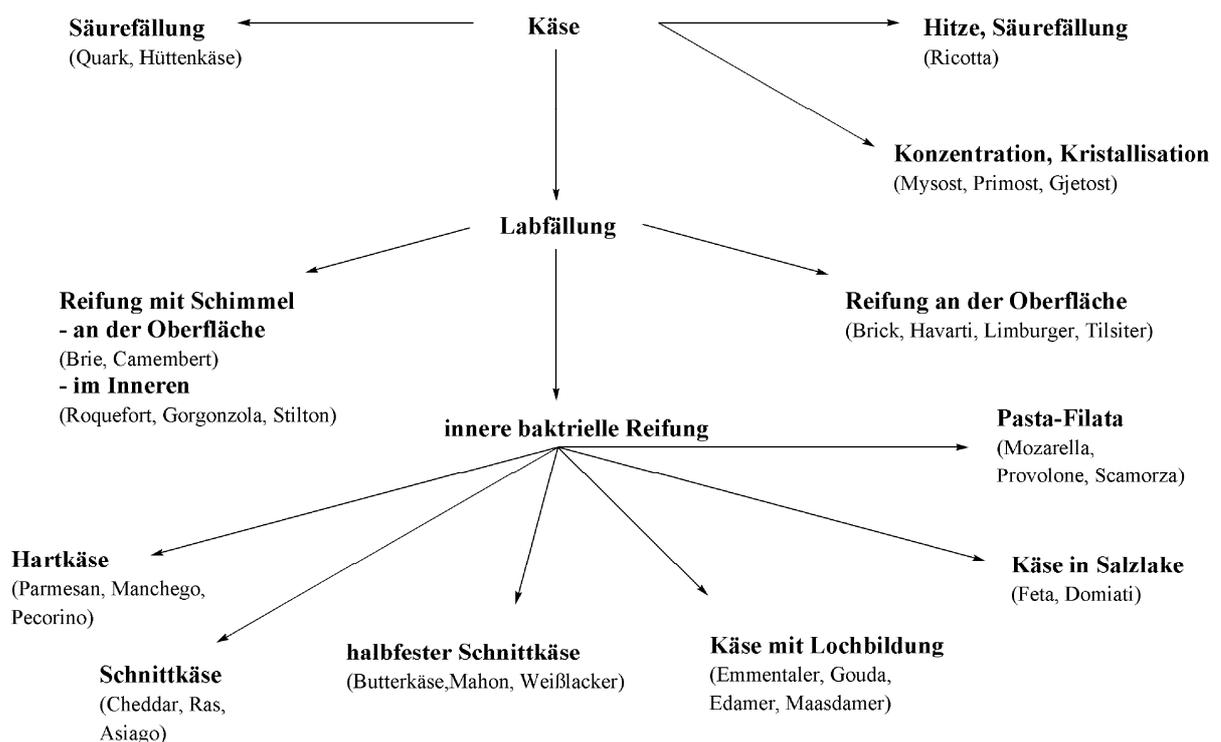
**Abb. 2.4** Rohstoffe zur Herstellung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen (Agroscope Liebefeld Posieux 2006, Guinee et al. 2004).

Eine zentrale Rolle zur Ausbildung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Endprodukte nehmen dabei die Schmelzrohware, welche der eingesetzten Käse- und gegebenenfalls Vorschmelzware entspricht, Schmelzsalze sowie weitere zugesetzte Milcherzeugnisse (Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweißerzeugnisse) ein. Alle weiteren in der Grafik aufgeführten Rohstoffe (weitere Milchezutaten, beigegebene Lebensmittel und Zusatzstoffe) tragen im Vergleich weniger zur Struktur als vielmehr zur geschmacklichen Vielfalt und verlängerten Haltbarkeit der Schmelzkäseerzeugnisse bei. Durch Variation der Rohstoffe ergibt sich ein bis heute auf über 500 verschiedene Schmelzkäsesorten angewachsenes Produktspektrum, welches infolge der Heterogenität noch weitgehend unerforscht ist (Berger et al. 1989). Eine genauere Spezifizierung der

Rohwaren bezüglich deren Produkteigenschaften und Beeinflussung der Schmelzkäsematrix soll im Anschluss gegeben werden.

#### 2.2.4.1 Schmelzrohware

Als Schmelzrohware wird heute hauptsächlich in unterschiedlichen Graden der Reifung befindlicher Käse, zumeist Labkäse und in geringerem Maße auch Frischkäse sowie Sauermilchkäse verwendet. Die Hauptschmelzware Käse ist nach § 1 Absatz 1 der KäseV definiert als „frisches oder in verschiedenen Graden der Reife befindliches Erzeugnis, das aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt ist“. Eine übersichtliche Einteilung der bekannten Käseprodukte, welche zurzeit weit über 1000 Sorten umfassen (Roginski et al. 2003), wird zumeist anhand der Textur, welche vor allem vom Wassergehalt bestimmt wird, vorgenommen (Fox et al. 2004). Zur Veranschaulichung der Sortenvielfalt ist Abbildung 2.5 jedoch besser geeignet, da diese um die Art der Koagulation und Reifung erweitert ist.



**Abb. 2.5** Schematische Einteilung der Käsesorten (Roginski et al. 2003, Gunasekaran et al. 2003).

Weitere Unterteilungen wie beispielsweise anhand der Tierart, des Wasser zu Protein Verhältnisses, der Brenntemperatur sowie der eingesetzten Starterkulturen und Nicht-Starterkulturen werden ebenso vorgenommen. Bislang führt aber keines der genannten Einteilungskriterien zu einer vollständig zufriedenstellenden Klassifizierung der ausgeprägt heterogenen Käsesorten (McSweeney et al. 2004b). Diese Diversität, bedingt durch Unterschiede im Herstellungsverfahren, führt zu einer Fülle an unterschiedlich

strukturierten und aromatisierten Käseprodukten, welche die Grundlage des vielfältigen Produktspektrums an Schmelzkäseerzeugnissen bildet. Hauptunterschiede der Verfahren zur Käsegewinnung sind dabei vor allem in der Art der Koagulierung, der eingesetzten Mikroflora sowie der Reifungsführung und –dauer zu finden. Die Herstellung von Labkäse, welcher als Hauptschmelzware eingesetzt wird, ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

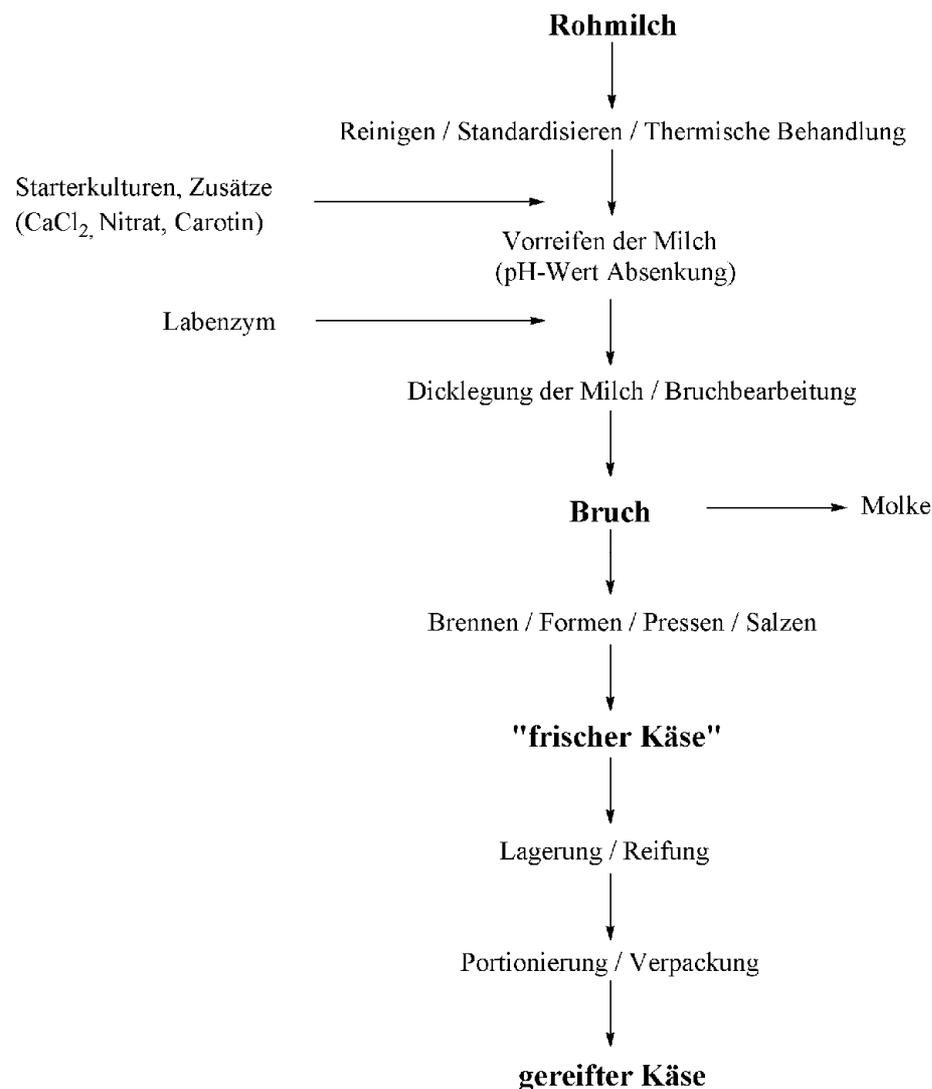


Abb. 2.6 Fließschema zur Labkäseherstellung (Spreer 1999).

Zusammengefasst gliedert sich die Labkäseproduktion in die vier folgenden Hauptschritte: Milchvorbehandlung, Dicklegung, Bruchbearbeitung und Reifung.

Als milchbearbeitende Schritte werden eine Reinigung, eine Standardisierung, welche die Einstellung des Fett-, Protein- und Trockenmassegehaltes der Käsereimilch beinhaltet, sowie eine abschließend fakultativ durchgeführte thermische Behandlung zusammengefasst. Eine gleichzeitige Zugabe von Starter- und Nicht-Starterkulturen bewirkt zunächst eine milde Säuerung durch den Abbau der Lactose zu Milchsäure

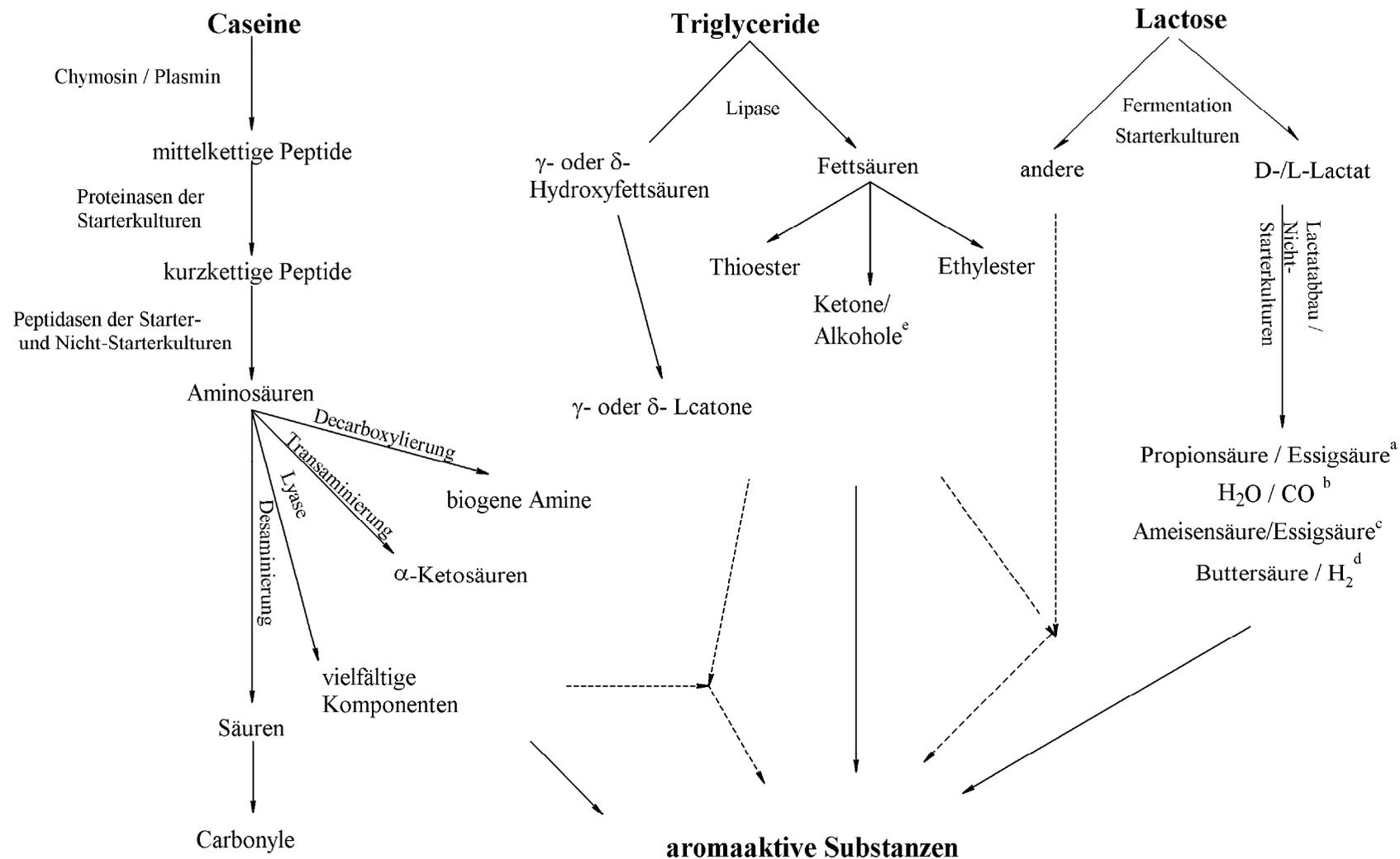
(Gunasekaran et al. 2003), welche vor allem durch thermophile Milchsäurebakterien der Stämme *Streptococcus lactis* und *cremoris* ablaufen (Gagnaire et al. 2004). Weitere wichtige Reaktionen werden von diesen im Verlauf der Käsureifung beeinflusst. Die anschließende Dicklegung der Milch erfolgt enzymatisch mittels Labferment. Dieses originär in Mägen von Kälbern entdeckte Enzymgemisch besteht zu 75 % aus Pepsin und zu 25 % Chymosin. Zu Beginn der Labkäseherstellung wird die hohe Spezifität des Chymosins gegenüber der Peptidbindung Phe<sup>105</sup> – Met<sup>106</sup> im  $\kappa$ -Casein ausgenutzt (Hui 2006). Die Koagulierung der Caseinmicellen tritt dabei durch Verlust der stabilisierenden Eigenschaft von  $\kappa$ -Casein infolge der enzymatischen Spaltung in Caseinomakropeptid (CMP) und para- $\kappa$ -Casein ein (Crabbe 2004). Im Folgenden wird der gebildete Käsebruch bearbeitet (Schneiden, Brennen) und durch Pressen von der Molke abgetrennt. Abschließend werden die Käse je nach Sorte unterschiedlich lang gereift und / oder gelagert (Spreer 1999, Kammerlehner 2003).

Die wichtigsten im Verlauf der Käsureifung stattfindenden Reaktionen verdeutlicht Abbildung 2.7. Die Vielzahl an komplexen biochemischen Prozessen, die im Verlauf der Käsureifung zur Beeinflussung der Textur und speziell der Geschmacks- und Aromaausprägung sowie der Farbe der Käse beitragen, werden durch das Koagulierungsenzym, originäre Milchenzyme, die zugesetzten Milchsäurebakterien und die sekundäre Mikroflora sowie deren beider Enzymsysteme gesteuert (Fox et al. 2004, Marilley et al. 2004, McSweeney et al. 2000, Hayaloglu et al. 2005). Die ablaufenden Prozesse sind dabei im Wesentlichen abhängig von der jeweiligen Käsesorte und den darin vorherrschenden Mikroorganismen (Collins et al. 2003, McSweeney et al. 2004a). Unterteilt werden kann die Käsureifung in eine primär ablaufende Phase mit den charakteristischen Reaktionen Proteolyse, Lipolyse und Glykolyse sowie eine parallel und nachfolgend stattfindende sekundäre katabole Prozessabfolge. In dieser zweiten Reifungsphase laufen vielfältige Reaktionen ab, welche zu einem weiteren Abbau der in der ersten Phase gebildeten Produkte führen. Dazu zählen die komplexen Reaktionswege des Aminosäureabbaus (Decarboxylierung, Transaminierung, Reaktionen mit Lyase-Aktivität, Desaminierung), des Fettsäureabbaus ( $\beta$ -Oxidation, Bildung von Ester- und Thioesterverbindungen) und des Milchsäureabbaus (Fox et al. 2004). Die während der Reifung ablaufenden glycolytischen Prozesse führen dabei zu Beginn zur pH-Wert-Absenkung infolge des Abbaus der Zucker durch Starterkulturen zu Milchsäure. Mit weiterem Fortschreiten der Reifung wird diese durch Nicht-Starterkulturen zu aromaaktiven Substanzen wie Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure umgewandelt (McSweeney et al. 2004a).

Im Gegensatz dazu prägen der proteolytische und lipolytische Abbau der Caseine bzw. Fette neben dem Aroma- und Geschmackseindruck auch maßgeblich die Textur und Funktionalität des Käsegels (Bachmann et al. 1997).

Mit steigendem Reifegrad werden durch milcheigene und mikrobielle Proteasen zunächst mittelkettige und später kurzkettige Peptide sowie freie Aminosäuren gebildet. Freie Aminosäuren werden anschließend weiter zu charakteristischen Aromakomponenten wie Carbonylen, biogenen Aminen und  $\alpha$ -Ketosäuren abgebaut (McSweeney 2004). Im Falle der Triglyceride werden zunächst freie Fettsäuren durch Lipasen gebildet. Im Weiteren entstehen aus diesen Ester- und Thioesterverbindungen sowie Lactone, welche maßgeblich zum Geschmack der Käse beitragen (Collins et al. 2004).

Neben der Bildung der aromaktiven Substanzen führt der Abbau des intakten Casein-Fett-Netzwerkes zu Textur- und Strukturveränderungen des Käsegels, welche mit veränderten funktionellen Eigenschaften der fertigen Käseprodukte einhergehen. Eine Beeinflussung der daraus gefertigten Schmelzkäse kann so vor allem durch den Typ, die Textur und Konsistenz, den pH-Wert, die Reifung sowie das Aroma der Käserohware erfolgen (Berger et al. 1989, Guinee et al. 2004, Caric et al. 1985). Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Abbau der intakten Caseine, welcher mit fortschreitender Reifung zunimmt (Gunasekaran et al. 2003). Den größten Einfluss auf die Erweichung von Schmelzkäsen hat der Abbau der  $\alpha_{S1}$ -Caseine (Brickley et al. 2007). Dies zeigt sich vor allem in einer verringerten Härte und Elastizität sowie verschlechterten Fließeigenschaften von Schmelzkäseprodukten, welche durch die erhöhten Konzentrationen an Peptiden und freien Aminosäuren hervorgerufen werden (Brickley et al. 2007). Die ablaufenden proteolytischen Vorgänge führen im Käse dabei vermehrt zu einer Erweichung des Proteingerüsts, welche als Konsequenz der Hydrolyse des Para-Caseinats sowie des veränderten Wasserbindevermögens und pH-Wertes resultiert (McSweeney 2004). So finden sich in gereiftem Cheddar beispielsweise nur noch etwa zwei Drittel des ursprünglich enthaltenen intakten Caseins wieder (Banks 1998). Zur Herstellung von schnittfesten Schmelzkäsen werden jedoch mindestens 70 % intaktes Casein benötigt (Spreer 1999). Im fertigen Schmelzkäse entspricht dies einem Anteil von etwa 12 % intaktem Casein bezogen auf das Gesamtgewicht (Klostermeyer et al. 1988). Im Vergleich dazu sind für streichbare Schmelzkäse auch länger gereifte Käse mit intakten Caseinanteilen bis zu 50 % einsetzbar. Der Einsatz dieser Käse führt zu einer geringeren Festigkeit der fertigen Schmelzkäseerzeugnisse (Piska et al. 2004). Beim Verarbeiten von zu lang gereiften Produkten kann es im Schmelzkäseprodukt jedoch zu unerwünschten Texturdefekten, wie beispielsweise einer mangelhaft ausgebildeten Struktur bedingt durch die geringere Emulgierbarkeit sowie einer körnigen Konsistenz, kommen (Chambre et al. 2000, Lazaridis et al. 1981). In kürzer gereiften Käsen liegt das intakte Casein dagegen in langen Strukturen vor, welche im Schmelzprozess schnell ein stabiles Sol bilden und nach Rückbildung ins Gel zu schnittfesten Schmelzkäseerzeugnissen führen.



**Abb. 2.7** Bildungswege charakteristischer Aromastoffe in Käsen während der Reifung ausgehend von Caseinen, Triglyceriden und Lactose (McSweeney, P.L.H. 2004a). Gestrichelte Linien repräsentieren Interaktionen zwischen den 3 Hauptgruppen, welche ebenso zur Ausprägung bestimmter Aromakomponenten führen können. Die Mikroorganismen bzw. Reaktionen, welche zur Ausbildung der mit a-e gekennzeichneten Substanzen führen, werden nachfolgend aufgelistet. a – Propionsäurebakterien; b – Schimmelpilze, Hefen; c – Nicht-Starterkulturen; d – Clostridien; e – partielle  $\beta$ -Oxidation (McSweeney 2004).

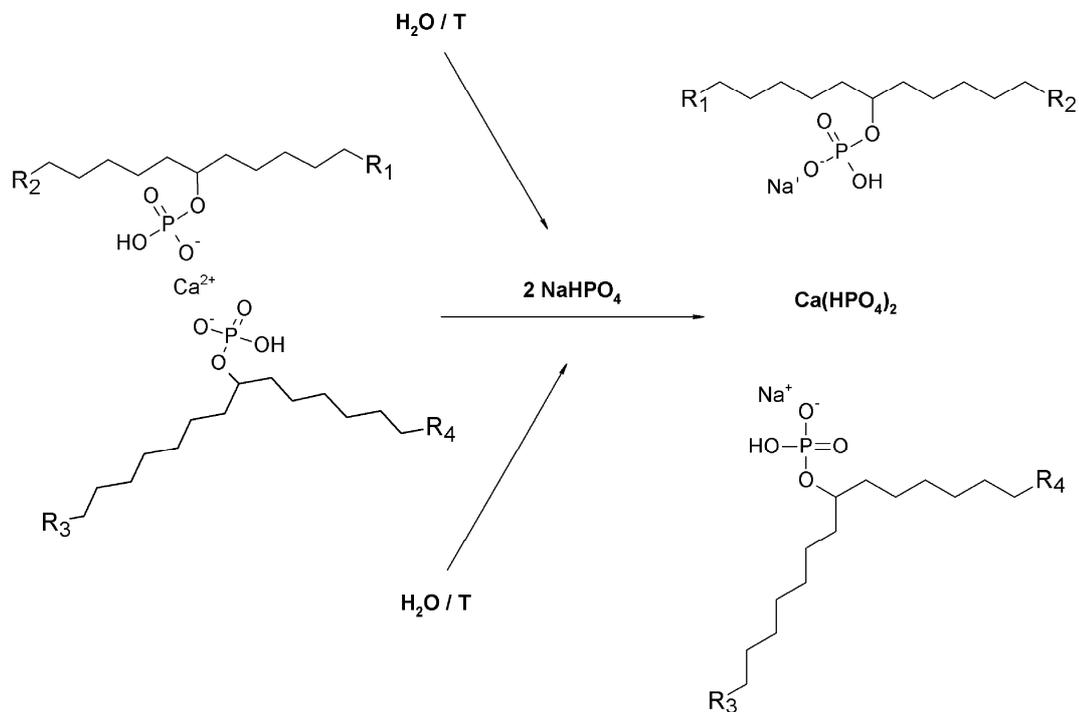
Intaktes Casein beeinflusst dabei vor allem die Emulgierbarkeit, das Ausmaß der Casein-aggregation sowie die Elastizität des fertigen Schmelzkäseerzeugnisses (Guinee et al. 2004). Ebenso kann durch den pH-Wert und das Calcium-Casein-Verhältnis die Caseinhydratisierung und daraus resultierend auch die Schmelzkäsetextur beeinflusst werden (Brickley et al. 2007). Je nach Struktur der eingesetzten Käserohware muss die Prozessführung des Schmelzverfahrens angepasst werden. So benötigen wenig gereifte Käse eine intensivere Bearbeitung zum Eiweißaufschluss, da diese bei zu kurzer Schmelzzeit zur Ausbildung zäher, gummiartiger Teigstrukturen neigen. Im Gegensatz dazu führt zu langes Bearbeiten stark gereifter Käse zur Erschöpfung der Wasserbindungskapazität, was zu verfestigten, nässenden und gering haltbaren Teigen führt (Spreer 1999).

Zur Schmelzkäseherstellung werden infolgedessen heute vermehrt Gemische aus verschiedenen gereiften Käsekomponenten verwendet, um einerseits die benötigte faserige Strukturgrundlage durch intaktes Casein und andererseits den gewünschten Geschmackseindruck, durch während der Reifung gebildete Aromakomponenten, zu erreichen (Brickley et al. 2007). Erste Erkenntnisse zum Zusammenhang zwischen dem Reifegrad der Schmelzrohware und der Struktur fertiger Schmelzkäse konnten bereits 1930 von Templeton und Sommer postuliert werden. So bilden junge Käse härtere, ältere Käse hingegen weichere Schmelzkäse (Templeton et al. 1930).

#### 2.2.4.2 *Schmelzsalze*

Im Bereich der Schmelzkäseindustrie werden Schmelzsalze heute vor allem zur Einstellung und Pufferung eines optimalen pH-Wertes (5,5 bis 6,0) eingesetzt, welcher maßgeblich zur Strukturausbildung sowie zur Dispersion, Hydratisierung und Quellung der Milchproteine während des Schmelzprozesses beiträgt (Spreer 1999, Roginski et al. 2003, Cavaliersalou et al. 1991, Marchesseau et al. 1997). Die durch Schmelzsalze verursachte Ca-Chelatisierung führt dabei während des Schmelzvorganges zur Bildung löslichen Paracaseins, dessen emulgierende und wasserbindende Eigenschaften die Grundlage zur Ausbildung einer stabilen Öl-in-Wasser-Emulsion bilden (Shirashoji et al. 2006, Caric et al. 1985, Shimp 1985). Die chelatisierende Wirkung ist dabei stark abhängig vom Typ und der Menge an eingesetztem Schmelzsalz (Guinee et al. 2004, Thomas 1973), welche sich entsprechend in unterschiedlichen Produkteigenschaften (Festigkeit, Schmelzbarkeit) der fertigen Schmelzkäse widerspiegelt (Gupta et al. 1984, Olson 1995). Lösliche Caseinate wie beispielsweise Na-Caseinat sind dabei bereits seit längerem, aufgrund der separierten hydrophilen und hydrophoben Proteinregionen, als sehr gute Emulgatoren bekannt (Shirashoji et al. 2006). Angewendet werden diese unter anderem bei der Herstellung von Brühwürsten (Berger et al. 1989). Zur Verdeutlichung

der Wirkmechanismen von Schmelzsalzen sind diese exemplarisch für Di-Natriumhydrogenphosphat in Abbildung 2.8 dargestellt.



**Abb. 2.8** Wirkmechanismen von Schmelzsalzen während des Schmelzprozesses am Bsp. von Di-Natriumhydrogenphosphat (Berger 1989). Die gelösten Schmelzsalze dringen in den intermicellaren Raum der Proteinmatrix, der über kolloidales Calciumphosphat verdichtet ist, ein. Es findet ein Ionenaustausch zwischen den Schmelzsalzen, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aufnehmen und dem Paracaseinat, welches  $\text{Na}^+$ -Ionen bindet, statt. Die löslichen Na-Paracaseinate führen zu einer Vereinzelung der zuvor fest vernetzten Peptidketten. Die daraus resultierende Verschiebung der Ladungsverteilung bedingt eine veränderte Grenzflächenspannung, welche mit einer verbesserten Hydratation und Emulgierkapazität einhergeht.

Eingeteilt werden Schmelzsalze in zwei Hauptgruppen. Zum einen werden Citrate und Lactate (Na-, K-Salze) eingesetzt, welche einen geringen Cremierungseffekt aufweisen und somit schnittfeste Käse mit langer, gequollener Teigstruktur bewirken. Im Gegensatz dazu werden Phosphate (Ortho-, Tri- und Polyphosphate) mit gutem Dispersionsvermögen zur Herstellung von streichfähigen Schmelzkäsen verwendet, welche durch eine homogene, weiche Teigstruktur gekennzeichnet sind. Üblicherweise werden Mischungen der Salze in Mengen von 2 % bis 4 % bezogen zur eingesetzten Käserohware bzw. 1 % bis 3 % bezogen zum Endprodukt, abhängig von den gewünschten Produkteigenschaften, eingesetzt (Agroscope Liebefeld Posieux 2006, Roginski et al. 2003). Ein Zusatz von Schmelzsalzen zur Herstellung von Schmelzkäse ist bislang unverzichtbar, da eine dauerhafte homogene Stabilisierung der Öl-in-Wasser Emulsion nur durch diese gewährleistet werden kann.

#### 2.2.4.3 *Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweißerzeugnisse*

Neben den ursprünglich zur Schmelzkäseherstellung eingesetzten Rohwaren - Käse und Schmelzsalze – wurden während der 100jährigen Entwicklung weitere Zutaten eingesetzt, welche die geschmackliche Vielfalt bereicherten, die technofunktionellen Eigenschaften verbessern, die Haltbarkeit verlängern, zur Erhöhung der ernährungsphysiologischen Wertigkeit führen sowie eine kostengünstigere Produktion ermöglichen (Awad et al. 2004). Besonders interessant zur Erzielung des zuletzt genannten ökonomischen Aspekts ist der Einsatz alternativer Milchprodukte. Als Füllstoffe zum Ersatz der kostenintensiven Käserohware haben sich dabei Casein, Caseinate, Magermilchpulver, Molkenpulver sowie Milchproteinkonzentrate als günstig erwiesen (Lee et al. 2004). Der Einsatz dieser aus Reststoffen der Milchverarbeitung anfallenden Proteinkomponenten, welche früher häufig nur als Futtermittel eingesetzt wurden, scheint dabei nur durch die technologische und sensorische Qualität der Produkte begrenzt zu sein. Im Falle eines Casein-Zusatzes ist außerdem die gesetzliche Höchstgrenze von 10 % einzuhalten<sup>7</sup>. Zum Ausgleich der aufgrund des Käseentzugs fehlenden Fettkomponente wurde auf Sahne, Butter und weitere Milchfettfraktionen ausgewichen.

#### ***Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse***

Zur Schmelzkäseherstellung werden als Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse heute hauptsächlich Magermilchpulver, Molkenpulver und Milchproteinkonzentrate, welche lebensmittelrechtlich gesehen zu den getrockneten Dauermilch- und Molkeerzeugnissen gezählt werden, eingesetzt. Die funktionelle Vielseitigkeit dieser Produkte führt im fertigen Schmelzkäse unter anderem zu einem verbesserten Wasserbindevermögen, zur Ausbeuteerhöhung und Texturverfeinerung sowie zu einer Erhöhung der ernährungsphysiologischen Wertigkeit (Merkenich et al. 1996). Die enthaltenen Molkenproteine verbleiben während des Schmelzvorganges in ihrer nativen Form und beeinflussen somit die zum Ablauf der Gel-Sol-Gel-Umwandlung ablaufenden Prozesse nicht. Vor allem molkenproteinhaltige Zusätze wie Molkenpulver und -konzentrate können damit als reine, kostengünstige, leicht verfügbare Füllstoffe eingesetzt werden. Bei zu hohen Temperaturen während des Schmelzprozesses können die, durch Denaturierung der Molkenproteine entstehenden, „harten Teilchen“ jedoch eine unerwünschte, sandige Konsistenz der Schmelzkäse hervorrufen. Nachteilig wirken sich

---

<sup>7</sup> Verordnung (EG) Nr. 760/2008 der Kommission der europäischen Gemeinschaften vom 31. Juli 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates hinsichtlich der Genehmigungen für die Verwendung Kasein und Kaseinaten bei der Käseherstellung

weiterhin die, in Milch- und Molkenpulver vorliegenden, hohen Lactosegehalte aus. Diese können zur Konsistenzerweichung und Viskositätsreduzierung (Strahm 2006) sowie infolge der im Schmelzprozess vorherrschenden hohen Temperaturen zur Bräunung und Karamellisierung führen. Damit verbunden treten farbliche und geschmackliche Veränderungen der Schmelzkäseprodukte auf. Durch den teilweisen oder vollständigen Entzug von Lactose in Milchproteinkonzentraten kann dieser Problematik entgegengewirkt werden.

Versuche den bislang auf etwa 4 % begrenzten Zusatz an Molkenproteinpulvern zu Schmelzkäsen durch gezielte Modifikation im Herstellungsprozess auf über 10 bis 20 % zu steigern, wurden durch Merkenich et al. bereits Mitte der 90er Jahre unternommen (Merkenich et al. 1996, Merkenich et al. 1995). In der Praxis hat sich dieses Vorgehen bislang in Folge der deutlich schlechteren Produkteigenschaften dieser Schmelzkäse nicht durchgesetzt.

### ***Milcheiweißerzeugnisse***

Als klassisch zur Schmelzkäseherstellung eingesetzte Milcheiweißerzeugnisse gelten Säurecasein, Labcasein und Natriumcaseinat. Die funktionelle Vielseitigkeit der Milcheiweißerzeugnisse führt dabei unter anderem zu einer verbesserten Konsistenz von Schmelzkäseprodukten (Miralles et al. 2006), einer erhöhten Schmelzbarkeit und verringerten Feuchtigkeitsverlusten von Käsen sowie zu einer verbesserten Gelfestigkeit in Frischkäsen (Kelly et al. 2001, Lobato-Calleros et al. 2000). Aufgrund der guten emulgierenden Wirkung können Hydrolysate dieser Produkte teilweise als Ersatz für Schmelzsalze in Schmelzkäse eingearbeitet werden (Kwak et al. 2002). Labcasein ist vergleichbar wie ein nicht gereifter Käse einsetzbar. Viel intaktes Casein und hohe Calciumgehalte führen in Schmelzkäsen bei deren Einsatz zu festen und elastischen Strukturen. Analog zu Käse ist Labcasein während des Schmelzprozesses vollständig in Natriumparacaseinat überführbar. Im Gegensatz dazu enthält Säurecasein kein Paracaseinat und nur wenig Calcium. Die guten emulgierenden Eigenschaften von Säurecasein werden heute zur Herstellung streichfähiger Schmelzkäse ausgenutzt. Bei zu hohen Caseinbeimischungen (10 %) treten als negative Begleiterscheinungen sensorische Beeinträchtigungen sowie eine Kristallisation der Caseine im fertigen Produkt auf, was einen bitteren Geschmack und eine sandige Konsistenz der Produkte nach sich zieht (Miralles et al. 2006). Versuche durch Modifikation der Caseine die eintragbaren Mengen auf bis zu 20 % bezogen auf das fertige Produkt zu erhöhen, wurden durch Merkenich et al. durchgeführt (Merkenich et al. 1995). In der Praxis hat sich dieses Vorgehen bis heute jedoch ebenso wie bei Molkenproteinpulver nicht durchgesetzt.

Neben dem Austausch der wertgebenden Käserohware durch Milchprodukte werden heute auch zunehmend pflanzliche Proteine und Öle eingesetzt. Anstelle von Käse und Magermilchpulver sind vor allem Proteine aus Soja, Sonnenblumen und Erdnüssen interessant (ElSayed 1997). In den USA sind solche Käseimitate bereits seit etwa 1970 in großen Mengen auf dem Markt. Im Gegensatz dazu ist die Akzeptanz der Verbraucher hier zu Lande eher gering. Laut Schätzungen liegt der Verbrauch an Käseimitaten in Deutschland zwischen 20.000 und 100.000 t/Jahr (Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel 2011).

Aus analytischer Sicht ist das Beimengen von Fetten und Proteinen pflanzlichen Ursprunges zu Schmelzkäsen recht einfach nachweisbar. Im Gegensatz dazu gestaltet sich die Bestimmung der in Schmelzkäse anteilig enthaltenen Käsemasse und weiterer Milchzutaten sehr schwierig. Neben der komplexen Matrix und den während des Schmelzens ablaufenden Reaktionen, welche zu Veränderungen der Inhaltsstoffe führen können, liegt die Hauptschwierigkeit in der Unterscheidung der aus dem identischen Grundstoff Milch gewonnen Käserohware und den Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweißerzeugnissen. Bisherige Versuche, die genaue Zusammensetzung von Schmelzkäsen zu bestimmen, beruhten zumeist auf der Analyse einzelner proteinchemischer Parameter (Miralles et al. 2006). Diese führten jedoch bislang zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit als neue Strategie eine Multikomponentenanalyse in Kombination mit multivariater Datenanalyse diskutiert wird. Im Folgenden sollen die gewählten chemischen Parameter und deren Charakteristika erläutert werden.

### **2.3 Analytische Marker zur Kompositionsermittlung von Schmelzkäse**

Der Fokus einer Produktverfälschung bei Milch und Milcherzeugnissen richtet sich zur Zeit hauptsächlich auf den Ersatz von Fett- und Proteinanteilen, die Mischung von Milchsorten unterschiedlicher Spezies, den Zusatz billiger Füllstoffe auf Milchbasis zur Ausbeuteerhöhung sowie die falsche Deklaration von Produkten geschützter geografischer Herkunft (De la Fuente et al. 2005). Für Schmelzkäse, welcher zum Hauptteil aus qualitativ hochwertiger und teurer Schmelzrohware besteht, ist dabei v.a. der Ersatz dieser durch billigere Füllstoffe auf Milchbasis von Interesse. Als preisgünstige Füllstoffe werden hauptsächlich die im vorherigen Abschnitt (2.2.4.3) aufgelisteten Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweißerzeugnisse eingesetzt. Der analytische Nachweis dieser Produkte in Schmelzkäsen ist jedoch schwierig und bislang nicht eindeutig möglich. Prinzipiell bestehen drei unterschiedliche Möglichkeiten zur Identifizierung einer Produktverfälschung in Lebensmitteln. Dazu zählen die Bestimmung eines charakteristischen, chemischen Parameters des Zusatzes, die Analyse

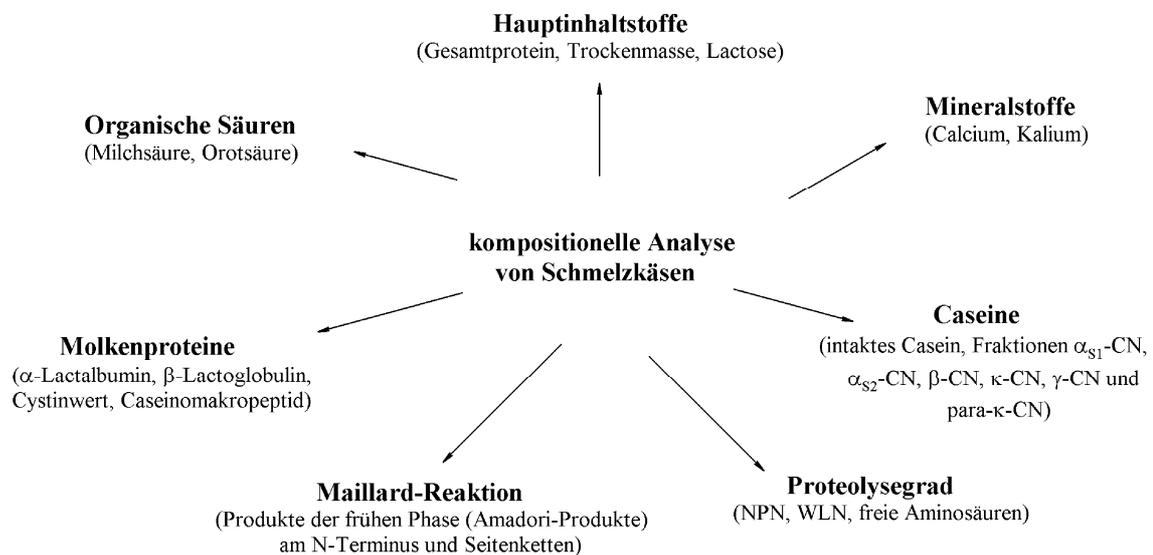
vieler chemischer Parameter des Produktes und die statistische Auswertung dieser sowie die Analyse der Veränderungen von physikochemischen Eigenschaften des Produktes nach Zusatzbeimengung (Cordella et al. 2002).

Für die interessierenden Füllstoffe sind im Sektor der Milch und Milcherzeugnisse bislang ausschließlich Verfahren zur Analyse eines charakteristischen, chemischen Parameters zum Nachweis eines solchen Zusatzes zum jeweiligen Produkt etabliert worden. Für den Zusatz von Molke zum jeweiligen Produkt wird beispielsweise der Gehalt an Caseinomakropeptid (CMP) analysiert. Für den eindeutigen Nachweis eines Molkezusatzes zu Milch und Milchpulvern wurden chromatographische, elektrophoretische und immunologische Analysenverfahren zur Quantifizierung von CMP erfolgreich angewendet (Montanez et al. 2000, Chavez et al. 2008, Ramirez Ayala et al. 2009). Ebenso konnte ein Zusatz an Molke zu Margarine mittels der Gehalte an Sialinsäure, welche charakteristisch für CMP ist, nachgewiesen werden (Nakano et al. 2006).

Ein Casein- und Caseinzusatz wurde bislang erfolgreich über den Anteil an intaktem  $\kappa$ -CN in Modell-Schmelzkäsen bekannter Zusammensetzung nachgewiesen (Miralles et al. 2006, Miralles et al. 2000). Für Labcasein, welches kein intaktes  $\kappa$ -CN mehr enthält, konnte ebenso in Modell-Schmelzkäsen anhand des Verhältnisses aus  $\beta$ -CN A zu para- $\kappa$ -CN eine Beimischung dieses Zusatzes ermittelt werden (Miralles et al. 2006). Außerdem konnte Meisel bereits 1995 den Zusatz an Casein zu Milchprodukten anhand des veränderten Verhältnisses aus Casein zu Molkenprotein nachweisen (Meisel 1995). Neben diesen proteinbasierten Nachweisverfahren wurden für Pasta-Filata und Halloumi Käse die chemischen Marker Furosin und Lysinalanin zur Abgrenzung eines Zusatzes an Casein und/oder Trockenmilchpulver etabliert (Pellegrino et al. 1996, Pellegrino et al. 2010, Calabrese et al. 2009). Eine Anwendung dieser Marker zum Nachweis des Zusatzes an Casein und/oder Trockenmilchpulver in Schmelzkäsen ist jedoch schwierig, da durch die thermische Belastung während des Schmelzprozesses eine Neubildung dieser Substanzen nicht ausgeschlossen werden kann.

Zur Analyse der Zusammensetzung des komplexen Lebensmittels Schmelzkäse wird allein anhand der bislang dargelegten Messparameter kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden können. Dies konnte Bong im Rahmen einer Diplomarbeit, welche sich mit der kompositionellen Analyse von Modell-Schmelzkäsen anhand proteinchemischer Marker beschäftigte, zeigen (Bong 1997). Aufbauend auf den genannten Arbeiten soll im Folgenden nun durch die Kombination verschiedenster, analytischer Messgrößen und deren anschließender gemeinsamer mathematischer Auswertung eine Bestimmung der kompositionellen Zusammensetzung von Schmelzkäsen angewendet werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Abgrenzung der Schmelzrohware Käse von

den zum Schmelzkäseprodukt zugesetzten Trockenmilch-, Molke- und Milcheiweiß-erzeugnissen gelegt, da diese in Folge ökonomischer und technologischer Entwicklungen der letzten Jahrzehnte stetig an Bedeutung als Inhaltstoffe für Schmelzkäse- und Schmelzkäsezubereitungen zugenommen haben. In Abbildung 2.9 sind die im Rahmen der Arbeit ausgewählten, analytischen Messgrößen schematisch zusammengestellt. Diese heterogenen Markersubstanzen können in die Gruppen der Hauptinhaltsstoffe, der Mineralstoffe, der organischen Säuren, der Caseine, der Molkenproteine, des Proteolysegrades sowie der Maillard-Reaktionsprodukte eingeteilt werden. Nachfolgend sollen die gewählten, analytischen Messgrößen hinsichtlich der jeweils ausschlaggebenden Auswahlkriterien sowie deren Analytik kurz diskutiert werden.



**Abb. 2.9** Darstellung der gewählten analytischen Kenngrößen zur Ermittlung der Zusammensetzung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen [CN – Casein, NPN – Nicht-Protein-Stickstoff, WLN-wasserlöslicher Stickstoff].

### 2.3.1 Hauptinhaltsstoffe, Mineralstoffe und organische Säuren

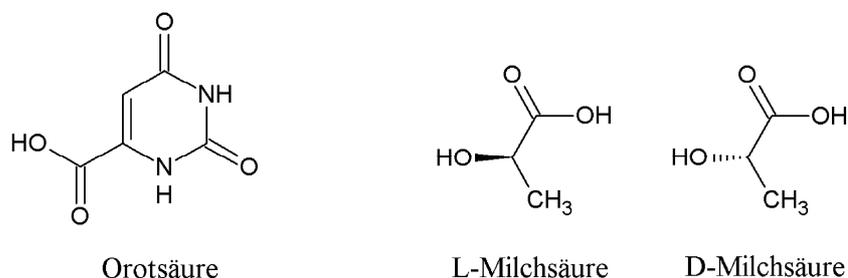
#### *Hauptinhaltsstoffe*

Zur Gruppe der Hauptinhaltsstoffe wird in der vorliegenden Arbeit neben dem Protein- und Trockenmassegehalt auch der Lactosegehalt von Schmelzkäsen gezählt. Rückschlüsse auf die Rezeptur von Schmelzkäsen sind im Falle von deutlich erhöhten Protein- und Trockenmassegehalten, hervorgerufen durch den vermehrten Einsatz von Milcheiweiß-erzeugnissen (mind. 79 % Protein, max. 8 % Wasser), zu ziehen (Souci et al. 2008). Lactose in Schmelzkäsen weist dagegen auf den Einsatz von Trockenmilch- und/oder Molkeerzeugnissen hin. Diese enthalten 50 bzw. 68 g Lactose / 100 g Trockenmasse. Käse und Milcheiweiß-erzeugnisse sind dagegen nahezu frei von Lactose

(Souci et al. 2008). Analytisch erfasst werden diese Parameter anhand der in den Kapiteln 3.5.1, 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen Methoden.

### **Organische Säuren**

Bei Orotsäure, einem Zwischenprodukt des Pyrimidinstoffwechsels, handelt es sich um einen originären Bestandteil von Milch (**Abb. 2.10**), welcher natürlichen Schwankungen unterliegt, die v.a. durch die Kuhrasse, eine jahreszeitlich variierende Fütterung und die Laktationsphase hervorgerufen werden (Buiarelli et al. 2003). Infolge der guten Löslichkeit in wässrigen Medien wird der größte Teil der Orotsäure nach der Bruchbearbeitung mit der Molke abgetrennt. In Käsen sind demnach sehr niedrige Gehalte zu finden (0,016 - 0,1 mg / g Produkt bzw. 4 – 20 mg / 100 g TM) (Dinkci et al. 2007, Tormo et al. 2004), welche zudem Veränderungen während der Reifung unterliegen können (Akalin et al. 2002). Vergleichbar niedrige Orotsäuremengen sind in Caseinen zu erwarten. Im Gegensatz dazu weisen Milchpulver und Molkepulver deutlich höhere Gehalte an Orotsäure auf (bis zu 87 mg / 100 g TM) (Tormo et al. 2004), was sich beim Zusatz dieser zu Schmelzkäsen in ansteigenden Orotsäurekonzentrationen bemerkbar machen sollte. Für Schmelzkäse mit hohen Casein- und Käseanteilen ist demgegenüber mit niedrigeren Orotsäuregehalten zu rechnen. Analytisch erfasst wird Orotsäure unter anderem mittels RP-HPLC (Tormo et al. 2004).



**Abb.2. 10** Strukturformeln organischer Säuren.

Im Gegensatz zur Orotsäure wird Milchsäure (**Abb. 2.10**) erst durch die, bei der Käseherstellung verwendeten, Starterkulturen aus Lactose gebildet (McSweeney et al. 2004a). Weder Milcheiweißerzeugnisse noch Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse weisen infolgedessen nennenswerte Gehalte dieser organischen Säure auf. Eine Abgrenzung des Käseanteiles sollte in Schmelzkäsen damit möglich sein. Zur Quantifizierung wird auf eine einfache, enzymatische Bestimmungsmethode verwiesen (vergleiche dazu Abschnitt 3.5.4).

### ***Mineralstoffe***

Neben vielen weiteren in Milch und Milcherzeugnissen vorhandenen Mineralstoffen werden im Rahmen der Arbeit Calcium und Kalium als Marker für Käse und Casein bzw. „Molke“ herangezogen. Besonders Kalium scheint zur Bestimmung der Gehalte an Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen in Schmelzkäsen geeignet zu sein, da Käse, Lab- und Säurecasein wenig Kalium enthalten (< 500 mg K / 100 g Produkte). Im Gegensatz dazu weisen Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse drei- bis vierfach so hohe Kaliumgehalte auf (>1500 bis 2200 mg K / 100 g Produkt). Sehr hohe Kaliumgehalte in Schmelzkäsen deuten somit auf einen Zusatz dieser Produkte hin. (Souci et al. 2008)

Für Calcium, welches in Milchprodukten zumeist gebunden an Caseine vorliegt, ist ein teilweise gegenläufiger Trend festzustellen. Bei einem Zusatz von Trockenmilch-, Molkeerzeugnissen oder Käse zu Schmelzkäsen wird der Calciumgehalt nicht merklich verändert. Alle diese Rohwaren weisen Calciumgehalte zwischen 900 mg bis 1500 mg / 100 g Produkt auf. Säurecaseine enthalten hingegen max. 500 mg Calcium / 100 g Produkt. Bei deren Einsatz in Schmelzkäsen sollte daher eine Verringerung des Calciumgehaltes resultieren. Für Labcaseine, welche teilweise bis zu 2500 mg Calcium / 100 g Produkt enthalten, ist hingegen eine Erhöhung der Calciumgehalte beim Einsatz im Schmelzkäse zu erwarten. (Souci et al. 2008)

Analytisch erfasst werden die Calcium- und Kaliumgehalte mittels potentiometrischer Analyseverfahren (Abschnitt 3.5.6).

### **2.3.2 Caseine und Molkenproteine**

Milchproteine können in die 2 Hauptfraktionen Caseine (CN), welche etwa 80 % der Proteine der Milch ausmachen und Molkenproteine (MPr) (etwa 20 %) unterteilt werden. Daneben befinden sich noch Enzyme und Minor Komponenten in Milch, die zum Teil wichtige biologische und ernährungsphysiologische Funktionen übernehmen. Einen zusammenfassenden Überblick über diese heterogenen Gruppen gibt Tabelle 2.3. Das Hauptaugenmerk ist dabei auf die Fraktionen der Caseine und Molkenproteine gelegt worden.

Als globuläre Proteine weisen Molkenproteine eine ausgeprägte Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur auf, was sie wasserlöslich und hitzedenaturierbar macht. Caseine hingegen sind durch eine aufgelockerte, flexible Struktur mit wenig ausgeprägten sekundären und tertiären Strukturbereichen, bedingt durch viele, gleichmäßig über die Polypeptidkette verteilte Prolinreste, gekennzeichnet. Als charakteristische Eigenschaften der Caseine resultieren daraus eine geringe Wasserlöslichkeit, hohe Hitzestabilität und Hydrophobizität.

**Tab. 2.3** Proteinfractionen der Kuhmilch. Angabe prozentualer Anteile, chemischer und physikalischer Besonderheiten mengenmäßig dominierender Proteine. (Hui, 2006, Fox, 2004, Swaisgood, 1982) [AS – Aminosäuren, CN – Casein, LA-Lactalbumin, LG - Lactoglobulin]

Hauptgruppen	Vertreter	wichtige Charakteristika
Caseine (CN) (etwa 80 %)	$\alpha_{S1}$ -CN (38 %)	23.6 kDa, 199 AS, geringe Sensitivität gegenüber Chymosin, Ca-sensitiv, keine Disulfidbrücken, stark phosphoryliert, 9 genetische Varianten
	$\alpha_{S2}$ -CN (10 %)	25.2 kDa, 207 AS, keine Sensitivität gegenüber Chymosin, Ca-sensitiv, eine Disulfidbrücke, stark phosphoryliert, 4 genetische Varianten
	$\beta$ -CN (35 %)	24 kDa, 209 AS, geringe Sensitivität gegenüber Chymosin, Ca-sensitiv, keine Disulfidbrücke, z.T. phosphoryliert, 15 genetische Varianten
	$\kappa$ -CN (15 %)	19 kDa, 169 AS, hohe Sensitivität gegenüber Chymosin, nicht Ca-sensitiv, eine Disulfidbrücke, wenig phosphoryliert, 13 genetische Varianten, z. T. glycosyliert
Molkenproteine (etwa 20 %)	$\alpha$ -Lactalbumin (LA)	14.2 kDa, 123 AS, 4 Disulfidbrücken, nicht phosphoryliert, nicht glycosyliert
	$\beta$ -Lactoglobulin (LG)	18.4 kDa, 162 AS, 2 Disulfidbrücken
	Serumalbumin	66 kDa, 582 AS, 17 Disulfidbrücken, Transport-protein
	Immunglobuline	150 – 450 kDa; Schutz gegen mikrobielle Krankheitserreger und Toxine
Enzyme	Lipase, Plasmin, Phosphatase, Lactoperoxidase, Xanthinoxidase	
Minorkomponenten (etwa 0,1 %)	metall- und vitaminbindende Proteine, Wachstumsfaktoren, Glycoproteine	

In Folge der unterschiedlichen strukturellen und chemisch-physikalischen Eigenschaften lassen sich die beiden Hauptfraktionen der Milchproteine leicht voneinander separieren. Zur analytischen Unterscheidung beider Proteine eignet sich neben elektrophoretischen, chromatographischen und immunologischen Verfahren auch der Cystinwert. Dieser ist ein Maß für das anteilig in Proteinen enthaltene Cystin und Cystein, welche zur Bestimmung des Molkenproteinanteiles herangezogen werden können (Spencer et al. 1969) (siehe dazu auch Tabelle 2.3). Molkenproteine weisen mit etwa 2,4 g / 100 g Protein einen um den Faktor acht höheren Cystin- und Cysteingehalt als Caseine auf (Töpel 2004). Angewendet wird dies u.a. zur Abschätzung des Molkenproteinanteiles in Speisequark (Lechner et al. 1985). Zur Bestimmung des

Molkenproteinanteiles in Schmelzkäsen kann weiterhin der Cystinwert angewendet werden. Damit erhält man einen Marker, der direkt auf den Zusatz von Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen hinweist, da Molkenproteine weder in Käsen noch Milcheiweißerzeugnissen enthalten sind.

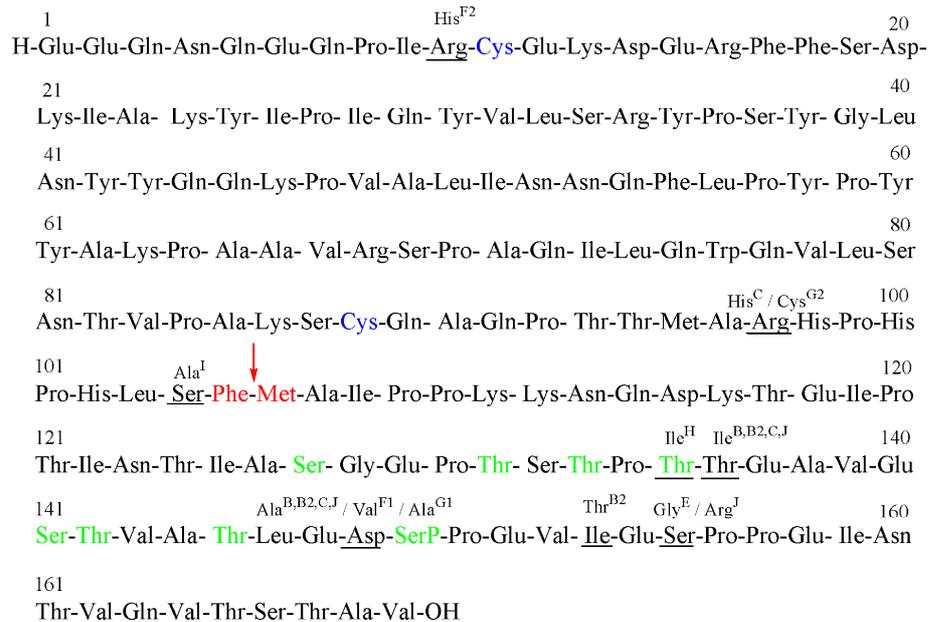
Weitere charakteristische proteinchemische Marker zur Unterscheidung der Rohwarenanteile in Schmelzkäsen sind neben Casein- und Molkenproteinanteilen, deren Fraktionen ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG) sowie para- $\kappa$ -CN und CMP. In der vorliegenden Arbeit bilden diese das analytische Grundgerüst, in welches alle weiteren Messgrößen Erkenntnis-orientiert eingegliedert werden sollen. Zur direkten Abgrenzung einer Schmelzkäserohware sind diese, abgesehen von den Molkenproteinen und deren Hauptfraktionen  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG, nur begrenzt geeignet, da sowohl Käse und Milcheiweißerzeugnisse als auch Milchpulver zum großen Teil aus Caseinen bestehen.

Das Potential als alleinige Marker zur Unterscheidung der Schmelzkäserohwaren Käse, Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse herangezogen zu werden, haben hingegen intaktes  $\kappa$ -CN, para- $\kappa$ -CN und CMP. Auf spezielle Proteincharakteristika sowie die Bedeutung und Analytik dieser zur Ermittlung der Rezeptur von Schmelzkäsen wird im nachfolgenden Abschnitt gesondert eingegangen.

Quantitativ erfasst werden die oben aufgeführten proteinchemischen Messgrößen nach elektrophoretischer Trennung und densitometrischer Auswertung (3.5.10). Die Bestimmung des Cystinwertes erfolgt mittels Aminosäureanalyse nach vorheriger Oxidation des Cystins und Cysteins zur Cysteinsäure und anschließender Säurehydrolyse (3.5.12).

### 2.3.2.1 Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und $\kappa$ -Casein

Die heterogene Gruppe der  $\kappa$ -Caseine besteht zu über 50 % aus einem kohlenhydratfreiem Hauptbestandteil und mindestens 6 weiteren Minorkomponenten, welche unterschiedlich stark glycosyliert und phosphoryliert vorliegen können (Farrell et al. 2004, Pujolle et al. 1966, Vreeman et al. 1977). Die eigentliche Funktion der Stabilisierung von Caseinmicellen in Milch scheint dabei durch den Grad der Glycosylierung unbeeinflusst zu sein (Doi et al. 1979, Woychik et al. 1966). Ganz anders verhält es sich mit der Empfindlichkeit der Chymosinspaltbarkeit, welche bei steigendem Glycosylierungsgrad herabgesetzt wird (Shammet et al. 1992). Im Zeitraum von 1964 bis 1999 wurden bislang insgesamt 13 genetische Varianten des  $\kappa$ -Caseins entdeckt. Die beiden zuerst beschriebenen und am häufigsten vorkommenden genetischen Varianten sind A und B (Neelin 1964, Woychik 1964). Die Primärsequenz von 169 Aminosäuren, verdeutlicht durch Abbildung 2.11 der genetischen Variante A-1P, weist ein Molekulargewicht von circa 19 kDa auf (Swaigood 1992).



**Abb. 2. 11** Primärstruktur des  $\kappa$ -Caseins A-1P. (Markierung: rot – Spaltstelle für Chymosin, relevant zur Käseherstellung; blau – 2 im Molekül enthaltene Cysteinreste; grün – Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen; unterstrichen – Positionen an denen sich die 12 weiteren genetischen Varianten des  $\kappa$ -Caseins unterscheiden, Genetische Varianten und deren abweichende AS-Sequenz: A – graphisch abgebildet, B – Ile<sup>136</sup>/Ala<sup>148</sup>, B2 – Ile<sup>136</sup>/Ala<sup>148</sup>/Thr<sup>153</sup>, C – Ile<sup>136</sup>/Ala<sup>148</sup>/His<sup>97</sup>, E – Gly<sup>155</sup>, F1 – Val<sup>148</sup>, F2 – His<sup>10</sup>, G1 – Ala<sup>148</sup>, G2 – Cys<sup>97</sup>, H – Ile<sup>135</sup>, I – Ala<sup>104</sup>, J – Arg<sup>155</sup>

Der Hauptteil der genetischen Modifikationen liegt im C-Terminus zwischen den Aminosäuren Ile<sup>135</sup> und Ser<sup>155</sup> lokalisiert. Diese beeinflussen die Hydrolyse der spezifischen Spaltstelle für Chymosin zwischen den Aminosäuren Phe<sup>105</sup> – Met<sup>106</sup> nicht nachteilig. Im Gegensatz dazu bewirken die Modifikationen der genetischen Varianten C, F2, G1 und I, welche zwischen den Aminosäuren Arg<sup>10</sup> und Ser<sup>104</sup> lokalisiert sind, eine Beeinträchtigung der Chymosinspaltbarkeit (Farrell et al. 2004). Bei der Isolierung aus Milch liegt  $\kappa$ -Casein zumeist als Dimer bis Octamer verknüpft über Disulfidbrücken (Cys<sup>11</sup> – Cys<sup>88</sup>) vor (Swaisgood et al. 1964). Die Quervernetzung über Glycosylreste, welche vermutlich Serin- und Threoninreste miteinander verknüpfen, konnte ebenso nachgewiesen werden (Kanamori et al. 1981).

Die Behandlung von Milch mit Chymosin (EC 3.4.23.4) resultiert spezifisch in einer Spaltung der Peptidbindung zwischen Phe<sup>105</sup> und Met<sup>106</sup> des  $\kappa$ -Casein-Moleküles (Delfour et al. 1965). Es entsteht zum einen ein sehr gut wasserlösliches Peptidfragment mit 64 Aminosäuren (Met<sup>106</sup> – Val<sup>169</sup>), welches als Caseinomakropeptid bezeichnet wird. Zum anderen wird ein Ca<sup>2+</sup>-sensitives Hydrolyseprodukt mit 105 AS para- $\kappa$ -Casein (Glu<sup>1</sup> – Phe<sup>105</sup>) gebildet (vergl. dazu **Abb. 2.11**), dessen Molekulargewicht von Brington 1972 zu circa 12.3 kDa bestimmt wurde (Brignon et al. 1972).

CMP liegt zu etwa 35-40 % nicht glycosyliert vor (Vreeman et al. 1986). Die restlichen 60-65 % der CMP-Varianten weisen unterschiedliche Glycosylierungs- und

Phosphorylierungsgrade auf. So konnten bislang beispielsweise 14 unterschiedlich glycosylierte Varianten des CMP A identifiziert werden (Molle et al. 1995). Die Molekulargewichte der nicht glycosylierten hauptsächlich vorkommenden Varianten CMP-A und CMP-B wurden zu 6787 bzw. 6755 Da ermittelt (Swaigood 1975). Technologisch relevant sind vor allem die guten emulsions- und schaumstabilisierenden Eigenschaften, welche hauptsächlich durch die gebundenen Zuckerreste verursacht werden (Kulozik et al. 2003).

Angewendet wird die Spaltbarkeit von  $\kappa$ -Casein durch Chymosin beispielsweise bei der Herstellung von Labkäse. Die Koagulierung der Caseinmicellen tritt dabei durch Verlust der stabilisierenden Eigenschaft von  $\kappa$ -Casein infolge der enzymatischen Spaltung in CMP und para- $\kappa$ -Casein ein (Crabbe 2004). Die Freisetzung von etwa 98 % des CMP ist mit der visuellen Koagulierung des Käsebruches abgeschlossen (Lieske et al. 1996). Im Folgenden wird der gebildete Käsebruch durch Abpressen von der Molke abgetrennt, wobei CMP nahezu vollständig in die Molke übergeht (De la Fuente et al. 2005), weshalb weder in Käsen, noch Trockenmilch- und Milcheiweißerzeugnissen nennenswerte Mengen an CMP zu finden sind. Dieses Peptid kann somit als potentieller Marker zur Bestimmung des Molkeerzeugnis-Zusatzes zu Schmelzkäsen herangezogen werden. Vergleichbare Untersuchungen zur Bestimmung des Molkezusatzes über den Gehalt an CMP wurden bislang lediglich für Milch, Milchpulver und Margarine etabliert, wobei z.T. unterschiedliche Analyseverfahren angewendet wurden (Montanez et al. 2000, Chavez et al. 2008, Ramirez Ayala et al. 2009, Nakano et al. 2006).

Im Gegensatz dazu verbleibt para- $\kappa$ -Casein vollständig im Käsebruch und wird auch im Verlauf der Käsereifung kaum weiter hydrolysiert (Kobayashi et al. 1985). Als Marker für Käse und Labcasein, welches ebenso durch eine enzymatische Behandlung mit Chymosin aus Milch gewonnen wird, kann dieses Peptid demnach herangezogen werden, da es weder in Molke, Molke- und Trockenmilcherzeugnissen noch säuregefällten Milcheiweißerzeugnissen enthalten ist. Ein Zusatz an Käse und mittels Labfällung hergestelltem Casein zu Schmelzkäsen resultiert somit in einem Eintrag an para- $\kappa$ -Casein. Intaktes  $\kappa$ -Casein wird hingegen weder durch die zu Schmelzkäse zugesetzten Käse, Labcaseine oder Molkeerzeugnisse eingebracht. Allein durch den Zusatz von Trockenmilch- und säuregefällten Milcheiweißerzeugnissen (Säurecasein) ist ein Eintrag dieser Caseinfraktion zu Schmelzkäsen zu erwarten. Vergleichbare Untersuchungen zur Quantifizierung eines Casein- und Caseinzusatzes über den Anteil an intaktem  $\kappa$ -CN wurden bislang erfolgreich in Modell-Schmelzkäsen bekannter Zusammensetzung durchgeführt (Miralles et al. 2006, Miralles et al. 2000).

Analytisch erfasst werden intaktes  $\kappa$ -Casein und para- $\kappa$ -Casein mittels elektrophoretischer Methoden. Zur Bestimmung von CMP wurde eine RP-HPLC/UV-Methode angelehnt an Thoma et al. (2006) etabliert. Nach Erweiterung der

Probenvorbehandlung um eine enzymatische Hydrolyse mit Chymosin eignet sich diese Methode ebenso zur indirekten Bestimmung von intaktem  $\kappa$ -Casein (Abschnitt 3.5.11).

### 2.3.3 Ermittlung des Proteolysegrades

Zur Verfolgung der proteolytischen Vorgänge - speziell in Milchprodukten - ist eine Vielzahl chromatographischer und spektroskopischer Methoden etabliert worden. Basierend auf der Spaltung von intakten Caseinmolekülen durch Proteasen und Peptidasen wird dabei die fortschreitende Proteolyse anhand der Entstehung von Peptiden und freien Aminosäuren bewertet. Zur Unterscheidung der in Schmelzkäse eingesetzten Rohwaren werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Proteolyseparameter die Summenparameter Nicht-Proteinstickstoff (NPN) und wasserlöslicher Stickstoff (WLN) sowie die freien Aminosäuren analysiert. Ein hoher Proteolysegrad in Schmelzkäsen, welcher durch hohe NPN-, WLN- und freie Aminosäuregehalte gekennzeichnet ist, deutet dabei direkt auf den Einsatz gereiften Käses hin. Demgegenüber sollten Schmelzkäserezepturen mit niedrigen Proteolysegraden durch den Zusatz an Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen gekennzeichnet sein. Abhängig vom Reifegrad der Käse unterliegen die Proteolyseparameter jedoch erheblichen Schwankungen. Sehr junge, wenig gereifte Käse können dabei beispielsweise niedrige NPN-, WLN- und Aminosäuregehalte vergleichbar mit Milcheiweiß aufweisen. Molkenprotein-haltige Schmelzkäseproben, denen Magermilch- und / oder Molkenpulver zugesetzt wurden, weisen im Gegensatz dazu erhöhte WLN-Gehalte auf (Bong 1997), da Molkenproteine infolge der chemisch-physikalischen Eigenschaften nicht vollständig während der Probenaufarbeitung abgetrennt werden. Die Gehalte an NPN und Aminosäuren sinken hingegen in diesen Schmelzkäsen ab.

#### *Nicht-Protein-Stickstoff und wasserlöslicher Stickstoff*

Bereits 1985 wurde von Church et al. eine einfache, spektroskopische Methode zur Bestimmung freier Aminogruppen in Milchprodukten etabliert (Church et al. 1985). Diese beruht auf der Reaktion von ortho-Phthaldialdehyd (OPA) mit freien, primären Aminogruppen von Peptiden, Proteinen und Aminosäuren zu Indolverbindungen, welche im Anschluss photometrisch bei 340 nm quantifiziert werden können (Abschnitt 3.5.8). Zur Bestimmung der Art des Proteinabbaus werden mittels dieser Methode neben dem  $OPA_{NPN}$ , welcher den Abbau der Proteine durch Proteasen in die Tiefe beschreibt, auch der  $OPA_{WLN}$ , welcher im Gegensatz zum  $OPA_{NPN}$  den Abbau der Proteine durch Peptidasen in die Breite charakterisiert, angewendet. Die Summe aus kleinen bis mittleren Peptiden und freien Aminosäuren wird durch den NPN, der als die in 12%iger Trichloressigsäure lösliche Fraktion definiert ist, repräsentiert. Die WLN-Fraktion,

welche alle bei pH 4,6 löslichen Komponenten enthält, beinhaltet zusätzlich zum NPN noch größere Peptide und lösliche Proteine. Vorteile der OPA-Methode liegen vor allem in der einfachen und kostengünstigen Durchführung begründet. Nachteilig wirkt sich hingegen die begrenzte Aussagekraft der erhaltenen Summenparameter aus.

### ***Bestimmung der freien Aminosäuren***

Neben der Bestimmung des NPN und WLN können ebenso der Anstieg freier Aminosäuren und deren Gesamtgehalt in Milchprodukten als Marker der stattgefundenen Proteolyse angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gehalte an freien Aminosäuren nach Abtrennung der Proteinfractionen mittels Aminosäureanalyse (ASA), einer Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung, quantifiziert (Abschnitt 3.5.9) (Henle et al. 1991, Krause et al. 2003). Vorteile dieses im Vergleich zur OPA-Methode weitaus gerätetechnisch aufwendigeren und kostenintensiveren Verfahrens liegen in der Qualität und Aussagekraft der erzielbaren Ergebnisse begründet.

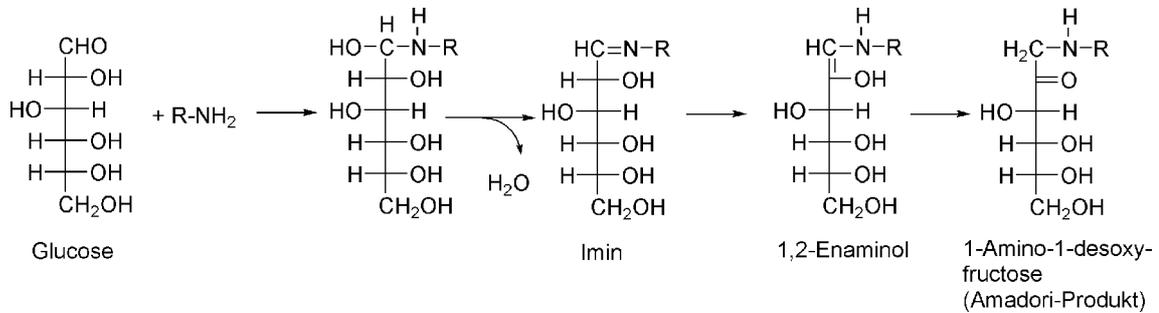
### **2.3.4 Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen und deren Rolle zur kompositionellen Ermittlung von Schmelzkäse**

Die Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminokomponenten von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen führt zur Bildung eines komplexen Spektrums an Verbindungen. Erstmals beschrieben wurde diese Reaktion 1912 vom französischen Biochemiker Louis-Camille Maillard, welcher die bei der Erhitzung von Glycin und Glucose auftretende Braunfärbung untersuchte (Maillard 1912). Bereits kurze Zeit später erkannte er die zentrale Bedeutung dieser Reaktion und diskutierte sie im Zusammenhang mit der Bräunung von Lebensmitteln und einer möglichen Relevanz für *in vivo* ablaufende Veränderungen (Maillard 1917, Maillard 1916). Ihm zu Ehren werden die ablaufenden Reaktionen bis heute unter dem Begriff Maillard-Reaktion zusammengefasst. Zur besseren Veranschaulichung der komplexen Reaktionsabfolge wird diese bis heute in die 3 Stadien frühe, fortgeschrittene und finale Phase unterteilt, wobei die Übergänge zwischen diesen infolge der Heterogenität und Komplexität der involvierten chemischen Reaktionen nicht als abgetrennt, sondern fließend zu betrachten sind (Hodge 1953). Eine zusammenfassende Darstellung ausgewählter Reaktionen soll im folgenden Abschnitt (2.3.4.1) gegeben werden.

#### ***2.3.4.1 Die Maillard-Reaktion im Überblick***

Zu Beginn der frühen Phase der Maillard-Reaktion werden nach nucleophiler Addition der freien Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen an die Carbonylfunktion reduzierender Zucker, unter Eliminierung von Wasser, instabile Imine

gebildet, welche im Folgenden durch Umlagerungsreaktionen (Keto-Enol-Tautomerie) zu ersten stabilen Intermediaten – den Enaminolen – führen. Im Falle von Aldosen werden nach anschließender Amadori-Umlagerung 1-Amino-1-desoxyketosen (Amadori-Produkte, AP) gebildet. In nachfolgend dargestellter Grafik (Abb. 2. 12) ist dies exemplarisch für die Bildung von 1-Amino-1-desoxyfructose dargestellt.

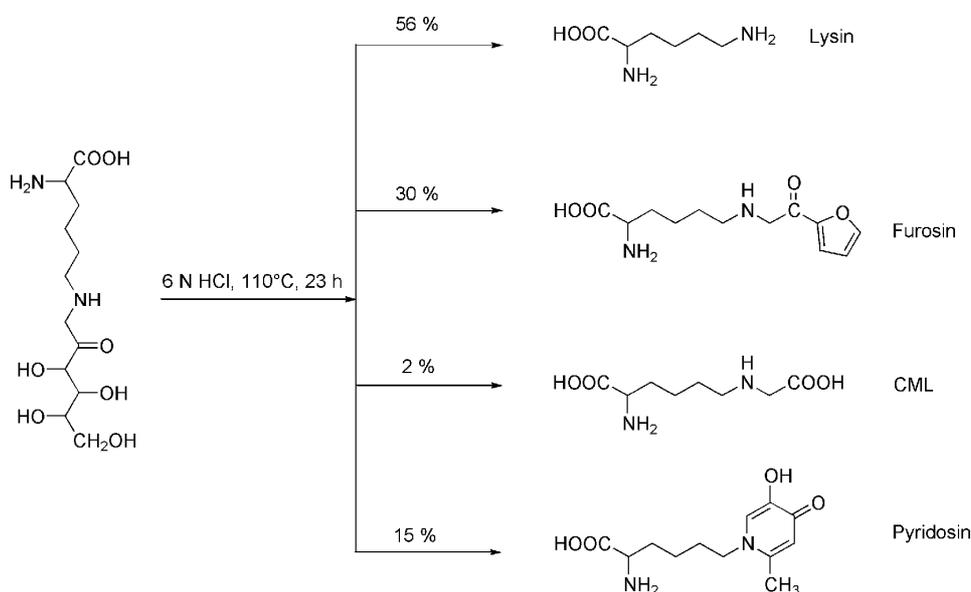


**Abb. 2. 12** Bildung von Amadori-Produkten am Beispiel der 1-Amino-1-desoxyfructose.

Im Gegensatz dazu reagieren Ketosen nach Umlagerung zu 2-Amino-2-desoxyaldosen (Heyns-Produkte). Amadori- und Heyns-Produkte stellen die ersten stabilen Zwischenprodukte der frühen Phase der Maillard-Reaktion dar und können als Maß für deren Ablauf und Fortschritt herangezogen werden. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Milch- und Molkeerzeugnisse sind nur Amadori-Produkte von Bedeutung, da in Milch nur Aldosen (Lactose, Galactose, Glucose) natürlich vorkommen. In der sich anschließenden, fortgeschrittenen Phase reagieren Amadori-Produkte zumeist unter Abspaltung der Aminokomponente zu hoch reaktiven 1,2-Dicarbonylen weiter. Die Umlagerung zum Enaminol erfolgt dabei pH-Wert-abhängig. Bei pH-Werten im neutralen bis sauren Bereich wird bevorzugt das 1,2-Enaminol gebildet, welches weiter zum 3-Desoxyoson reagiert. Unter basischen Milieubedingungen liegt das Gleichgewicht auf der Seite des 2,3-Enaminols, das zum 1- bzw. 4-Desoxyglucoson weiter reagiert. Unter oxidativen Bedingungen können Desoxyglucosone durch Retroaldolspaltung weiter in kürzere 1,2-Dicarbonyle fragmentiert werden. Bedeutende Vertreter dieser hochreaktiven Intermediate sind Glyoxal und Methylglyoxal. Die Finale Phase der Maillard-Reaktion führt schließlich vor allem zur vielfältigen und komplexen Weiterreaktion der zuvor gebildeten Intermediate. Bedeutsam zur Ausprägung des Geschmacks, des Aromas und der Farbe von Lebensmitteln sind in diesem Zusammenhang vor allem die Abbau- und Polymerisierungsreaktionen, welche eine Vielzahl unterschiedlicher Folgeprodukte generieren, die auch als *advanced glycation endproducts* (AGEs) bezeichnet werden. Neben aromaaktiven Aldehyden werden vor allem stickstoffhaltige Heterozyklen sowie hochmolekulare, stark gefärbte Verbindungen, welche als Melanoidine bezeichnet werden, gebildet.

## 2.3.4.2 Bedeutung der frühen Phase der Maillard-Reaktion in Milcherzeugnissen

In nahezu allen erhitzten, prozessierten und gelagerten Lebensmitteln entstehen im Zuge der Maillard-Reaktion die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Reaktionsprodukte aus reduzierenden Zuckern und Aminokomponenten. Neben der erwünschten Bildung von Aroma-, Farb- und Geschmackskomponenten (Angrick et al. 1980) hat diese Reaktion auch negative Auswirkungen, welche die Entstehung toxischer Substanzen (z.B. Acrylamid) sowie die Verringerung der biologischen Wertigkeit von Proteinen, infolge der Blockierung essentieller Aminosäuren, beinhaltet (Ledl et al. 1990, Mottram et al. 2002). Je nach Dauer der thermischen Belastung oder Lagerung von Lebensmitteln sind entweder vermehrt Produkte der frühen oder finalen Phase zu finden. Als Marker der frühen Phase der Maillard-Reaktion und zur Bestimmung einer thermischen Belastung von Lebensmitteln wird bereits seit vielen Jahren der Furosingehalt herangezogen (Erbersdobler et al. 2007). Furosin [ $N^{\epsilon}$ -(2-Furoylmethyl)-lysin] wird dabei während der definierten Salzsäurehydrolyse aus den korrespondierenden Amadori-Produkten, welche an der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Seitenkette von Lysin gebundenen sind, gebildet. Als Nebenprodukte der sauren Hydrolyse von Amadori-Produkten entstehen, abhängig von der eingesetzten Salzsäurekonzentration, der Dauer und Temperatur, neben Furosin noch Pyridosin,  $N^{\epsilon}$ -Carboxymethyllysin (CML) und die korrespondierende Aminosäure (Krause 2005). Beispielhaft ist dies in Abbildung 2.13 für die Umsetzung von Fructoselysin dargestellt.



**Abb. 2.13** Darstellung des nach saurer Hydrolyse aus dem Amadori-Produkt Fructoselysin gebildeten Produktspektrums (Krause 2005).

Die Rückrechnung der analytisch bestimmten Furosingehalte auf die im Lebensmittel enthaltenen AP erfolgt schließlich anhand experimentell ermittelter Überföhrungs-faktoren, da die Verhältnisse der Produkte untereinander bei definierter

Salzsäurehydrolyse konstant bleiben (Krause 2005, Resmini et al. 1990, Maurer 2005). Analytisch erfasst wird Furosin heute zumeist nach einer von Resmini et al. (1990) etablierten RP-HPLC Methode.

In thermisch stark belasteten Produkten wie beispielsweise Backwaren sind bislang Furosingehalte von bis zu 600 mg / 100 g Protein ermittelt worden (Henle et al. 1995, Cardenas Ruiz et al. 2004). Vergleichbar hohe Furosingehalte (bis 850 mg / 100 g Protein) sind in getrockneten Teigwaren zu finden (Henle et al. 1995, Garcia-Banos et al. 2004). Frische Pastaprodukte weisen dagegen nur etwa 20 mg / 100 g Protein auf (Garcia-Banos et al. 2004). Für zuckerhaltige, länger gelagerte Produkte, wie beispielsweise Honige, können mit 600 bis 1800 mg / 100 g Protein noch deutlich höhere Furosingehalte ermittelt werden (Cardenas-Ruiz et al. 2003). In Milch und Milchprodukten wird der Furosin Gehalt inzwischen routinemäßig zur Beurteilung der Qualität der Rohmaterialien, der thermischen Belastung während des Herstellungsverfahrens sowie der Lagerungsbedingungen angewendet (Finot et al. 1972, Finot et al. 1981, Barbagallo et al. 1998, Perra et al. 2002). Daneben weisen einige Forschungsstudien auf einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhten Furosingehalten in Milchprodukten (z.B. Pasta Filata Käse, Frischkäse) und anteilig zugesetzten Molkenproteinen, welche in großen Mengen in Milch- und Molkenpulvern enthalten sind, hin. In diesen Fällen kann Furosin als Indikator einer Verfälschung oder Produktauthentifizierung herangezogen werden (Villamiel et al. 2000, Ficcadenti et al. 2005, Resmini et al. 2003).

Einen Überblick zu den in der Literatur in ausgewählten Milcherzeugnissen ermittelten Furosingehalten ist in Tabelle 2.4 dargestellt. Das Spektrum an Milchprodukten reicht dabei von thermisch belasteten Proben wie beispielsweise Milchpulver [bis zu 1200 mg Furosin / 100 g Protein, (Henle et al. 1995)] bis hin zu während der Herstellung kaum erhitzten Käsen [maximal 74 mg Furosin / 100 g Protein, (Villamiel et al. 2000)]. Diese werden dagegen teilweise einem Reifungsprozess von Wochen bis Monaten – in ausgewählten Hartkäsen auch Jahren – unterzogen. Rohmilch, welche thermisch nicht behandelt wird, weist mit 3,5 bis 5,5 mg / 100 g Protein die niedrigsten der in Milch und Milcherzeugnissen gefundenen Furosingehalte auf (Henle et al. 1995). Vergleichbar niedrige Werte sind nur noch vereinzelt in Labcaseinen und Rohmilchkäsen zu finden (Villamiel et al. 2000, Ennis et al. 1999, Corzo et al. 2000). Anhand der in Tab. 2. 4 aufgeführten Werte für Roh-, pasteurisierte und UHT-Milch ist eine Korrelation zwischen der thermischen Behandlung der Lebensmittel und ansteigenden Furosingehalten deutlich abzulesen.

**Tab. 2. 4** Übersicht zu Furosingehalten in Milch- und Milcherzeugnissen als Marker der frühen Phase der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln.

Lebensmittel	Furososin [mg / 100 g Protein]	Quelle
Rohmilch	3,5 – 5,5	Henle et al. 1995
pasteurisierte Milch	3,8 – 10	Henle et al. 1995, Masotti et al. 2005, Villamiel et al. 1999
UHT-Milch	50 - 213	Henle et al. 1995, Tokusoglu et al. 2004
Milchpulver	51 – 1200	Henle et al. 1995, Nicoletti et al. 2000, Baptista et al. 2004
Molkenpulver	62 - 936	Nicoletti et al. 2000, Cattaneo et al. 2009
Labcaseine	n.b. - 127	Resmini et al. 1990, Ennis et al. 1999, Tirelli et al. 1995
Joghurt	108 - 316	Tokusoglu et al. 2006, De Noni et al. 2004
Pasta Filata Käse	6,6 – 13,5	Henle et al. 1995, Acquistucci et al. 1996
Frischkäse	18 - 74	Villamiel et al. 2000
Hartkäse aus pasteurisierter Milch	13 - 40	Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000
Manchego (Rohmilchkäse)	8- 22	Corzo et al. 2000
Taleggio	8- 11	Masotti et al. 2005
Grana Padano	8 - 67	Pellegrino et al. 1997
Schmelzkäse	20 - 600	Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2006, Acquistucci et al. 1996

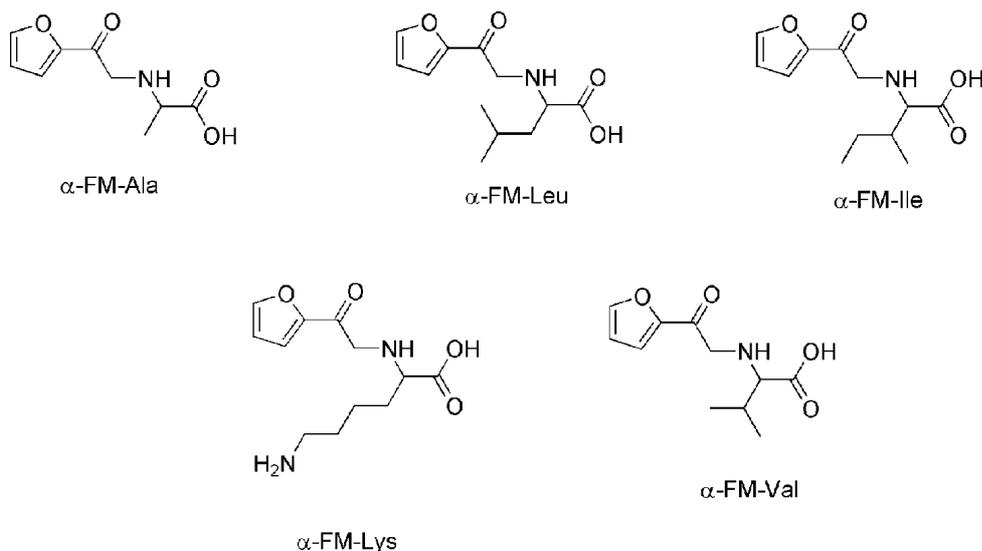
Schmelzkäse, welchen das Hauptinteresse in der vorliegenden Arbeit gewidmet wird, stechen durch stark schwankende Furosingehalte zwischen 20 bis zu 600 mg / 100 g Protein deutlich aus den übrigen Milcherzeugnissen heraus (Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2006, Acquistucci et al. 1996). Eine direkte Beeinflussung der in diesen Produkten gefundenen Furosingehalte wird vermutlich durch die eingesetzte Schmelzrohware, die häufig zum Teil aus Milchpulver und Molkenpulver besteht, sowie die während des Schmelzprozesses angewandten, hohen Temperaturen hervorgerufen (Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2004). Inwieweit die Amadori-Produkte dabei direkt über die Rohware eingetragen werden bzw. in welchen Mengen diese während des Schmelzvorganges durch lactosehaltige Rohwaren neu gebildet werden, ist dabei bislang noch wenig erforscht worden. Beide Szenarien sind für Schmelzkäse mit Milchpulver- und Molkenpulver-Zusatz jedoch wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu wird über Käse und Caseine kaum Furososin ins Schmelzkäseprodukt

eingetragen. Die Furosingehalte dieser Erzeugnisse liegen mit maximal 74 bzw. 127 mg / 100 g Protein deutlich unter denen der Milch- und Molkenpulver (Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000). Die „Neu“-Bildung von Amadori-Produkten in Schmelzkäsen während des Schmelzvorganges ist, infolge der fehlenden Gehalte an reduzierenden Zuckern, weder durch Käse- noch Caseinzusatz allein zu erwarten. Die Furosingehalte in Käsen schwanken zudem technologisch und reifungsbedingt deutlich, was an Gehalten von 3,5 bis 74 mg / 100 g Protein für unterschiedliche Käsesorten ersichtlich ist. Neben der klassischen Analyse einzelner Käsesorten, konnte Corzo et al. eine Korrelation zwischen ansteigenden Furosingehalten und der fortschreitenden Reifung in Manchego Käse nachweisen (Corzo et al. 2000). Dieser bekannte spanische, aus Schafsmilch hergestellte Rohmilchkäse weist dabei zu Beginn der Reifung sehr niedrige Furosingehalte (8 mg / 100 g Protein) auf, welche mit denen von Rohmilch vergleichbar sind. Mit fortschreitender Reifung steigen diese anschließend bis auf maximal 22 mg / 100 g Protein an. Deutlich höhere Gehalte wurden im Vergleich dazu in Hartkäsen aus pasteurisierter Milch ermittelt (13 bis 67 mg / 100 g Protein, Resmini et al. 1990, Pellegrino et al. 1997). Je nach verwendeter Rohware (Rohmilch, pasteurisierte Milch), technologischer Prozessparameter, eingesetzter Starterkulturen sowie der abschließenden Reifungsführung können die Gehalte an Ausgangsstoffen (reduzierende Zucker, reaktive Aminogruppen) und Reaktionsbedingungen der ablaufenden frühen Phase der Maillard-Reaktion beeinflusst werden. Detaillierte Daten dazu sind jedoch bislang nicht publiziert worden. Von zentraler Bedeutung sind in diesem Zusammenhang der Proteinabbau zu Peptiden und freien Aminosäuren sowie die glycolytische Spaltung der Lactose, welche zur Bildung weiterer reduzierender Zucker (Glucose, Galactose) führt (Marilley et al. 2004, Bley et al. 1985). Neben der Bildung von Amadori-Produkten an der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinseitenketten ( $\epsilon$ -AP) sind mit zunehmender Reifung in Käsen auch vermehrt Reaktionsprodukte an  $\alpha$ -Aminogruppen von Peptiden und freien Aminosäuren zu erwarten ( $\alpha$ -AP). Im Vergleich zu  $\epsilon$ -AP sind  $\alpha$ -AP bislang nur wenig erforscht worden (Tab. 2. 5).

Penndorf et al. gelang es 2007 erstmalig peptidgebundene  $\alpha$ -FMAS in hypoallergenen Säuglingsnahrungen nachzuweisen (Abb. 2.14). Käse, welche ebenso zu den peptidhaltigen Lebensmitteln zählen, wurden bislang noch nicht auf  $\alpha$ -FMAS-Gehalte hin untersucht. Deren Bildung in Käsen ist aber infolge des Vorhandenseins reduzierender Zucker und  $\alpha$ -Aminogruppen sehr wahrscheinlich. In den proteolytisch wenig angegriffenen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (MMP, MP und Caseinen) sollten hingegen  $\epsilon$ -AP dominieren. Im Endprodukt Schmelzkäse könnte die Untersuchung des Verhältnisses von  $\epsilon$ -AP zu  $\alpha$ -AP einen Rückschluss auf die eingesetzten Rohwaren zu lassen.

**Tab. 2. 5** Übersicht zu N<sup>α</sup>-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren (α-FMAS) in Lebensmitteln. (Ala - Alanin, Arg - Arginin, Gaba - γ- Aminobuttersäure, Ile - Isoleucin, Leu - Leucin, Lys - Lysin, Pro - Prolin, Val - Valin, \* Angabe in mg / 100 g Produkt, n.b. nicht bestimmbar)

Lebensmittel	α-FMAS [mg / 100 g Protein]	Quelle
hypoallergene Säuglingsnahrung	α-FM-Ala, α-FM-Val, α-FM Ile, α-FM-Leu, α-FM-Lys (9- 95)	Penndorf et al. 2007
Orangensaft	α-FM-Gaba α-FM-Arg (14 – 67))	del Castillo et al. 2000
Honig	α-FM-Pro, α-FM-Gaba, α-FM-Arg (117 - 1372)	Sanz et al. 2003
getrocknete Tomatenprodukte	α-FM-Gaba (76 – 156)	Sanz et al. 2000
Trockenobst	α-FM-Ala , α-FM-Pro, α-FM-Gaba, α-FM-Arg, α-FM-Lys (n.b. bis 76*)	Sanz et al. 2001
getrocknete Karottenprodukte	α-FM-Ala, α-FM-Gaba (226- 1201)	Wellner et al. 2009



**Abb. 2. 14** Strukturformeln der von Penndorf et al. in hypoallergener Säuglingsnahrung quantifizierten N<sup>α</sup>-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren. (Penndorf et al. 2007)

Im Gegensatz zur frühen Phase der Maillard-Reaktion fällt die in der Literatur auffindbare Datenmenge zur Charakterisierung der fortgeschrittenen und finalen Phase in Käsen und Schmelzkäsen wesentlich geringer aus. Einen Überblick zu ausgewählten Dicarbonyl- und CML-Gehalten in diesen Milchprodukten ist nachfolgender Tabelle (Tab. 2. 6) zu entnehmen. Die Bedeutung der fortgeschrittenen und finalen Phase der Maillard-Reaktion in thermisch stärker erhitzten Erzeugnissen auf Milchbasis ist im Vergleich zu Käsen wesentlich stärker ausgeprägt.

**Tab. 2. 6** Übersicht zu ausgewählten Maillard-Reaktionsprodukten der fortgeschrittenen und finalen Phase in Käsen

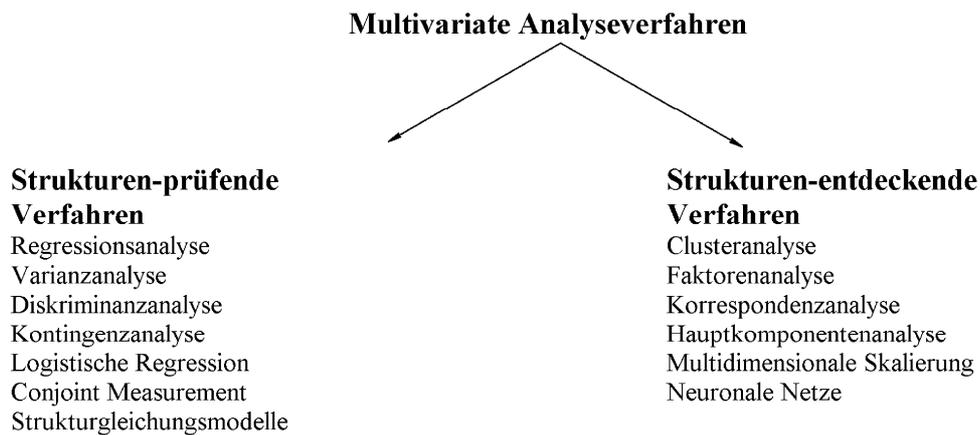
Lebensmittel	1,2-Dicarbonyle [mg / 100g Probe]	Quelle
Cheddar	Glyoxal 0,43 ± 0,01	Bednarski et al. 1989
	Methylglyoxal 1,09 ± 0,09	
Schweizer Käse	Glyoxal 4,1 ± 0,2	
	Methylglyoxal 0,20 ± 0,01	

Lebensmittel	CML [mg / 100 g Protein]	Quelle
Norwegischer Molkenkäse	169	Drusch et al. 1999

## 2.4 Multivariate Analyseverfahren

Multivariate Analyseverfahren können als Verfahren definiert werden, welche sich mit der Systematisierung von Merkmalsmustern beschäftigen. Ziel dieser Verfahren ist die Reduzierung der Zahl an Variablen und / oder Beobachtungen eines Datensatzes bei gleichzeitig minimalem Verlust an Information. Eine Unterteilung der einzelnen Methoden kann nach verschiedensten Gesichtspunkten vorgenommen werden, ist zumeist jedoch nicht überschneidungsfrei möglich, da sich die Zielsetzungen einzelner Verfahren z.T. überlagern können. Aus Sicht der anwendungsbezogenen Fragestellung bietet sich eine anschauliche Einteilung in Strukturen-entdeckende und Strukturen-prüfende Verfahren an (Abb. 2.15) (Backhaus et al. 2006, Kockläuner 2000).

**Abb. 2. 15** Einteilung der Multivariaten Analysemethoden in Anlehnung an (Backhaus et al. 2006).

Ziel der Strukturen-entdeckenden (unüberwachten) Verfahren liegt im Aufspüren von Zusammenhängen zwischen Variablen oder Objekten. Im Gegensatz dazu werden Strukturen-prüfende (überwachte) Verfahren zur Beschreibung von Zusammenhängen zwischen Variablen eingesetzt (Backhaus et al. 2006, Kockläuner 2000). Übertragen auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit handelt es sich bei Variablen eines

Datensatzes um chemische Analysenparameter, wobei die Objekte den analysierten Milch- und Molkereierzeugnissen entsprechen.

Als Voraussetzung zur Durchführung vieler multivariater Analyseverfahren werden häufig gesonderte Anforderungen an den zu analysierenden Datensatz gestellt. Bei vielen klassischen, linearen Methoden sind beispielsweise eine symmetrische Verteilung der Daten innerhalb des Datensatzes sowie das Fehlen von Ausreißern zu gewährleisten. Zur Behebung von abweichenden Strukturen im Datensatz dürfen nichtlineare Transformationen, wie etwa Logarithmieren, durchgeführt werden (Backhaus et al. 2006). Anwendung finden multivariate Analyseverfahren v.a. in der empirischen Forschung der Realwissenschaften. Dabei stellen heute neben den Sozial- und Kulturwissenschaften sowie der Medizin auch die Wirtschaftswissenschaften und Naturwissenschaften Haupteinsatzgebiete dar (Backhaus et al. 2006). Im Bereich der Chemie wurde erstmals in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts die multivariate Datenanalyse eingesetzt. 1972 wurde durch Svante Wold und Bruce Kowalski für den Einsatz von mathematischen und statistischen Methoden in der Chemie der Begriff Chemometrie oder Chemometrik geprägt. Bereits 1974 wurde mit der Gründung einer *International Chemometrics Society* das Fundament für die Etablierung eines eigenständigen Wissenschaftszweiges innerhalb der Chemie gelegt (Otto 1997, Kessler 2006). Die lebensmittelwissenschaftliche Forschung nutzt multivariate Analyseverfahren seitdem verstärkt zur Lösung der unterschiedlichsten Fragestellungen. Klassische Einsatzfelder sind die Authentifizierung, Identifizierung und Klassifizierung von Lebensmittelproben, die Qualitätskontrolle und der Nachweis von Verfälschungen (Cordella et al. 2002, Arvanitoyannis et al. 1999). Das Spektrum der untersuchten Lebensmittel reicht beispielsweise von Analysen der geografischen Herkunft von Tee, Kaffee, Käse, Pistazien und Olivenöl über die Speziesbestimmung tierischen Eiweißes in Fleisch und Fleischprodukten bis hin zur Authentifizierung und Qualitätsbewertung von Honig, Safran, Trüffel, Backwaren, Milcherzeugnissen, Käse und Wein (Cordella et al. 2002, Arvanitoyannis et al. 2005a, Arvanitoyannis et al. 2005b, Arvanitoyannis et al. 2003, Karoui et al. 2007a, Castell-Palou et al. 2010, Suhaj et al. 2008, Heier 2006, Mashayekhi 2005, Steinmann 2005). Am häufigsten werden dazu Clusteranalysen, Diskriminanzanalysen, Hauptkomponenten- und Faktorenanalysen sowie multiple, lineare Regressionen durchgeführt (Arvanitoyannis et al. 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Datenanalyse herangezogenen multivariaten Analyseverfahren sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

### 2.4.1 Clusteranalyse

Clusteranalysen sind Verfahren der unüberwachten Datenanalyse, welche gegebene Objekte eines Datensatzes schrittweise aufgrund von ähnlichen Eigenschaften zu

Gruppen (Clustern) zusammenfügen. Ziel der Einteilung ist, die Objekte mit möglichst ähnlichen / homogenen Eigenschaften innerhalb eines Clusters zusammenzufassen, wohingegen die Cluster untereinander möglichst inhomogen sein sollen. Charakteristisch für die Clusteranalyse ist das gleichzeitige Heranziehen aller vorliegenden Eigenschaften zur Gruppenbildung. Der Clusterungsprozess kann hierarchisch oder nicht-hierarchisch durchgeführt werden. Unterschiedlich sind dabei die zugrundeliegenden Gruppierungsansätze, welche die Objekte entweder entsprechend der Ähnlichkeiten zueinander oder unabhängig davon in Gruppen zusammenfassen. (Backhaus et al. 2006, Kockläuner 2000, Hartung et al. 1995)

### **2.4.2 Korrelationsanalyse**

Die Korrelationsanalyse stellt ein vielseitiges und flexibles Verfahren zur Beschreibung und Erklärung von Abhängigkeiten und Zusammenhängen zwischen verschiedenen Merkmalen dar. Die Korrelation zwischen zwei Merkmalen gibt dabei vornehmlich den Grad des linearen Zusammenhanges zwischen beiden Merkmalen wieder. In der vorliegenden Studie wurde mittels des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) nach linearen Zusammenhängen zwischen Variablen gesucht. Ein vollständig linearer Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird bei  $|r| = 1$  beschrieben. Grafisch gesehen bilden die  $x$ ,  $y$ -Koordinaten der Variablen in diesem Fall eine Gerade. Ein Wert von  $r = 0$  besagt, dass keine lineare Korrelation zwischen den Variablen besteht. Ziel der Korrelationsanalyse in vorliegender Studie ist die Reduzierung des gesamten Datensatzes auf nur noch miteinander nicht korrelierter Variablen, durch Eliminierung der miteinander signifikant linearen Variablen. Mit dem verringerten Datensatz werden anschließend weitere statistische Berechnungen durchgeführt (Backhaus et al. 2006, Hartung et al. 1995).

### **2.4.3 Varianzanalyse**

Mittels Varianzanalysen als Vertreter der überwachten Datenanalysemethoden wird der Beitrag einzelner Varianzquellen (Variablen) und deren Wechselwirkungen bezogen auf die Gesamtvarianz untersucht. Der Teil der Gesamtvarianz, welcher nicht durch die Varianzquellen oder deren Interaktionen erklärt werden kann, wird als unerklärte Varianz bzw. Versuchsfehler bezeichnet. Basierend auf diesem können F-Werte berechnet werden, welche angeben ob und inwieweit die einzelne Varianzquelle (Variable) statistisch signifikant zur Gesamtvarianz beiträgt. Mittels der Varianzanalyse können statistisch signifikante Wirkungen einer Variablen auf die Grundgesamtheit analysiert und quantifiziert werden. Ziel der vorliegenden Studien war dabei die

Reduzierung des gesamten Datensatzes auf nur noch signifikant latente Variablen durch Entfernung aller redundanten Daten (Hartung et al. 1995).

#### **2.4.4 Faktorenanalyse**

Faktorenanalysen, als klassische unüberwachte Verfahren der multivariaten Datenanalyse, finden bevorzugt Anwendung, um bei komplexen Datensätzen eine Reduzierung bzw. Bündelung der erhobenen Variablen, bei gleichzeitig möglichst minimalem Verlust an Information, durchzuführen. Von Interesse ist dabei, ob sich die erhobenen, abhängigen Merkmale auf einige wenige übergeordnete, unabhängige, zentrale Faktoren zurückführen lassen. Bei einer Verdichtung des Datensatzes auf 2 oder 3 Faktoren ist die grafische Darstellung der Objekte im Raum dieser Dimensionen möglich. Anhand deren Positionierung im Raum sind Aussagen zur Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit einzelner Objekte anhand der subjektiven Eigenschaftsbeurteilungen zueinander möglich. Die Repräsentationsgüte der Objektpositionierung anhand der ermittelten Faktoren wird durch den mit der Reduktion einhergehenden Informationsverlust bestimmt (Backhaus et al. 2006, Kockläuner 2000, Hartung et al. 1995).

#### **2.4.5 Diskriminanzanalyse**

Diskriminanzanalysen, welche zur Gruppe der Strukturen-prüfenden Methoden zählen, werden als Verfahren zur Analyse von Gruppenunterschieden und zur Klassifizierung von Objekten eingesetzt. Im ersten Fall definiert eine gewählte, nominal skalierte, abhängige Variable die Gruppenzugehörigkeit (Gruppierungsvariable), wohingegen die unabhängigen, metrisch skalierten Variablen zur Beschreibung der Gruppenmerkmale (Merkmalsvariable) beitragen. Eine Untersuchung der Unterschiedlichkeit von zwei oder mehreren Gruppen hinsichtlich einer Vielzahl von Variablen ist somit möglich. Folgende potentielle Fragen können mittels Diskriminanzanalyse beispielsweise geklärt werden: Unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich der Variablen signifikant und welche Variablen sind zur Unterscheidung der Gruppen geeignet? Beim Klassifizieren von Objekten anhand der Diskriminanzanalyse werden zunächst für eine bekannte Objektmenge die Zusammenhänge zwischen der Gruppenzugehörigkeit und deren Merkmalen analysiert. Im zweiten Schritt können darauf aufbauend Prognosen zur Gruppenzugehörigkeit neuer Objekte getroffen werden. Im Gegensatz zur Clusteranalyse als klassischem, taxonomischen Verfahren zur Gruppenerzeugung, wird die Diskriminanzanalyse hingegen zu Untersuchung vorgegebener Gruppen eingesetzt (Backhaus et al. 2006, Kockläuner 2000).

## 3 EXPERIMENTELLER TEIL

### 3.1 Chemikalien und Enzyme

Verwendete Chemikalien und Enzyme unter Angabe von Bestellnummer und Hersteller soweit im Text nicht anders vermerkt:

Acrylamid p.A., 10674, Serva, Heidelberg

Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup> für HPLC gradient grade, 34851, Sigma Aldrich, Steinheim

Ameisensäure p.a., 33015, Riedel-de Haën AG, Seelze

Aminosäuren für biochemische Zwecke, Merck AG, Darmstadt

Ammoniak p.A. 25 %, 6774.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Ammoniumacetat p.a., 32301, Riedel de Haën, Hannover

Ammoniumchlorid z.A., 1.01145.0500, Merck AG, Darmstadt

Ammoniumperoxodisulfat p.A. 13375, Serva, Heidelberg

Borsäure 99,5 % für analytische Zwecke, 10207, Grüssing GmbH, Filsum

Calciumcarbonat Ursubstanz, 1.02410.0050, Merck AG, Darmstadt

Calciumchlorid wasserfrei 99,5 %, 10233, Grüssing GmbH, Filsum

Chloroform Analytical reagent grade, C/4960/15, Fisher Scientific, Schwerte

Chymosin 0,12 U/mg, aus Mucor Miehei, 83553, Sigma Aldrich, Steinheim

Coomassie Brilliant Blue G 250 reinst, 17524, Serva, Heidelberg

Cysteinsäure >99 %, 30170-10G, Sigma Aldrich, Steinheim

Diethylether puriss, 31685, Fluka, Buchs

3,5-Dinitrosalicylsäure z.A., 5025.9, Chemapol Praha

1,4-Dithiothreitol (DTT), 20710, Serva, Heidelberg

EDTA reinst, HB Labor- und Feinchemikalien

EGTA 99 %, 3054.3, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Enzytec<sup>™</sup> Lactose / D-Galactose 1213, 1002784, Scil diagnostics, Viernheim

Enzytec<sup>™</sup> D-/ L-Milchsäure 1255, 1002891, Scil diagnostics, Viernheim

Enzytec fluid kombinierter Säurestandard, E5460, r-biopharm, Darmstadt

Enzytec fluid kombinierter Zuckerstandard, E5440, r-biopharm, Darmstadt

Essigsäure 100 %, 20104.298, Prolabo VWR, Darmstadt

Ethanol absolut, 20821.296; Prolabo VWR, Darmstadt

Furosindihydrochlorid 98,5 %, SC494 G, Neosystems, Straßburg, Frankreich

D-Glucose wasserfrei 99,5%, 15868, Sigma Aldrich, Steinheim

Glutardialdehyd 25 %ig, 4157.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Glutaminsäure reinst, VEB Laborchemie, Apolda

Glycerin p. A. 87 %, 104094, Merck AG, Darmstadt  
Harnstoff p. A. 51460, Fluka, Taufkirchen  
Hydranal Solvent, 34800, Riedel de Haën, Hannover  
Hydranal Tritrant, 34732, Riedel de Haën, Hannover  
Iodacetamid >99 %, 57670, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumchlorid suprapur<sup>®</sup>, 1.04938.0050, Merck AG, Darmstadt  
Kaliumhexacyanoferrat(II) \* Trihydrat reinst, VEB Laborchemie, Apolda  
Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat, isocommerz VE Außen- und Innenhandelsbetrieb,  
Herzberg  
Kaliumoxalat Monohydrat, 99 %, 32313, Riedel de Haën, Hannover  
Kupferniträt Trihydrat p.A., 1.02753.250, Merck AG, Darmstadt  
Labferment > 900 IMCU (International Milk clotting units) / g, 8178.1, Carl Roth  
GmbH und Co KG, Karlsruhe  
Methanol p. A. 32213, Riedel de Haën, Seelze  
2-Mercaptoethansulfonsäure (Na-Salz) zur Synthese, 8.10595.0010, Merck AG, Darmstadt  
Methylenbisacrylamid, p. A. 29195, Serva, Heidelberg  
Methylenblau für Mikroskopie, 115943, Merck AG, Darmstadt  
Methylrot Natriumsalz, 106078, Merck AG, Darmstadt  
Natriumacetat Trihydrat 99,5 %, 6779.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe  
Natriumchlorid AnalaR NORMAPUR, 27810.295, VWR Prolabo, Darmstadt  
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrät z.A., 1.06580.1000, VWR, Darmstadt  
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrät reinst, 1.06345.1000, Merck AG, Darmstadt  
Natriumdodecylsulfat (SDS) reinst, 20760, Serva, Heidelberg  
Natriumhydroxid Plätzchen p.a., 567530, Merck AG, Darmstadt  
Natriumsulfit reinst, 1.06652.1000, VWR, Darmstadt  
Natriumsulfat wasserfrei 99 % reinst, 12175, Grüssing GmbH, Filsum  
di-Natriumtetraborat Decahydrät, reinst, VEB Laborchemie Apolda  
Natronlauge 32 % reinst, 12192, Grüssing GmbH, Filsum  
Petrolether, 64742-42-0, Acros Organics, Geel  
o-Phenylendiamin, P9029, Sigma Aldrich, Taufkirchen  
o-Phthaldialdehyd 99 %, 79760, Fluka, Buchs  
Orange G (C.I. 16230), 115925, Merck AG, Darmstadt  
Orotsäure wasserfrei mind. 98 %, O2750, Sigma Aldrich, Steinheim  
Perchlorsäure 75 % z.A., 100514, Merck AG, Darmstadt  
Phenol mind. 99 %, 1002060250, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn  
Phosphorsäure 85%, 6366.2, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe  
Proteinmarker 4 für Elektrophorese, 39208, Serva, Heidelberg  
Proteinmarker 5 für Elektrophorese, 39209, Serva, Heidelberg  
ROTI<sup>®</sup>-Mark Standard für Elektrophorese, T851.3, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Salzsäure 37 %, AnalaR NORMAPUR, 20252.290, VWR Prolabo, Darmstadt  
 Schwefelsäure 98 % zur Stickstoffbestimmung, 84727, Fluka, Buchs  
 Schwefelsäure-Ampulle 0,1 mol/L, Testal, VEB Arzneimittelwerk Dresden  
 Seesand reinst, 13075, Grüssing GmbH, Filsum  
 Selenreaktionsgemisch nach Wieninger, 36090, Riedel de Haën, Seelze  
 N,N,N',N' – Tetramethyl-ethylenediamin (TEMED) reinst, 35925, Serva, Heidelberg  
 Trichloressigsäure 99 %, 8789.2, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe  
 Tricin > 99 %, 93355, Fluka, Buchs  
 Trifluoressigsäure HPLC grade, T/3258/04, Fisher Scientific, Schwerte  
 Tris Ultra Qualität 99,9 %, 5429.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe  
 L-Tyrosinmethylester 98 %, T90808, Sigma Aldrich, Steinheim  
 Servalyl<sup>®</sup> pH 3-6 analytical grade, 42944, Serva, Heidelberg  
 Wasserstoffperoxid 30 %, , J. T. Baker, Deventer (NL)  
 Zinksulfat Heptahydrat 99,5 % p.a., 14039, Grüssing GmbH, Filsum

Alle zu chromatographischen Bestimmungen eingesetzten Fließmittel wurden mit Reinstwasser hergestellt, membranfiltriert ( $\text{\O} = 0,45 \mu\text{m}$ ) und entgast. Für alle enzymatischen Untersuchungen wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser eingesetzt.

## 3.2 Materialien und Gerätschaften

Liste der verwendeten Materialien und Geräte sofern nicht an entsprechender Stelle detailliert beschrieben:

### 3.2.1 Materialien

Aluminiumschale	Rotilabo-Probeschalen, 5496.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Dialyseschlauch	ZellTrans regenerierte Cellulose, MWCO 4000-6000 Da, $\text{\O}$ trocken 29,5 mm, Wandstärke 28 $\mu\text{m}$ , E659.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Einmal-Injektionskanülen	Sterican <sup>®</sup> , 0,9 x 40 mm, 0,8 x 50 mm, Braun, Melsungen
Eimalspritzen	1 mL, HSW Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen 2 mL und 5 mL, Braun, Melsungen
Eppendorf-Gefäß	1 mL und 2 mL, Eppendorf AG, Hamburg
Festphasenextraktionskartuschen	Strata C18-E, 500 mg, Phenomenex, Aschaffenburg
Filterpapier	Whatman 595 $\frac{1}{2}$ $\text{\O}$ 125 mm, 10311643, Whatman 602 H $\frac{1}{2}$ $\text{\O}$ 90 mm, 10312642, Whatman <sup>®</sup> , Dassel

	Whatman Weißbandfilter 589/2, aschefrei, Ø 41,5 mm, 10300140, Whatman <sup>®</sup> , Dassel
Greiner Röhrenchen	15 mL PP Testtubes, steril, 188271, Greiner BioOne, Solingen 50 mL SuperClear <sup>®</sup> centrifuge tubes, 93000-030, VWR, West
Chester (US)	
Küvetten	Rotilabo <sup>®</sup> -Einmalküvetten 4,5 ml aus PMMA, Schichtdicke 10 mm, P949.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Membranfilter	Spritzenvorsatzfilter SPARTAN 13/0,2 bzw. 13/0,45 RC, regenerierte Cellulose, Ø 13 mm und 47 mm 0,2 und 0,45 µm, Schleicher Schüll, Dassel
Plastikbecher	125 mL mit Schraubdeckel, graduiert, 01-7002, Medizintechnik Baunatal, Baunatal
Rührspatel	Einmal-Rührspatel PS, 120 mm lang, Stab - Ø 3 mm, Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Rollrandschnappdeckelgläser	10 ml, VWR International, Darmstadt
Schraubreagenzgläser	Duran 12 mm x 100 mm, GL 14, Schott Glaswerke Mainz
Vials	Rotilabo <sup>®</sup> -Probefläschen 2 ml klar mit Septum (Ø 7 mm Silikon/Teflonbeschichtet) und Cap (PP), Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
	Rotilabo <sup>®</sup> -Probefläschen 4 ml klar und Cap (PP), Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

### 3.2.2 Gerätschaften

Analysenwaage	BP121S und BP3100S, Sartorius AG, Göttingen
Elektroden	pH-Einstabmesskette BlueLine <sup>®</sup> 22, N525.1, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe Doppel-Pt-Draht-Elektrode, 6.0338.100, Metrohm, Filderstadt
für volumetrische KFT	Cu-ISE, 6.0502.140, Metrohm, Herisau K-ISE, 6.0504.110, Metrohm, Herisau Ag/AgCl-Elektrode, 6.0750.100, Metrohm, Herisau
Elektronenmikroskop	Rasterelektronenmikroskop DSM 982 GEMINI mit thermischer Feldemissionskathode, Carl Zeiss, Oberkochen und AGAR Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, England
Elektrophorese	Elektrophoresekammer vertikal SE 600, Hoefer, Holliston (US) Gradient-Gießkammer SG50, Scientific Instruments, San Francisco (US)

	Elektrophoresekammer horizontal LKB Multiphor II, Pharmacia Biotech, Wien
	Schüttelplatte Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach
	Software Totallab TL 120 von 2006, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Evaporator	Turbo <sup>®</sup> Vap LV Evaporator, Zymark Ctr., Hopkinton Massachusetts (US)
Gefriertrocknungsanlagen	Alpha 1-2, Christ, Osterode Beta 1-8K, Christ, Osterode alpha 1-4 LD plus, Christ, Osterode
KF Titrationseinheit	KF Titrino 701, Metrohm, Filderstadt Ti Stand 703, Metrohm, Filderstadt
Kjehldahl-System	Digestion Unit K-435, Scrubber B-414, Destillation Unit B- 324, Büchi Labortechnik AG, Flawil Dosimat 775, Stirrer 728, Metrohm, Herisau
pH-Messgerät	WTW pH 526, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Photometer	Ultraspec <sup>®</sup> 1000, Pharmacia Biotech, Wien Plattformschüttler Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach
Reaktionsglasschüttler	MS1 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen
Schüttelwasserbad	GFL 1083, hilab, Düsseldorf
Titrationseinheit	702 SM Titrino mit 728 Stirrer, Metrohm, Filderstadt
Trockenschrank	Heraeus, Heraeus, Hanau Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 Super, Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax <sup>®</sup>	T 18 basic, IKA Labortechnik, Staufen
Vakuumkonzentrator	Thermo Savant SPD Speed Vac 131 DD4, Kühlfalle RVT4104, Vakuumpumpe OFP 400, Thermo Savant, Holbrook NY (US)
Wasserbad	M12, Lauda Mieth GmbH, Radebeul
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf AG, Hamburg Cryofuge 6000i, Heraeus-Kendro, Hanau
Zerkleinerer	Speedy Pro G VA 141, Krupps GmbH, Offenbach

#### *Analytische HPLC-Anlagen*

Knauer Wellchrom HPLC-System I, 4-Kanal Degasser, Solvent Organizer K-1500, Pumpe K-1001, dynamische Mischkammer, 6-Port/3-Kanal-Injektions- und Schaltventil, Autosampler 49194, Säulenthermostat 54816, zweimal UV-Detektor K-2501, Software Eurochrom™ 2000 für Windows, Knauer, Berlin

Knauer Wellchrom HPLC-System II, 4-Kanal Degasser, Solvent Organizer K-1500, Pumpe K-1001, dynamische Mischkammer, Autosampler 49194, Säulenthermostat 59394, Detektor DAD K-2701, Software Eurochrom™ 2000 für Windows, Knauer, Berlin

#### *Analytische Ionenaustauschchromatographie*

Aminosäureanalysator 433 Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, analytischer Kationenaustauscher LCA K07/1, 7 µm, 4,6 mm x 150 mm, Sykam, Fürstfeldbruck

#### *Kopplung HPLC-Massenspektrometer*

Agilent 1100 series, Entgaser, binäre Pumpe, Autosampler, Säulenthermostat, Diodenarraydetektor (DAD), Fluoreszenzdetektor (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

ESI-TOF-MS (electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry); PerSeptive Biosystems Mariner Flugzeitmassenspektrometer mit ESI - Interface; Applied Biosystems, Stafford, USA

#### *Trennsäulen*

Atlantis T3, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Waters, Wexford (IRL)

Eurospher 100-C18, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Knauer, Berlin

furosine dedicated column, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Grace, Deerfield (US)

Varian PLRP-S 300, 8 µm, 150 mm x 4,6 mm, Polymer Laboratories, Shropshire (UK)

### **3.3 Untersuchungsmaterialien**

#### **3.3.1 Käse**

Bei allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Käsen handelt es sich um handelsübliche Muster, welche im Zeitraum von 2007 bis 2010 im Einzelhandel erworben bzw. von Molkereien direkt bezogen wurden.

3.3.1.1 *Handelsübliche Käse*

**Tab. 3.1:** Auflistung der auf alle 55 Parameter hin untersuchten handelsüblichen Käse. Proteingehalt soweit nicht anders angegebenen laut Nährwertkennzeichnung. \* Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2 (K-Käse / speziell Schnittkäse, HK-Hartkäse, WK-Weichkäse; E160a bzw. E160b-Farbstoffe, E251, E235 und E1105-Konservierungsstoffe)

<b>Schnittkäse</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Protein (%)</b>
Gouda (jung)	K1	holländischer Schnittkäse, 48 % Fett i. Tr., Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt, (max. 8 Wochen)	23,0
Bio Maasdamer	K2	deutscher Schnittkäse, 45 % Fett i. Tr. Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt	26,5
Gouda (mittelalt)	K3	holländischer Schnittkäse, 48 % Fett i. Tr. E160b, E251, Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt, (6 Monate)	25,0
GvH Küstentilsiter	K4	Deutscher Schnittkäse, 30 % Fett i. Tr, E160b, E251,	27,0
Weideglück Edamer	K5	Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt	27,3
Noordamer	K6	holländischer Schnittkäse, 45 % Fett i. Tr., Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt	27,0
Milram Butterkäse	K7	deutscher halbfester Schnittkäse, 45 % Fett i. Tr., E160b, Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt	24,0
Chester-Fass	K8	deutscher Schnittkäse, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu	25,3*
EMC Maasdamer	K9	enzymatic modified cheese, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu	12,3*
Maasdamer	K10		24,8*
Chester Fass	K11	deutscher Schnittkäse, Hochland AG, Heimenkirch /	24,3*
Chester Fass	K12	Allgäu	26,2*
Chester Block	K13		25,1*
Gouda (mittelalt)	K14	holländischer Schnittkäse, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu, (2 bis 6 Monate)	23,4*

<b>Hartkäse</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Protein (%)</b>
Emmentaler (Allgäu)	HK1	deutscher Hartkäse, 45 % Fett i. Tr., Wilhelm Brandenburg GmbH und Co. KG, Frankfurt	28,0
Frico Gouda alt	HK2	holländischer Hartkäse, 48 % Fett i. Tr., E251, E160a, E160b, Friesland Foods Cheese Deutschland GmbH, Essen	27,0
Parmegiano Reggiano	HK3	italienischer Hartkäse, 32 % Fett i. Tr. (6 Monate)	34,0*
Grana Padano	HK4	italienischer Hartkäse, 32 % Fett i. Tr., E1105, (6 Monate)	31,2*

Weichkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Pecorino Fiore sardo	HK5	italienischer Hartkäse aus Schafsmilch, Sardinien	29,8*
Emmentaler	HK6	Deutscher Hartkäse, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu	29,8*
Delice de Bourgogne	WK1	Französischer Weichkäse aus past. Milch mit weißer Schimmelrinde, angereichert mit Creme Fraiche	9,5*
Le Rustique	WK2	Französischer Weichkäse aus der Normandie, sahnig, mild - würzig	21,0
Bresso leichtgenuss	WK3	Weichkäsezubereitung aus past. Milch, Halbfettstufe, 10 % Fett abs., (Joghurt 5 %, Gelatine, Speisesalz, Aromen), Edelweiß GmbH und Co. KG, Kempten / Allgäu	21,0
Rügener Badejunge	WK4	Camembert aus past. Milch, 45 % Fett i. Tr., Inselkäserei Bergen / Rügen	21,4*

**Tab. 3. 2:** Auflistung weiterer für die Bestimmung von Furoylmethylaminosäuren eingesetzter handelsüblicher Käse. Proteingehalt - soweit nicht anders angegebenen - ermittelt nach Kapitel 3.5.2 \* / Angaben laut Souci Fachmann Kraut (SMK-Sauermilchkäse, FK-Frischkäse, WK-Weichkäse, K-Käse / speziell Schnittkäse, HK-Hartkäse)

Sauermilchkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Hausmacher Handkäse	SMK1	mit Weißschimmel, 0,5 % Fett abs., Käserei Loose GmbH und Co. KG, Leppersdorf	26,1
Harzer Käse „Der Pikante“	SMK2	mit Weißschimmel, mit frischen Kräutern < 0,1 % Fett Käserei Lehmann GmbH, Leipzig	29,8
Frischkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Almette natur	FK1	Alpenfrischkäse, Doppelrahmstufe wärmebehandelt, Heimenkirch / Allgäu	11,3*
Buko „Der Sahnige“	FK2	Frischkäse, Doppelrahmstufe, wärmebehandelt, Arla Foods, Viby (DK)	11,3*
Weichkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Camembert „Striegistaler Zwerge“	WK5	Weichkäse, 45 % Fett i. Tr., Molkerei Hainichen-Freiberg	20,7
Brie	WK6	Weichkäse mit weißem Edelschimmel, 60 % Fett i. Tr., Milchwerke Oberfranken-West e. G., Coburg	22,6*
Original Allgäuer Limburger	WK7	Weichkäse mit Rotschmiere aus past. Milch, 40 % Fett i. Tr., Mang Käsewerk Kammlach	26,1

<b>Schnittkäse</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Protein (%)</b>
Schnittkäse „Striegistaler Zwerge“	K16	halbfester Schnittkäse aus past. Milch, 55 % Fett i. Tr., Molkerei Hainichen-Freiberg	18,9
Butterkäse	K17	halbfester Schnittkäse, 50 % Fett i. Tr., E160a, E160b, Sachsenmilch AG, Leppersdorf	19,3
Gouda	K18	Schnittkäse, 48 % Fett i. Tr.	18,8
Gouda (jung, mind. 6 Wochen gereift)	K19		20,8
Gouda (mittelalt, mind. 4 Mon. gereift)	K20	holl. Schnittkäse gleichen Herstellers, E160a, E160b, E251, 48 % Fett i. Tr.	23,7
Gouda (alt, mind. 12 Monate gereift)	K21		24,2
Edamer	K22	Schnittkäse aus past. Milch, 40 % Fett i. Tr., E160a	24,2
Alpentilsiter (6 bis 8 Monate gereift)	K23	Schnittkäse aus schweizer Rohmilch, 45 % Fett i. Tr.	26,0
<b>Hartkäse</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Protein (%)</b>
Cheddar	HK7	Hartkäse, mind. 50 % Fett i. Tr., Dairy Crest Ltd., Crudington (GB), (16 Monate)	24,1
Parmegiano Reggiano	HK8	italienischer Hartkäse aus Rohmilch, 32 % Fett i. Tr., (24 Monate)	31,0
Grana Padano	HK9	italienischer Hartkäse aus Rohmilch, 32 % Fett i. Tr., E1105, (14 Monate)	30,0
Gouda (alt)	HK10	holländischer Hartkäse, 48 % Fett i. Tr., (36 Monate)	29,1

### 3.3.1.2 Käse der Reifungsstudien

**Tab. 3.3:** Übersicht der zu Reifungsstudien (3.4) eingesetzten Käse (angegebener Reifegrad des jeweiligen Käses zu Beginn des Reifungsexperimentes, R-Käse der Reifungsexperimente).

<b>Käsesorte</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezifikation</b>
Edamer	R1	Schnittkäse aus past. Milch, Reifegrade: ca. 7 Wochen, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu
Gouda	R2	Schnittkäse aus past. Milch, Reifegrade: ca. 6 Wochen, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu
Maasdamer	R3	Schnittkäse aus past. Milch, Reifegrade: ca. 2 Wochen, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu
Cheddar	R4	Schnittkäse aus past. Milch, Reifegrade: ca. 2 Wochen, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu
Camembert „Striegistaler Zwerge“	R5	Weichkäse mit Weißschimmel, Reifegrad: ab Herstellung (ungereift), Molkerei Hainichen-Freiberg, Freiberg

### 3.3.2 Schmelzkäse

#### 3.3.2.1 Handelsübliche Schmelzkäseproben

Bei allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Schmelzkäsen handelt es sich um handelsübliche Muster, welche im Zeitraum von 2007 bis 2010 im Einzelhandel erworben bzw. vom Hersteller direkt bezogen wurden.

**Tab. 3. 4:** Auflistung der, auf alle 55 Parameter hin, untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2 (SK-Schmelzkäse, MMP-Magermilchpulver, MP-Molkenpulver).

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Nordgut Rahmstufe Sahne	SK1	Schmelzkäsezubereitung Rahmstufe, Käsewerk Hoffmann GmbH und Co. KG, Blievenstorf, <u>Zutaten:</u> Käse (35 %), Butter (21 %), Wasser, Molkeerzeugnisse, Stärke, E339, E452, Milcheiweiß	9,3
Du Darfst Schmelzi Joghurt	SK2	Schmelzkäsezubereitung Halbfettstufe (10 % abs.), Unilever Hamburg, <u>Zutaten:</u> 49 % Käse, Molkereierzeugnis, 15 % Joghurt, Butter, E339, E451, Salz	14,2
Hochland Gouda streichfein	SK3	Schmelzkäsezubereitung Fettstufe, Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu, <u>Zutaten:</u> Schmelzkäse (44 % Gouda, 23 % Käse, E330, E331, E452), Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, Salz, $\beta$ -Carotin	11,9
Hochland Toast zart schmelzend	SK4	Scheibletten 35 % Fett i. Tr., Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu, <u>Zutaten:</u> Käse (48 %), Magermilch, Butter, MMP, E330, E331, E452, MP, Salz, Paprikaextrakt, $\beta$ -Carotin	16,2
Du Darfst Toasties	SK5	Scheibletten 12 % Fett abs., Unilever Hamburg, <u>Zutaten:</u> 51 % Käse, Wasser, MP, E330, E331, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	17,9
Ja Toast (2008)	SK6	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., REWE GmbH Köln, <u>Zutaten:</u> Käse (50 %), Süßmolke, Butter, E330, E331, E452, Milcheiweiß, Salz, MMP, $\beta$ -Carotin	14,4
Gutes Land Emmentaler (2008)	SK7	Scheibletten 45 % Fett i. Tr., Zott GmbH und Co. KG, Mertingen, <u>Zutaten:</u> Emmentaler (32 %), Käse (28 %), Süßmolke, Butter, E330, E331, E452, Milcheiweiß, Salz, MMP, $\beta$ -Carotin	16,0
Salzburger Toast (2008)	SK8	Scheibletten streichfähig, Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, E330, E331, E452, Salz	17,2
American Toast (2008)	SK9	Scheibletten streichfähig, Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 50 % Käse, Wasser, Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, E331, E339, E452	18,1

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Toast Rupp	SK10	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i.Tr., Privatkäserei Rupp Lochau, <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, Butter, MP, Milcheiweiß, E330, E331, E452, E200	14,8
Tip Allgäuer Emmentaler	SK11	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Zott GmbH und Co. KG, Mertingen, <u>Zutaten:</u> Emmentaler (30 %), Süßmolke, Käse (20 %), Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	15,0
Emmentaler Rupp	SK12	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i.Tr., Privatkäserei Rupp Lochau, <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, Emmentaler (17 %), Butter, MP, Milcheiweiß, E341, E339, E452, Aroma, Salz, E200	15,8
Gourmetscheiben Emmentaler	SK13	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i.Tr., Alma regGenmbH Hard, <u>Zutaten:</u> 43 % Käse (davon 70 % Emmentaler), Wasser, Butter, Milcheiweiß, MP, E339, E452, modifizierte Stärke, Salz	14,1
American Toast (2009)	SK14	Scheibletten streichfähig, Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 50 % Käse, Wasser, Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, E331, E339, E452	16,0
Tip Toast	SK15	Scheibletten 45 % Fett i. Tr., GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Käse (50 %), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, Paprikaextrakt, $\beta$ -Carotin	14,0
Gourmetscheiben Toast	SK16	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i.Tr., Alma regGenmbH Hard, <u>Zutaten:</u> Käse (56 %), Wasser, Butter, MMP, E339, E452, E341, Kartoffelstärke, Salz	14,6
Salzburger Toast (2009)	SK17	Scheibletten streichfähig, Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, E330, E331, E452, Salz, Lecithin	16,8
Tip Top Fit Schmelzkäse	SK18	Schmelzkäse leicht (25 % Fett i. Tr.), GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Käse (50 %), Süßmolke, Milcheiweiß, Butter, E331, E339, E452, MMP, Salz	17,4
Tip Holländer	SK19	Scheibletten, GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Käse (50 %), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	15,1
Tip Allgäuer	SK20	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Emmentaler (30 %), Süßmolke, Käse (20 %), Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	14,2
Minus L Toast (Lactosefrei)	SK21	Schmelzkäsezubereitung 45% Fett i. Tr., Omira Bodensee MilchGmbH, Ravensburg, <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, Glucosesirup, E339, E452, E341, Butter	14,9

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Tip Chester	SK22	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Chester (30 %), Süßmolke, Käse (20 %), Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	14,2
Salzburger Emmentaler	SK23	Schmelzkäse 35 % Fett i. Tr., Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 33 % Emmentaler, 25 % Käse, Wasser, Butter, MMP, MP, Milcheiweiß, E330, E331, E452, Salz, Lecithin	17,5
Salzburger leichte Scheiben	SK24	Schmelzkäse 20 % Fett i. Tr., Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> Käse, Wasser, MMP, MP, Milcheiweiß, E331, E339, E452, Salz	18,3
Morrisons Cheese Singles low fat	SK25	Scheibletten , WM Morrison Supermarkets PLC Bradford, <u>Zutaten:</u> Käse (60 %), Wasser, MP, E331, E339, E452, MMP, Milcheiweiß, E341, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	15,3
Ja Holländer	SK26	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., REWE GmbH Köln, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	14,5
Leckerrom Toast	SK27	Schmelzkäse 35 % Fett i. Tr., Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 50 % Käse, Wasser, Butter, MMP, Molkenerzeugnis, Milcheiweiß, E331, E339, E452, Salz, MP, Salz, Paprikaextrakt, Lecithin	17,1
Alpenmark Schinken	SK28	Schinken Schmelzkäsezubereitung 40 % Fett i. Tr., ZOMA Günzburg, <u>Zutaten:</u> Käse (40 %), Magermilch, Butter, Schinken 5 %, E452, E339, E331, MMP, Milcheiweiß, Salz, Aroma, $\beta$ -Carotin	15,5
Ja Allgäuer	SK29	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., REWE GmbH Köln, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	14,6
Mibell Edeka	SK30	Sandwich Scheiben 45 % Fett i. Tr., EDEKA Zentrale AG & Co. KG Hamburg, <u>Zutaten:</u> Käse (33%), Emmentaler (28%), Magermilch, Butter, E452, E339, E331, MMP, Milcheiweiß, Salz	19,8
Ja Chester	SK31	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., REWE GmbH Köln, <u>Zutaten:</u> Chester (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	15,5
PRESIDENT Burger Cheddar	SK32	Spécialité fromagère fondue à l'emmental et cheddar, Lactalis Beurres et Fromages Laval, <u>Zutaten:</u> Lait ècremé reconstituè, fromages (dont: emmental 7% et Cheddar 7%), beurre, lactosérum, protéines de lait, E452, E450, épaississant (E407), sel de cuisine, conservateur (E202), colorant (E160a)	13,1

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Gutes Land Toast	SK33	Schmelzkäse 45% % Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Wasser, Butter, MMP, MP, E452, E339, E331, Milcheiweiß, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	15,6
Welcome Burger	SK34	Schmelzkäsezubereitung 45% Fett i. Tr., EA. SAS Annecy, <u>Zutaten:</u> Milcheiweiß und Milchzucker rehydratisiert, Butter, Käse, E450, E451, E452, E339, E331, E341, Salz, E410, E407, E202	15,1
Gutes Land leicht und fit	SK35	Schmelzkäse 20% Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Wasser, MMP, MP, E452, E339, E331, Milcheiweiß, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	20,3
Tranchettes Pour Croque Monsieur	SK36	Fromage fondu en tranches 45% de mat.gr/mat.seche, Service Consommateurs Groupe Casino Saint Etienne, <u>Zutaten:</u> Fromages (50%), lait écrémé, beurre, E452, E339, E331, protéines de lait, poudre de lait, écrémé, sel, $\beta$ -carotène	13,5
Welcome Croque Monsieur	SK37	Schmelzkäsezubereitung 45% Fett i. Tr., EA. SAS Annecy, <u>Zutaten:</u> Milcheiweiß und Milchzucker rehydratisiert, Butter, Käse, E450, E451, E452, E339, E331, E341, Salz, E410, E407, E202	13,5
Morrisons cheese Singles	SK38	Scheibletten, WM Morrison Supermarkets PLC Bradford <u>Zutaten:</u> Käse (60%), Wasser, MP, Butter, E339, E452, Milcheiweiß, E341, Paprikaextrakt, $\beta$ -Carotin	14,0
Ja Toast (2009)	SK39	Scheibletten 45 % Fett i. Tr., REWE GmbH Köln, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Speisesalz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	13,5
Tenery Chester	SK40	Schmelzkäse 35 % Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> 48 % Käse, Magermilch, Butter, MMP, E331, E339, E452, MP, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprika	16,2
Tranchettes Pour Burger	SK41	Fromage fondu en tranches 45% de mat.gr/mat.seche, Service Consommateurs Groupe Casino Saint Etienne, <u>Zutaten:</u> Fromages (50%), lait écrémé, beurre, sels de fonte (E452, E339, E331), protéines de lait, poudre de lait, sel, colorants ( $\beta$ -carotène, extrait de paprika)	14,7
Leckerrom Emmentaler	SK42	Schmelzkäse 35 % Fett i. Tr., Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 33 % Emmentaler, 17 % Käse, Wasser, Butter, MMP, Molkenerzeugnis, Milcheiweiß, E331, E339, E452, Salz, MP, Salz, Lecithin	17,0
Be light Holländer	SK43	Schmelzkäse Halbfettstufe 12 % Fett abs., ZOMA Günzburg, <u>Zutaten:</u> Käse (51%), Süßmolke, Milcheiweiß, E452, E339, E331 MMP, Speisesalz, $\beta$ -Carotin.	16,2

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Tenery Allgäuer	SK44	Schmelzkäse 20 % Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> 49 % Käse, Magermilch, Butter, MMP, E331, E339, E452, Salz, MP, $\beta$ -Carotin	16,7
Gutes Land Emmentaler (2009)	SK45	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Zott GmbH und Co. KG, Mertingen, <u>Zutaten:</u> 50 % Käse (davon 30 % Emmentaler), Wasser, Butter, MMP, MP, E331, E339, E452, Milcheiweiß, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	14,7
Leckerrom Chester	SK46	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Gebrüder Woerle GesmbH, Salzburg, <u>Zutaten:</u> 30 % Chester, 20 % Käse, Wasser, Butter, MMP, Molkenerzeugnis, Milcheiweiß, E331, E339, E452, Salz, Paprikaextrakt, Lecithin	16,6
Frischgold Chester	SK47	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i. Tr., Handelsmarken GmbH Offenburg, <u>Zutaten:</u> Käse 42 %, Wasser, Chester 15 %, Butter, MMP, E452, E341, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt, Salz, E500	14,8
Frischgold Holländer	SK48	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i. Tr., Handelsmarken GmbH Offenburg, <u>Zutaten:</u> Käse (56 %), Wasser, Butter, MMP, E452, E341, Salz, E500	14,3
Frischgold Toast	SK49	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i. Tr., Handelsmarken GmbH Offenburg <u>Zutaten:</u> Käse (56 %), Wasser, Butter, MMP, E452, E341, Salz, E500	15,7
Frischgold Emmentaler	SK50	Schmelzkäsezubereitung 45 % Fett i. Tr., Handelsmarken GmbH Offenburg, <u>Zutaten:</u> Käse (42 %), Wasser, Butter, Emmentaler 15 %, MMP, E452, E341, Salz, E500	14,7
Alpenmark Toast	SK51	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., ZOMA Günzburg <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin, Paprikaextrakt	13,4
President Croque Emmentaler	SK52	Spécialité fromagère fondue à l'emmental, Lactalis Beurres et Fromages Laval, <u>Zutaten:</u> Lait à crème reconstitué, fromages (dont: emmental 15%), beurre, lactosérum, protéines de lait, E452, E450, épaississant (E407), sel de cuisine, conservateur (E202), colorant (E160a)	11,3
Alpenmark Allgäuer	SK53	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., ZOMA Günzburg, <u>Zutaten:</u> Käse (50%), Süßmolke, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	13,7
Sandwich Scheiben Maasdamer	SK54	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Hochland AG Heimenkirch <u>Zutaten:</u> Maasdamer (40 %), Käse (21 %), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, MMP, Salz, Milcheiweiß, $\beta$ -Carotin, Sojalecithin	18,5

Schmelzkäse	Nr.	Spezifikation	Protein (%)
Sandwich Scheiben Emmentaler	SK55	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Hochland AG Heimenkirch, <u>Zutaten:</u> Käse (33 %), Emmentaler (28 %), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, MMP, Milcheiweiß, Salz, Sojalecithin	19,1
Sandwich Scheiben Gouda	SK56	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Hochland AG Heimenkirch, <u>Zutaten:</u> Gouda (40 %), Käse (21 %), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, MMP, Salz, Milcheiweiß, $\beta$ -Carotin, Sojalecithin	20,2
Gourmet Sandwich Scheiben Emmentaler	SK57	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Käse (28 % Emmentaler), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, MMP, Milcheiweiß, Salz	18,5
Gourmet Sandwich Scheiben Gouda	SK58	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., GOLDHAND Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf, <u>Zutaten:</u> Käse (30 % Gouda), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	18,4
Goudsdam Emmentaler Sandwich	SK59	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> Käse (33 %), Emmentaler (28 %), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, MMP, Milcheiweiß, Salz	18,4
Goudsdam Gouda Sandwich	SK60	Schmelzkäse 45 % Fett i. Tr., Schreiber Foods Europe GmbH Wangen, <u>Zutaten:</u> Käse (40 %), Gouda (30 %), Magermilch, Butter, E331, E339, E452, Milcheiweiß, MMP, Salz, $\beta$ -Carotin	20,4

### 3.3.2.2 Schmelzkäsemuster variierender Proteinzusatzbeimischung

Die nachfolgend aufgelisteten Schmelzkäseproben wurden von der Hochland AG (Heimenkirch/Allgäu) nach einer Standardrezeptur und –prozedur unter Konstanthaltung der Trockenmasse und des Fettgehaltes hergestellt.

**Tab. 3.5:** Übersicht der zur REM und Sensorik eingesetzten Schmelzkäse variierender Proteinzusatzbeimischungen. Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2 (MMP - Magermilchpulver, MP - Molkenpulver, SC - Säurecasein, LC - Labcasein)

Probenbezeichnung	Spezifikation	Protein[%]
Schmelzkäse nur Käse	Käseanteil <b>85 %</b> , <b>kein</b> Proteinzusatz	18,1
Schmelzkäse 4 % MMP	Käseanteil <b>73,9 %</b> , Magermilchpulver <b>4 %</b>	17,2
Schmelzkäse 10 % MMP	Käseanteil <b>53 %</b> , Magermilchpulver <b>10 %</b>	14,8
Schmelzkäse 4 % MP	Käseanteil <b>73,9 %</b> , Molkenpulver <b>4 %</b>	16,2
Schmelzkäse 10 % MP	Käseanteil <b>53 %</b> , Molkenpulver <b>10 %</b>	12,4

Probenbezeichnung	Spezifikation	Protein [%]
Schmelzkäse 2 % SC	Käseanteil <b>82,5 %</b> , Säurecasein <b>2 %</b>	19,3
Schmelzkäse 5 % SC	Käseanteil <b>72 %</b> , Säurecasein <b>5 %</b>	19,6
Schmelzkäse 10 % SC	Käseanteil <b>56 %</b> , Säurecasein <b>10 %</b>	20,7
Schmelzkäse 2 % LC	Käseanteil <b>82,5 %</b> , Labcasein <b>2 %</b>	19,3
Schmelzkäse 5 % LC	Käseanteil <b>72 %</b> , Labcasein <b>5 %</b>	19,8
Schmelzkäse 10 % LC	Käseanteil <b>56 %</b> , Labcasein <b>10 %</b>	20,9

**Tab. 3. 6:** Auflistung der auf alle 55 Parameter hin untersuchten Schmelzkäse variierender Proteinzusatzbeimischungen. Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2

Probenbezeichnung	Spezifikation	Protein [%]
Schmelzkäse nur Käse	Käseanteil <b>85,5 %</b> <b>kein</b> Proteinzusatz	18,2
Schmelzkäse 2 % MMP	Käseanteil <b>81,4 %</b> , Magermilchpulver <b>2 %</b>	17,1
Schmelzkäse 4 % MMP	Käseanteil <b>73,7 %</b> , Magermilchpulver <b>4 %</b>	15,8
Schmelzkäse 6 % MMP	Käseanteil <b>65,9 %</b> , Magermilchpulver <b>6 %</b>	15,1
Schmelzkäse 8 % MMP	Käseanteil <b>58,1 %</b> , Magermilchpulver <b>8 %</b>	14,4
Schmelzkäse 10 % MMP	Käseanteil <b>50,4 %</b> , Magermilchpulver <b>10 %</b>	13,4
Schmelzkäse 2 % MP	Käseanteil <b>81,4 %</b> , Molkenpulver <b>2 %</b>	16,9
Schmelzkäse 4 % MP	Käseanteil <b>73,6 %</b> , Molkenpulver <b>4 %</b>	16,2
Schmelzkäse 6 % MP	Käseanteil <b>65,9 %</b> , Molkenpulver <b>6 %</b>	14,6
Schmelzkäse 8 % MP	Käseanteil <b>58,0 %</b> , Molkenpulver <b>8 %</b>	13,1
Schmelzkäse 10 % MP	Käseanteil <b>50,2 %</b> , Molkenpulver <b>10 %</b>	12,2
Schmelzkäse 2 % SC	Käseanteil <b>81,9 %</b> , Säurecasein <b>2 %</b>	20,5
Schmelzkäse 4 % SC	Käseanteil <b>74,8 %</b> , Säurecasein <b>4 %</b>	18,8
Schmelzkäse 6 % SC	Käseanteil <b>67,5 %</b> , Säurecasein <b>6 %</b>	19
Schmelzkäse 8 % SC	Käseanteil <b>60,2 %</b> , Säurecasein <b>8 %</b>	18,5
Schmelzkäse 10 % SC	Käseanteil <b>53 %</b> , Säurecasein <b>10 %</b>	19,6
Schmelzkäse 2 % LC	Käseanteil <b>81,9 %</b> , Labcasein <b>2 %</b>	19,2
Schmelzkäse 4 % LC	Käseanteil <b>74,8 %</b> , Labcasein <b>4 %</b>	19,9
Schmelzkäse 6 % LC	Käseanteil <b>67,5 %</b> , Labcasein <b>6 %</b>	19,4
Schmelzkäse 8 % LC	Käseanteil <b>60,3 %</b> , Labcasein <b>8 %</b>	19,7
Schmelzkäse 10 % LC	Käseanteil <b>53 %</b> , Labcasein <b>10 %</b>	19,4
Schmelzkäse 2 % MPC	Käseanteil <b>81,8 %</b> , Milchproteinkonzentrat <b>2 %</b>	19,0
Schmelzkäse 4 % MPC	Käseanteil <b>74,6 %</b> , Milchproteinkonzentrat <b>4 %</b>	17,7
Schmelzkäse 6 % MPC	Käseanteil <b>67,2 %</b> , Milchproteinkonzentrat <b>6 %</b>	18,9
Schmelzkäse 8 % MPC	Käseanteil <b>60,0 %</b> , Milchproteinkonzentrat <b>8 %</b>	19,7
Schmelzkäse 10 % MPC	Käseanteil <b>52,6 %</b> , Milchproteinkonzentrat <b>10 %</b>	19,7

### 3.3.3 Milcheiweißerzeugnisse

**Tab. 3.7:** Übersicht der auf alle 55 beschriebenen Parameter hin untersuchten Labcasein- und Säurecaseinproben. (\* Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2)

Labcasein (LC)	Hersteller	Proteingehalt (%)*
LC1	Diarygold Co Operative Society, Mogeely (IE)	76,7
LC2	Groupe Lactalis, Laval (FR)	78,8
LC3	Kerry Foods Ingredients, Listowel (IE)	78,4
LC4		81,3
Säurecasein (SC)	Hersteller	Proteingehalt (%)*
SC1	Lakeland Dairies, Bailieboro (IE)	84,6
SC2	Kerry Foods Ingredients, Listowel (IE)	85,5
SC3	Meggle AG, Wasserburg	85,8
SC4	Meggle AG, Wasserburg	83,8
SC5	Meggle AG, Wasserburg	87,1

### 3.3.4 Trockenmagermilch- und Trockenmolkeerzeugnisse

**Tab. 3.8:** Übersicht der auf alle 55 beschriebenen Parameter hin untersuchten Trockenmagermilch-, Trockenmolkeerzeugnisse und Milchproteinkonzentrate. (\* Proteingehalt ermittelt nach Kapitel 3.5.2)

Trockenmagermilch (Magermilchpulver, MMP)	Hersteller	Proteingehalt (%)
MMP1	OÜ Arikelto, Tallinn (EE)	33,7
MMP2	Target Polska, Warschau (PL)	35,0
MMP3		33,4
MMP4		34,4
MMP5		34,1
Milchproteinkonzentrat (MPC)		Hersteller
MPC1	Fonterra GmbH, Temuka (NZ)	78,4
MPC2	Kerry Foods Ingredients, Listowel (IE)	82,4
Trockenmolke aus Süßmolke (Molkenpulver – MP)	Hersteller	Proteingehalt (%)
MP1	Sia, CCM Trading, Riga (LV)	10,38
MP2	Hochland AG, Heimenkirch / Allgäu	11,4
MP3	Molkerei Goldsteig, Straubing	12,2
MP4		13,3
MP5	Zoma Milch und Molke GmbH und Co., Günzburg	12,4
MP6	Karwedel-Werke Huber, Buchloe	10,9

### 3.3.5 Allgemeine Probenvorbereitung und Lagerung

Die Milcheiweiß-/ Trockenmagermilch- und Molkeerzeugnisse konnten für alle Untersuchungen als Pulver eingesetzt werden. Sofern die analytischen Tests nicht direkt durchgeführt werden konnten, erfolgte die Lagerung des Probematerials dunkel bei 4 °C.

Die untersuchten Käse und Schmelzkäse wurden zunächst mit Hilfe eines handelsüblichen Küchenmixers zerkleinert und nachfolgend zur Analyse eingesetzt.

Für spezielle Untersuchungen wurde gefriergetrocknetes und entfettetes Probenmaterial benötigt. Dazu wurden etwa 10 g zerkleinerter Käse bzw. Schmelzkäse in Rundkolben eingewogen, mit wenig Reinstwasser versetzt und anschließend gefriergetrocknet. Die erhaltene, trockene Probe wurde nachfolgend mittels Petrolether für 5 h an einer Soxhlet-Apparatur entfettet.

Bis zur chemischen Analyse wurden sowohl die handelsüblichen als auch gefriergetrockneten, entfetteten Käse- und Schmelzkäseproben bei -18 °C gelagert. Die einzige Ausnahme bildeten die sensorischen und mikroskopischen Untersuchungen, bei denen ausschließlich frisches Probenmaterial Anwendung fand.

## 3.4 Reifungsstudien an Käsen

Zur Untersuchung des Einflusses der Käsereifung und -sorte auf die frühe Phase der Maillard-Reaktion wurden verschiedene Käsesorten einem simulierten Reifungsexperiment unterzogen. Dazu wurden die in **Tab. 3. 3** aufgelisteten Käse über einen Zeitraum von 12 Wochen bei 4 °C gelagert und alle 1 bzw. 2 Wochen eine Probe von etwa 50 g entnommen. Diese wurde dann direkt zum einen auf die Gehalte an Amadori-Produkten (3.5.7) und zum anderen auf spezifische Marker der fortschreitenden Reifung (u.a. freie Aminosäuren, Caseinabbau) hin analysiert.

## 3.5 Analytische Methoden

### 3.5.1 Methoden zur Ermittlung der Trockenmasse

#### *A) Gravimetrische Trockenmassebestimmung*

Die Bestimmung der Trockenmasse der Käse und Schmelzkäse erfolgte in Anlehnung an die Methode L 03.00-9 „Bestimmung des Trockenmassegehaltes von Käse und Schmelzkäse – Referenzverfahren“ der Amtlichen Sammlung von

Untersuchungs-verfahren nach § 64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)<sup>8</sup>.

### **B) Karl-Fischer-Titration (KFT)**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Wassergehalte der trockenen Milch- und Molkeerzeugnisse die, 1935 von Karl Fischer entwickelte, coulometrische Wasserbestimmungsmethode angewendet (Matissek et al. 1989, Metrohm Nr. 137/3 d).

Jeweils etwa 30 mg der Probenmaterialien wurden auf  $\pm 0,1$  mg genau eingewogen und im Reaktionsbehälter der Karl-Fischer-Titrationseinheit in 20 mL Hydranal Solvent suspendiert. Nach einer Reaktionszeit von 180 s wurde mit Hydranal Titrant bis zum Endpunkt, welcher elektrochemisch nach der Dead-Stop-Methode ermittelt wird, titriert. Tabelle 3.9 gibt Auskunft über die gewählten Messparameter. Die Konditionierung erfolgte durch trockenes Titrieren des Titriergefäßes (Blindwert). Zur Ermittlung des Titers wurden in einer Dreifachbestimmung jeweils 10  $\mu$ L Wasser analog der Proben vermessen.

**Tab. 3. 9:** Messparameter der KFT – Gerätetyp KF 701 Titrimo.

Messparameter	Einstellung	Messparameter	Einstellung
<b>Titrationparameter</b>		<b>KF-Geräteeinstellungen</b>	
Konditionieren	ein	Limit – KFR	aus mL
Ident.abfr.	aus	Polariser	I (pol)
Einmass. abfr.	ein	I (pol)	50 $\mu$ A
Report	aus	Endpunkt	250 mV
Extraktionszeit	180 s	Füllgeschwindigkeit	max. mL/min
Stoppkriterium	Drift		
Stopp Drift	20 $\mu$ L/min		
Abschaltzeit	10 s		
Stopp V	20 mL		
Start V	0 mL		
Dos. Rate	max.		
Max. Rate	max. mL/min		
Min.			
Volumeninkrement	min. $\mu$ L		

<sup>8</sup> § 64 LFGB neugefasst durch B. v. 24.07.2009 BGBl. I S. 2205; zuletzt geändert durch Artikel 1 V. v. 03.08.2009 BGBl. I S. 2630; Geltung ab 25.04.2006

Die Berechnung der Wassergehalte erfolgt anhand des ermittelten Iodverbrauches nach Gleichung:

$$w_w = \left[ \frac{(V_1 - V_0) * t * 100}{E} \right]$$

$w_w$ - Wassergehalt [%],  $V_1$ - Iodverbrauch [mL] der Probe,  $V_0$ - Iodverbrauch [mL] Blindwert,  $t$ - Titer,  $E$ - Einwaage [mg]

### 3.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Kjeldahl

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Methoden L 01.00-10/1 Anhang A „Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung des Stickstoffgehaltes in Milch (Teil 1: Kjeldahl - Verfahren)“ sowie L 02.09-5 „Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung des Proteingehaltes von Caseinen und Caseinaten“ der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB<sup>9</sup>.

### 3.5.3 Analytik ausgewählter Zuckerkomponenten

#### A) *Enzymatische Lactosebestimmung*

Die Lactosegehalte aller Untersuchungsmaterialien wurden enzymatisch mittels eines Testkits der Firma Scil Diagnostics (2005b) bestimmt. Eine notwendige Probenvorbereitung erfolgte angelehnt an die Firmenschrift „Lactose / D-Galactose“ der r-biopharm AG (Boehringer Mannheim o.J.).

#### *Verwendete Reagenzien*

Carrez-I-Lösung (85 mM)

3,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat im 100 mL Masskolben einwiegen und zur Marke mit bidest. Wasser auffüllen.

Carrez-II-Lösung (250 mM)

7,2 g Zinksulfat Heptahydrat im 100 mL Masskolben einwiegen und mit bidest. Wasser zur Marke auffüllen.

3 g des Probenmaterials wurden auf  $\pm 1$  mg in 100 mL Masskolben eingewogen (MMP und MP nur 0,3 g als Einwaage), mit 60 mL bidest. Wasser versetzt und 15 min unter gelegentlichem Umschwenken bei 70 °C inkubiert. Die in den Proben

---

<sup>9</sup> § 64 LFGB neugefasst durch B. v. 24.07.2009 BGBl. I S. 2205; zuletzt geändert durch Artikel 1 V. v. 03.08.2009 BGBl. I S. 2630; Geltung ab 25.04.2006

befindlichen störenden Proteinkomponenten wurden anschließend mittels Carrez-Fällung abgetrennt. Zur Klärung wurden 5 mL Carrez-I, 5 mL Carrez-II sowie 10 mL 0,1 M NaOH-Lösung nacheinander unter stetigem Umschwenken hinzugefügt. Nach Abkühlung der Proben auf 20 °C wurde zur Marke aufgefüllt und durch einen Faltenfilter (Whatman 595 ½) filtriert. Die erhaltenen klaren bis leicht trüben Lösungen konnten direkt oder nach Verdünnung zum enzymatischen Test eingesetzt werden (vergl. dazu Tab. 3. 10).

**Tab. 3. 10:** Pipettierschema des enzymatischen Tests zur Lactosebestimmung. Inkubation bei RT und photometrische Messung bei 340 nm gegen bidest. Wasser. Alle verwendeten Puffer sind im angegebenen Testkit enthalten.

	Blindwert	Lactose-Standard	Probe
Citrat-Puffer	0,200 mL	0,200 mL	0,200 mL
β-Galactosidase-Lösung	0,050 mL	0,050 mL	0,050 mL
Probelösung (0,1 - 1 g / L)	-	-	0,100 mL
Standardlösung	-	0,100 mL	-
Mischen des Küvetteninhaltes. Inkubation bei 20-25 °C. Anschließend Zugabe von:			
Kaliumdiphosphatpuffer	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL
bidest. H <sub>2</sub> O	2,000 mL	1,900 mL	1,900 mL
Mischen. Messung der Extinktion bei 340 nm nach 3 min (A <sub>1</sub> ). Anschließend Zugabe von:			
β-Gal-DH-Lösung	0,050 mL	0,050 mL	0,050 mL
Mischen. Messung der Extinktion nach 30 min (A <sub>2</sub> ) bei 340 nm.			

Die Berechnung der Lactosegehalte erfolgte nach folgenden Gleichungen:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blindwert}}$$

$$c_{\text{Lactose / D-Galactose}} = \frac{(V * MW * \Delta A)}{(\epsilon * d * v * 1000)}$$

ΔA- Differenz der Extinktion, c<sub>Lactose / D-Galactose</sub>- Konzentration an Lactose / D-Galactose in den Proben [g / L], V-Gesamtvolumen im Testansatz, MW- Molekulargewicht (Lactose 360,32 g / mol, Galactose 180,32 g / mol), ε- Extinktionskoeffizient (6,3), d- Schichtdicke, v- Probevolumina

### **B) Bestimmung von reduzierenden Zuckern mittels 2,4 - Dinitrosalicylsäure**

Basierend auf den Arbeiten von Miller (1959) werden reduzierende Zucker mittels 2,4 - Dinitrosalicylsäure Assay (DNS-Assay) bestimmt.

#### **3.5.3.1 Verwendete Reagenzien**

DNS-Reagens

1 g 2,4 - Dinitrosalicylsäure, 0,2 g Phenol, 0,05 g Natriumsulfit und 1 g NaOH

Plätzchen wurden in einem 100 mL Masskolben eingewogen und zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt.

#### Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung

20 g Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat in einem 50 mL Masskolben einwiegen und mit dest. Wasser auffüllen.

3 mL der nach Carrez geklärten Probe wurden in einem Greiner-Röhrchen mit 3 mL DNS-Reagenz versetzt und verschlossen bei 90 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde 1 mL Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung zugegeben und rasch auf RT abgekühlt. Die photometrische Detektion erfolgte bei 575 nm. Analog zur Probe wurden ein Blindwert mit dest. Wasser sowie eine Kalibrierung mit Lactose im Konzentrationsbereich von 50 bis 400 mg / L mitgeführt.

### 3.5.4 Enzymatische Bestimmung von Milchsäure

Die Milchsäuregehalte aller Untersuchungsmaterialien wurden enzymatisch mittels eines Testkits der Firma Scil diagnostics (2005a) bestimmt. Die Probenvorbereitung erfolgte analog der unter 3.5.3 A beschriebenen Methodik. Die klaren bis leicht trüben Probelösungen konnten direkt oder nach Verdünnung zum enzymatischen Test (Tab. 3. 11) eingesetzt werden.

**Tab. 3. 11:** Pipettierschema des enzymatischen Tests zur Milchsäurebestimmung. Inkubation bei RT und photometrische Messung bei 340 nm gegen bidest. Wasser. Alle verwendeten Puffer sind im angegebenen Testkit enthalten.

	Blindwert	Milchsäure-Standard	Probe
Glycylglycin-Puffer	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL
NAD-Lösung	0,200 mL	0,200 mL	0,200 mL
GPT-Lösung	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL
Probelösung (0,02 – 0,15 g / L)	-	-	0,100 mL
Standardlösung	-	0,100 mL	-
bidest. Wasser	1,000 mL	0,900 mL	0,900 mL
Mischen. Nach 5 min Messung der Extinktion ( $E_1$ ) bei 340 nm. Zugabe von:			
D-LDH-Lösung	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL
Mischen. Nach 30 min Messung der Extinktion ( $E_2$ ) bei 340 nm. Zugabe von:			
L-LDH-Lösung	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL
Mischen. Nach 30 min Messung der Extinktion ( $E_3$ ) bei 340 nm.			

Zur Berechnung der Gehalte an L - und D - Milchsäure wurden nachfolgende Gleichungen angewendet.

$$\Delta E_{D-Milchsäure} = (E_2 - E_1)_{Probe} - (E_2 - E_1)_{Blindwert}$$

$$\Delta E_{L\text{-Milchsäure}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Blindwert}}$$

$$c = \frac{V * MG}{\epsilon * d * v * 1000} * \Delta E_{G_{D\text{-bzw.}L\text{-Milchsäure}}} = \frac{c}{E} * 100$$

$\Delta E$ - Differenz der Extinktionen für D- bzw. L-Milchsäure, c- Konzentration [g/L], V- Gesamtvolumen im Testansatz, MG- molare Masse,  $\epsilon$ - Extinktionskoeffizient (6,3), d- Schichtdicke, v- Probevolumina, G- Milchsäuregehalt [g / 100 g], E- Einwaage in g

### 3.5.5 Quantifizierung von Orotsäure mittels RP-HPLC

Im Rahmen der Arbeit wurde eine nach Akalin et al. (1997) und Bevilacqua et al. (1992) modifizierte Methode zur Extraktion von Orotsäure in Milchprodukten angewendet. Angelehnt an Tormo et al. (2004) erfolgte anschließend die quantitative Bestimmung von Orotsäure mittels RP-HPLC.

#### *Verwendete Reagenzien*

Extraktionspuffer 20 mM Natriumdihydrogenphosphat

6,244 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat wurden in einen 2 L Masskolben eingewogen, in Reinstwasser gelöst und nach Einstellung des pH-Wertes auf 2,2 mit konz. Phosphorsäure zur Marke aufgefüllt.

Orotsäurestammlösung 10 mM

In einen 10 mL Masskolben wurden 156,1 mg Orotsäure eingewogen in wenig 0,1 N Natriumhydroxidlösung gelöst und zur Marke mit Reinstwasser aufgefüllt. Daraus hergestellte Kalibrierlösungen wurden im Konzentrationsbereich von 0 bis 30  $\mu\text{g/mL}$  nach Membranfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) eingesetzt.

2 g Probe wurden in 50 mL Greiner Röhrchen eingewogen, mit 8 mL bzw. 16 mL Extraktionspuffer (für SC und LC) versetzt und 2 min bei 11.000 rpm mittels Ultraturrax homogenisiert. Nach Zugabe von 2 mL bzw. 4 mL Acetonitril (SC und LC) wurde die Orotsäure 1 h bei RT extrahiert. Anschließend wurden die Proben bei 15.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 mL abgenommen, membranfiltriert (0,45  $\mu\text{m}$ ) und direkt oder nach 1:10 Verdünnung zur HPLC eingesetzt.

#### *HPLC-System*

Anlage	analytische HPLC Knauer WellChrom I
Säule	Atlantis <sup>®</sup> T3, 5 $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm, (T = 25 °C)
Detektion	UV bei $\lambda = 290 \text{ nm}$
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{L}$
Flussrate	1 mL/min

Elution	binärer Gradient
	Eluent A: 1 % Acetonitril (v:v) in 20 mM Natrium-dihydrogenphosphat (w:v), mit konz. Phosphorsäure auf pH 2,2 einstellen
	Eluent B: 100 % Acetonitril

**Tab. 3. 12:** Trennprogramm zur Bestimmung von Orotsäure in Milchprodukten mittels RP-HPLC.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
7,0	100	0
12,0	93	7
19,0	93	7
34,0	100	0
51,0	100	0

### 3.5.6 Potentiometrische Analyseverfahren

#### A) *Calciumbestimmung*

Die Ermittlung der Calciumgehalte erfolgte mittels potentiometrischer Titration mit Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) unter Verwendung einer Cu-ionenselektiven Elektrode (ISE) (Metrohm 2003).

#### *Verwendete Reagenzien*

Titrand  $c[\text{EGTA}] = 0,1 \text{ M}$

38,04 g EGTA wurden in 250 mL 1 M NaOH gelöst und nach Abkühlen auf RT mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt. Die Einstellung des Titers erfolgte gegen Calciumcarbonat (Ntailianas et al. 1963).

Hilfslösung  $\text{Cu}[\text{EGTA}] = 0,05 \text{ M}$

2,2 g Ammoniumchlorid und 4,83 g Kupfernitratrihydrat wurden eingewogen und mit dest. Wasser auf 200 mL aufgefüllt und anschließend 1:2 mit  $c[\text{EGTA}]$  verdünnt.

Pufferlösung pH 10

54 g Ammoniumchlorid wurden in 400 mL dest. Wasser gelöst, mit 300 mL Ammoniak (25 %) versetzt und auf 1 L mit dest. Wasser ergänzt.

1 g zerkleinerte Probe wurde in einem verschraubbarem Plastikbecher eingewogen, mit 10 mL 0,05 M Schwefelsäure sowie 50 mL dest. Wasser versetzt und 2 min bei 11.000 rpm mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 40 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und nach dem Abkühlen auf RT mit 0,1 M NaOH neutralisiert. Nach Zugabe von 1 mL Hilfslösung und 10 mL Pufferlösung ließ man unter Rühren 30 s reagieren und titrierte anschließend mit EGTA-Lösung

gegen eine Ag/AgCl-Bezugselektrode bis zum Erreichen des ersten Endpunktes. Die gewählten Messparameter des 702 SM Titrino sind in **Tab. 3. 13** aufgelistet.

Zur Berechnung des Calciumgehaltes fand folgende Formel Anwendung:

$$\%Ca = \frac{EP_1 * F * 0,1 * T}{E}$$

% Ca– Calciumgehalt in %, EP1- Verbrauch an c[EGTA] am ersten Endpunkt, F- Umrechnung in mg Ca (4,008), T- Titer der c[EGTA]-Lösung, E-Einwaage in g, 0,1- Umrechnung auf %

**Tab. 3. 13:** Messparameter des 702 SM Titrino zur Ca-Bestimmung mittels Cu-ISE. Messmodus: MET U.

Messparameter	Einstellung	Messparameter	Einstellung
<b>Titrationparameter</b>		<b>Abbruchbedingunge</b>	
Min. Inkrement	25 µL	<i>n</i>	
Dos. Geschw.	max. mL/min	Stopp V	abs.
Messw. Drift	6 mV/min	Stopp V	7 mL
Wartezeit	66 s	Stopp U	aus mV
Start V	0,5 mL bis 2,0 mL	Stopp EP	9
Pause	0 s	Füllgeschw.	max. mL/min
Messeingang	1	<b>Auswertung</b>	
Temperatur	25 °C	EP-Kriterium	5
<b>Vorwahl</b>		EP-Anerk.	größter
Ident. abfragen	aus	Fix EP1 bei U	aus mV
Einmass abfragen	aus	pK/HNP	aus
Aktivierpuls	aus	<b>Statistik</b>	
		Status	aus

### **B) Kaliumbestimmung**

Angelehnt an Rabe 1983 und einer Methodenvorschrift von Metrohm wurden die Ionenstärken von Probelösungen der Milchprodukte mittels einer Kalium-ISE bestimmt (Rabe 1983, Metrohm 134/1 d.) Durch Kalibration der ISE mit Standardlösungen konnten die Kaliumgehalte der Proben errechnet werden.

#### *Verwendete Reagenzien*

Tris-Puffer pH 7,8

12,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurden in 1 L bidest. Wasser gelöst und anschließend 34,5 mL 0,1 N Salzsäure mit dieser Lösung auf 100 mL ergänzt.

2 g der zerkleinerten Probe wurden in 50 mL Greiner Röhrchen eingewogen, mit 25 mL Tris-Puffer versetzt, 1 min bei 11.000 rpm am Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend 1 h bei 80 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf

RT wurde bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. 20 mL des Überstandes wurden mit 25 mL bidest. Wasser verdünnt und nach Zugabe von 0,2 mL 1,2 M NaCl-Lösung im MEAS U Modus des 702 SM Titrino (vgl. **Tab. 3. 14**) gegen eine Ag/AgCl-Bezugselektrode vermessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Kaliumchlorid im Konzentrationsbereich von 10 mg bis 1000 mg/L.

**Tab. 3. 14:** Messparameter des 702 SM Titrino zur Kaliumbestimmung mittels K-ISE. Messmodus MEAS U.

Messparameter	Einstellungen	Messparameter	Einstellungen
<i>Parameter</i>		<i>Statistik</i>	
Messw. Drift	aus	Status	aus
Wartezeit	aus	Vorwahl	
Messeingang	1	Ident. abfragen	aus
Temp.	25 °C	Einmass abfragen	aus
		Aktivierpuls	aus

### 3.5.7 Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen

Die Analytik von Amadori-Produkten in verschiedenen Milcherzeugnissen wurde mittels RP-HPLC / UV nach Resmini et al. (1990) und Penndorf et al. (2007) durchgeführt. Dabei wurden die nach saurer Hydrolyse gebildeten Furoylmethylaminosäuren (FMAS) analytisch erfasst und anhand bekannter Überföhrungsfaktoren (ÜF) auf die Konzentration an korrespondierenden Amadori-Produkten zurückgerechnet (Krause 2005, Maurer 2005). Die Identifizierung der FMAS erfolgt durch Vergleich der UV- und Massenspektren der Analyten mit denen der synthetisierten Referenzmaterialien (3.6.1). Quantifiziert wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Furosinstandards im Konzentrationsbereich von 1 bis 7 nmol / ml.

#### A) Probenaufarbeitung

##### Verwendete Reagenzien

7,95 N Salzsäure (v:v)

331 mL 12 M Salzsäure wurden mit Reinstwasser auf 500 mL aufgefüllt.

0,2 N Salzsäure (v:v)

8,3 mL 12 M Salzsäure wurden mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 500 mL aufgefüllt.

3 N Salzsäure (v:v)

125 mL 12 M Salzsäure wurden auf 500 mL mit Reinstwasser aufgefüllt.

0,4 % Essigsäure(v:v)

0,4 mL der konz. Essigsäure (99,9 %) wurden mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt.

Die Probenvorbehandlung erfolgte in Anlehnung an Corzo et al. (2000) und Förster (2006). Dazu wurden die in nachfolgender Tabelle (Tab. 3. 15) aufgelisteten Probenmengen auf 1 mg genau in Schott®-Schraubreagenzgläser eingewogen und mit 2,5 mL 7,95 N Salzsäure versetzt. Nach 2 min Überspülen der Ansätze mit Stickstoff erfolgte die Hydrolyse bei 110 °C für 23 h im vorgeheizten Sandbad im Trockenschrank. Anschließend wurden die Hydrolysate im Eisbad abgekühlt, über Weißbandfilter filtriert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -18 °C gelagert.

Zur Analytik der FMAS des Valins, Leucins und Isoleucins wurden 1 mL Aliquote der sauren Hydrolysate am Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt, in 500 µL 0,2 N Salzsäure aufgenommen und nach Membranfiltration (Ø 0,45 µm) direkt per HPLC vermessen.

**Tab. 3. 15:** Einwaagen zur sauren Hydrolyse.

Untersuchungsmaterial	eingesetzte Probenmenge
Käse	300 mg
Schmelzkäse	200 mg
Magermilchpulver / Molkenpulver	200 mg
Labcasein / Säurecasein / Milchpulverkonzentrat	150 mg

Zur Quantifizierung von Furosin,  $\alpha$ -FM-Alanin sowie  $\alpha$ -FM-Lysin wurde im Anschluss an die saure Hydrolyse eine Reinigung mittels Festphasenextraktion an RP-18 Material (Strata C18-E, Phenomenex) durchgeführt. Die genauen Bedingungen dazu sind Tab. 3. 16 zu entnehmen.

**Tab. 3. 16:** Schema der Festphasenextraktion zur Analytik von Furosin,  $\alpha$ -FM-Alanin und  $\alpha$ -FM-Lysin.

Konditionierung	
Methanol	5 mL
Wasser	10 mL
Probenaufgabe	
filtriertes Hydrolysat	500 µL
schrittweise Elution mit 3 N Salzsäure	
1	500 µL
2	500 µL
3	1000 µL
4	1000 µL

Im Anschluss daran wurden 1,5 ml der Eluate am Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt, der Rückstand in 500  $\mu$ L Essigsäure (0,4 %) aufgenommen, membranfiltriert und mittels der unten angegebenen HPLC-Methode analysiert.

**B) Analytik von Furosin und  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren mittels RP8-HPLC**

*HPLC-System*

Anlage	analytische HPLC Knauer WellChrom I / II
Säule	furosine dedicated column, 250 mm x 4,6 mm, T = 33 °C)
Detektion	UV bei $\lambda = 280$ nm
Injektionsvolumen	20 $\mu$ L
Flussrate	1,0 mL/min
Eluent A	0,4 % Essigsäure (v :v)
Eluent B	0,3 % Kaliumchlorid in Eluent A (w:v)

**Tab. 3. 17:** Trennprogramm zur Bestimmung von Furosin,  $\alpha$ -FM-Alanin und  $\alpha$ -FM-Lysin in Milchprodukten.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
13,5	100	0
20,5	50	50
22,0	50	50
23,0	100	0
34	100	0

**C) Analytik von  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren mittels RP18-HPLC**

*HPLC-System*

Anlage	analytische HPLC Knauer WellChrom I / II
Säule	Eurospher 100-C18, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm (T = 25 °C)
Detektion	UV bei $\lambda = 280$ nm
Injektionsvolumen	20 $\mu$ L
Flussrate	0,7 mL/min
Eluent A	2 % Ameisensäure in Reinstwasser (v:v)
Eluent B	2 % Ameisensäure in Methanol (v:v)

**Tab. 3. 18:** Trennprogramm zur Bestimmung von  $\alpha$ -FM-Isoleucin,  $\alpha$ -FM-Valin und  $\alpha$ -FM-Leucin in Milchprodukten.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
10,0	100	0
15,0	90	10
45,0	80	20
50,0	20	80
55,0	20	80
65,0	100	0

### 3.5.8 Nicht-Protein-Stickstoff und wasserlöslicher Stickstoff

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf Arbeiten von Tschager (1994b) und Bong (1997) eine Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) in Anwesenheit von Thiolen zur Bestimmung der NPN und WLN angewendet.

#### *Verwendete Reagenzien*

##### Lösung A

38,14 g Borax wurden mit dest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

##### Lösung B

100 g Sodiumdodecylsulfat (SDS) wurden in 900 g dest. Wasser gelöst.

##### Lösung C

2 g o-Phthaldialdehyd wurden in 50 mL Ethanol gelöst.

##### Lösung D

10 g 2-Mercaptoethansulfonsäure (Na-Salz) in 40 mL dest. Wasser lösen.

Zur Herstellung des OPA-Reagenz wurden 50 mL Lösung A, 10 mL Lösung B und jeweils 2 mL Lösung C und D unmittelbar vor der photometrischen Messung im Masskolben vermischt und auf 100 mL mit dest. Wasser aufgefüllt.

#### *Probenvorbereitung*

10 g der zerkleinerten Probe wurden in 100 mL Schottflaschen eingewogen, mit dest. Wasser zu 100 g ergänzt und mittels Ultra-Turrax (2 min, 11.000 rpm) homogenisiert. Anschließend wurde bei 65 °C für 15 min verschlossen im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf RT wurde diese durch einen Faltenfilter (Whatman® 595 ½) filtriert (Käseextrakt).

Zur Gewinnung der NPN-Fraktion wurden 5 mL des Käseextrakts mit 2,5 mL 36%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt, 60 min bei RT inkubiert und abschließend

durch einen Faltenfilter (Whatman<sup>®</sup> 602 H½) filtriert. Als Blindwert dienten 5 mL dest. Wasser, welche analog der Proben aufgearbeitet wurden.

Zur Gewinnung der WLN-Fraktion wurden 5 mL des Käseextrakts in 10 mL Greiner Röhrchen pipettiert und für 10 min bei 40 °C im Wasserbad temperiert. Nach Zugabe von 1 mL Essigsäure (10 %ig) und weiteren 10 min im Wasserbad wurde die Probe mit 1 mL 20%iger Natriumacetat-Lösung versetzt und durchmischt. Abschließend wurde nach Abkühlung der Proben auf RT durch Faltenfilter (Whatman<sup>®</sup> 602 H½) filtriert. Eine Blindprobe, bestehend aus 5 mL dest. Wasser, wurde in gleicher Weise behandelt. Im Anschluss wurden 0,4 mL der WLN-Filtrate mit 1,2 mL 7,95 N Salzsäure in Schott<sup>®</sup>-Schraubreagenzgläsern vermischt, mit Stickstoff für 2 min überspült und 23 h bei 110 °C im Trockenschrank hydrolysiert.

#### *Photometrische Messung*

20 µL der NPN-Filtrate und WLN-Hydrolysate wurden direkt oder nach 1:10 Verdünnung (dest. Wasser) mit 3 mL OPA-Reagenz in Einmalküvetten vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=335$  nm gegen dest. Wasser gemessen. Die Berechnung der NPN- und WLN-Werte erfolgte als Glutaminsäureäquivalente nach Kalibration mit Glutaminsäure im Konzentrationsbereich von 0 bis 4 g/L.

### **3.5.9 Aminosäureanalyse**

Die Gehalte an freien Aminosäuren wurden nach Abtrennung der Proteinfractionen mittels Aminosäureanalyse (ASA), einer Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung, quantifiziert (Henle et al. 1991, Krause et al. 2003).

#### *Verwendete Reagenzien*

36 %ige Trichloressigsäure (TCA) (w:w)

36 g Trichloressigsäure wurden auf 100 g mit Reinstwasser ergänzt.

Zur Bestimmung des Gehaltes an freien Aminosäuren (AS) wurde das Probenmaterial (vergl. dazu **Tab. 3. 19**) eingewogen, mit 1200 µL Reinstwasser versetzt und 15 min im Ultraschallbad suspendiert. Zur Abtrennung der Proteinkomponenten wurden 600 µL 36%ige TCA-Lösung zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Nachdem 800 µL des Überstandes dreimal mit je 800 µL Diethylether ausgeschüttelt wurden, wird ein 500 µL Aliquot der wässrigen Phase am Evaporator zur Trockne eingengt und anschließend in ASA-Probenpuffer aufgenommen, membranfiltriert sowie mittels Aminosäureanalysator vermessen.

**Tab. 3. 19:** Eingesetzte Probenmengen, Volumina Citratpuffer sowie Injektionsvolumen zur Bestimmung der freien Aminosäuren mittels ASA. Zur Konzentrierung und Abtrennung störender Fettpartikel werden die Käse und Schmelzkäse zuvor gefriergetrocknet und entfettet (vgl. 3.3.5).

Untersuchungsmaterial	eingesetzte Probenmenge	Volumen Citratpuffer	Injektionsvolumen
Käse – entfettet	50 mg bis 100 mg	500 mL/1000 µL	10 µL bis 50 µL
Schmelzkäse - entfettet	150 mg	750 µL	40 µL
Magermilchpulver	120 mg	500 µL	100 µL
Molkenpulver	100 mg	500 µL	100 µL
Milcheiweißerzeugnisse	100 mg bis 150 mg	500 µL	100 µL

#### ASA-System

Aminosäureanalysator	S433, SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH
Säule	analytischer Kationentauscher LCA K07/Li, 7 µm, 4,6 mm x 150 mm,
Detektion	Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung $\lambda=440$ nm und $\lambda=570$ nm
Injektionsvolumen	10 µL bis 100 µL
Flussrate	Ninhydrin 10 mL/h Elutionsmittel 16 mL/h
Puffer	<b>Tab. 3. 20</b>
Trennprogramm	<b>Tab. 3. 21</b>

**Tab. 3. 20:** Puffer für die Aminosäureanalyse

Puffer-Nr.	Puffer	Molarität [N]	pH-Wert
-	Probenpuffer	0,12	2,2
1	A-1 Lithiumcitrat	0,12	2,9
2	B-1 Lithiumcitrat	0,30	4,2
3	C-4 Lithiumcitrat	0,30	8,0
4	Regenerierlösung Lithiumhydroxid	0,50	-

**Tab. 3. 21:** Trennprogramm zur Bestimmung der freien Aminosäuren mittels ASA. \*nur Säulentemperaturänderung

Zeit [min]	1	2	3	4	Säulentemperatur [°C]
0,0	85	15	0	0	42
3,0	85	15	0	0	42
4,0	79	21	0	0	42
21,0	43	57	0	0	42
25,0	43	57	0	0	42
33,0	0	100	0	0	42
39,0	0	0	100	0	42
40,0*	-	-	-	-	60
43,0	0	0	68	32	60
46,0*	-	-	-	-	74
63,0	0	0	68	100	74
63,1	0	0	0	100	74
66,1	0	0	0	0	74
66,2	85	15	0	0	74
71,0*	-	-	-	-	42
78,2	85	15	0	0	42

### 3.5.10 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die verwendete elektrophoretische Technik basiert auf der Trennung geladener Teilchen im elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit findet diese zur Reinheitsüberprüfung isolierter Proteinstandards sowie zur Verfolgung der, während der Käsereifung stattfindenden, proteolytischen Prozesse Anwendung.

Durchgeführt wurde die Methode nach einer Methodenvorschrift der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden angelehnt an Döhler (2005). In Tabelle 3.24 sind alle verwendeten Reagenzien zusammengestellt.

#### *Probenvorbereitung*

1,0 g der Probematerialien wurden in 10 mL Maßkolben auf 1 mg genau eingewogen, mit 5 mL 6 M Harnstoff versetzt und für 15 min im Wasserbad bei 75 °C homogenisiert. Nach dem Abkühlen wurde zur Marke mit Harnstofflösung aufgefüllt. 30 µL der so erhaltenen Probelösungen (Proteinkonzentration etwa 30 mg/mL) wurden mit 270 µL 6 M Harnstoff und 300 µL Probenpuffer verdünnt und zur Reduktion mit 10 µL DTT-Stammlösung versetzt. Im siedenden Wasserbad wurden die Proben 4 min erhitzt, anschließend abgekühlt und mit weiteren 5 µL DTT-Lösung sowie 53 µL

Iodacetamidlösung ergänzt. Nach einer Lagerung bei 4 °C über Nacht konnten diese mittels SDS-PAGE untersucht werden.

#### *Herstellung eines Gradientengeles*

Zur Herstellung eines Dichtegradientengeles (15 cm × 15 cm × 0,75 cm, 10-20 % AA) wurden je 7 mL der leichten und schweren Gellösungen in eine vorgekühlte Mischkammer pipettiert (vergl. dazu **Tab. 3. 23**). Nach Zugabe von je 10 µL PER-Lösung wurde das Gradientengel bei 6 °C gegossen. Dabei entsteht der gewünschte Dichtegradient durch kontinuierliches Vermischen der beiden Lösungen. Anschließend verblieb das Gel 15 min bei 6 °C, weitere 15 min bei RT und zur vollständigen Polymerisierung für 60 min bei 40 °C. Die zuvor als Verdunstungsschutz aufgetragene dünne Wasserschicht wurde vom Trenngel entfernt und ein 10%iges Spacergel wurde aufgebracht. Zum Schluss wurde ein Probenkamm vorsichtig und luftblasenfrei ins noch flüssige Spacergel eingesetzt. Nach Abdecken mit Folie wurde das Gel über Nacht bei 4 °C zur vollständigen Polymerisierung gelagert.

**Tab. 3. 22:** Zusammenstellung der zur SDS-PAGE benötigten Reagenzien und Molmassenmarker

<b>Lösungen zur Probenvorbereitung unter reduzierenden Bedingungen</b>	
6 M Harnstofflösung	36,036 g Harnstoff wurde auf 100 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
Probenpuffer pH 8,0	4,84 g Tris, 0,03 g EDTA, 1,0 g SDS, 13,8 mL Glycerol (87%ig), 0,01 g Orange G wurden auf 50 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt pH Wert wurde mittels 6 N HCl eingestellt
Jodacetamidlösung	0,2 g Jodacetamid in 1 mL bidest. Wasser lösen
DTT-Stammlösung	0,15 g DTT wurde in 0,2 mL bidest. Wasser gelöst
<b>Lösungen zur Gelherstellung</b>	
Acrylamid (AA)-Stammlösung (54 %)	26,19 g Acrylamid und 0,81 g Methylenbisacrylamid wurden in einem 50 mL Masskolben eingewogen und zur Marke mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Trenngelpuffer pH 8,5	19,47 g Tris, 0,16 g SDS wurden auf 50 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt pH Wert wurde mittels 6 N HCl eingestellt
PER-Lösung	430 mg Ammoniumperoxodisulfat wurde in 1 mL bidest. Wasser gelöst
<b>Pufferlösungen für die Elektrophorese</b>	
Anodenpuffer pH 8,9	121,1 g Tris wurden auf 5 L mit bidest. Wasser aufgefüllt, pH Wert mittels 1 N HCl eingestellt
Kathodenpuffer pH 8,2	12,1 g Tris, 17,9 g Tricin und 1,0 g SDS wurden auf 1000 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt

<b>Fixier-, Färbe- und Entfärbelösung</b>	
Fixierlösung	200 g Trichloressigsäure wurden auf 1000 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt
Färbelösung	400 mg Coomassie Brilliantblau G-250 wurden auf 1000 mL mit Entfärbelösung aufgefüllt
Entfärbelösung	Wasser : Methanol : Eisessig wurden im Verhältnis 65 : 25 : 10 (v/v/v) gemischt
<b>Molmassenmarker</b>	
Protein test mixture 4 und 5 für SDS-PAGE (1 mg/mL), 1:1 gemischt	
ROTI®-Mark Standard – Protein molecular weight Marker for SDS-PAGE	

**Tab. 3. 23:** Herstellung eines Gradientengels (10-20% AA) für die SDS-PAGE

	<b>Trenngel schwer (20 % AA)</b>	<b>Trenngel leicht (10 % AA)</b>	<b>Spacergel (10 % AA)</b>
Acrylamidlösung (54 %) [mL]	3,705	1,853	1,853
Trenngelpuffer [mL]	3,120	3,120	3,120
Glycerol (87 %) [mL]	3,065	-	-
mit bidest. Wasser auf 10 mL auffüllen			
TEMED [ $\mu$ L]	10,0	10,0	10,0
PER [ $\mu$ L]	10,0	10,0	20,0

*Elektrophoresebedingungen*

Elektrophoresekammer	Hoefler SE 600, vertikale Kammer
Temperatur	10 °C
Trennprogramm	1. Phase1 h25 mA400 Volt 2. Phase5 h55 mA800 Volt 3. Phase3 h55 mA800 Volt
Probenauftragsmenge	Probelösungen 7,5 $\mu$ L Proteinmarker 5 $\mu$ L

Wurden zwei Gele zur Elektrophorese gleichzeitig eingesetzt, so muss die Stromstärke in jeder Phase verdoppelt werden.

*Detektion*

Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte direkt nach Beendigung der Elektrophorese. Die Gele wurden dazu vorsichtig von den Glassplatten entfernt und 20 min in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurden diese dreimal mit dest. Wasser gewaschen und nachfolgend für 30 min gefärbt. Abschließend wurden die Gele noch zweimal für je 20 min mit Entfärbelösung behandelt. Die densitometrische Auswertung

erfolgte nach Einschweißen der Gele in Polyethylenfolie mittels der Software Totallab TL 120.

### 3.5.11 Bestimmung von Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein mittels RP-HPLC

Zur Bestimmung von Glykomakropeptid (CMP) wurde eine RP-HPLC/UV-Methode angelehnt an Thoma et al. (2006) etabliert und auf weitere Matrices übertragen. Nach Erweiterung der Probenvorbehandlung um eine enzymatische Hydrolyse mit Labferment eignet sich diese Methode nun auch zur indirekten Bestimmung von intaktem  $\kappa$ -Casein in Milchprodukten.

#### A) *Enzymatische Hydrolyse von $\kappa$ -Casein*

##### *Verwendete Reagenzien*

##### Phosphatpuffer pH 6,7

0,45 g Natriumdihydrogenphosphat und 0,38 g Di-Natriumhydrogenphosphat wurden im 50 mL Maßkolben eingewogen und mit bidest. Wasser zur Marke ergänzt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,7 erfolgte mit konz. Phosphorsäure.

##### Perchlorsäure 15 %ig

75%ige Perchlorsäure wurde 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt.

##### Labfermentlösung 5%ig bzw. Chymosinlösung 5%ig (w:v)

25 mg des Enzyms wurden in 0,5 mL bidest. Wasser unter vorsichtigem Vermischen unmittelbar vor der Hydrolyse gelöst. Die Chymosinlösung wurde bei Bedarf noch 1:50 bzw. 1:100 verdünnt.

Zur Optimierung der enzymatischen Spaltung von  $\kappa$ -Casein in Milchprodukten in Caseinomakropeptid und para- $\kappa$ -Casein wurde zunächst Labferment (75 % Chymosin / 25 % Pepsin) und reines Chymosin eingesetzt. Die genauen Bedingungen der Reaktionsansätze in Milch bzw. Säurecasein sind in nachfolgend abgebildeter Tabelle aufgeführt. Nach erfolgter Inaktivierung wurden die Proben bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und direkt per HPLC analysiert. Der Rückstand kann nach dem Lösen in 1 mL 6 M Harnstofflösung direkt per SDS-PAGE auf den Gehalt an para- $\kappa$ -Casein untersucht werden. Zur Hydrolyse weiterer Probematerialien wurde nur noch die mit Labferment optimierte enzymatische Hydrolyse eingesetzt, deren genaue Parameter in **Tab. 3. 25** angegeben sind.

**Tab. 3. 24:** Bedingungen der Optimierungsstudien zum Vergleich der enzymatischen Hydrolyse mit Labferment und Chymosin für Säurecasein- bzw. Milchproben.

Enzymatische Hydrolyse mit Labferment / Chymosin		
	Säurecasein / (isoliertes $\kappa$ -Casein)	Milch
<b>Konzentration / Einwaage an Probe</b>	30 mg/mL in Phosphatpuffer pH 6,7 (0,5 mg/ml in bidest. Wasser)	1 mL, fettfrei
<b>Labfermentlösung (5%) Chymosinlösung (5%, 0,1 %, 0,05 %)</b>	Zugabe bis zur finalen Konzentration von 0,02 % (Ausnahme 1:50 bzw. 1:100 verd. Chymosinlösung 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
<b>Inkubation</b>	0 min bis 24 h bei 37 °C im Wasserbad	
<b>Inaktivierung</b>	Zugabe von 15%iger Perchlorsäure bis zur Konzentration von 3 % im Ansatz 0,2 mL	

**Tab. 3. 25:** Reaktionsbedingungen der optimierten enzymatischen Hydrolyse mit Labferment für Käse, Schmelzkäse und die analysierten Proteinzusätze. (MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat)

Enzymatische Hydrolyse mit Labferment		
	Proteinzusätze	Käse / Schmelzkäse
<b>Konzentration / Einwaage an Probe</b>	0,02 bis 0,12 g in 1 mL bidest. Wasser suspendieren, (MMP – 0,12 g, Caseine 0,03 g, MP- 0,02 mg, MPC – 0,05 g)	1,5 g auf 6 g mit bidest. Wasser ergänzen, Homogenisierung mittels Ultra-Turrax (2 min bei 11.000 rpm)
<b>Labfermentlösung (5%)</b>	Zugabe bis zur finalen Konzentration von 0,02 % 4 $\mu$ L	24 $\mu$ L
<b>Inkubation</b>	1 h bei 37 °C im Wasserbad	
<b>Inaktivierung</b>	Zugabe von 15%iger Perchlorsäure bis zur Konzentration von 3 % im Ansatz 0,2 mL	

Nach erfolgter Inaktivierung wurden die Proben bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und direkt per HPLC analysiert. Der Rückstand der Proteinzusätze kann nach dem Lösen in 1 mL 6 M Harnstofflösung direkt per SDS-PAGE auf den Gehalt an para- $\kappa$ -Casein untersucht werden. Die Präzipitate der Käse bzw. Schmelzkäse wurden in 10 mL 6 M Harnstoff gelöst und ebenso mittels Elektrophorese analysiert.

**B) RP-HPLC-Methode zur Quantifizierung von Caseinomakropeptid***Probenvorbereitung*

Zur Bestimmung des Caseinomakropeptidgehalts in Milchprodukten wurde vergleichbar zu den Angaben in **Tab. 3. 25** vorgegangen. Es wurden die jeweiligen Probemengen eingewogen und entsprechend gelöst. Abweichend zu obiger Vorschrift entfällt jedoch der enzymatische Hydrolyseschritt und die Proteine wurden direkt mit Perchlorsäure gefällt. Abschließend wird bei 10.000 rpm zentrifugiert und ein Aliquot des klaren Überstandes nach Membranfiltration ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) mittels nachfolgend dargelegter HPLC-Methode analysiert. Die Präzipitate wurden in gleicher Weise in 6 M Harnstoff gelöst und mittels Elektrophorese charakterisiert.

Die nach enzymatischer Hydrolyse mit Labferment behandelten Proben sind direkt nach Membranfiltration ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) zur RP-HPLC-Analyse einsetzbar. Nach Korrektur dieser, um den Caseinomakropeptidgehalt der korrespondierenden Blindprobe (ohne Enzymzusatz hydrolysiert) kann direkt auf den Gehalt an intaktem  $\kappa$ -Casein zurückgerechnet werden.

*HPLC-System*

Anlage	analytische HPLC Knauer WellChrom I
Säule	Varian PLRP-S (8 $\mu\text{m}$ , 150 $\times$ 4,6 mm) (T = 40 °C)
Detektion	UV bei $\lambda = 226$ nm und $\lambda = 280$ nm
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{L}$
Flussrate	1,0 mL/min
Eluent	A0,1 % TFA (v:v) in Reinstwasser
Eluent B	0,05 % TFA (v:v) Acetonitril : Wasser (80:20, v:v)

**Tab. 3. 26:** Trennprogramm zur Analytik des Caseinomakropeptidgehalts in Milchprodukten mittels RP-HPLC.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
17	51	49
22	42	58
25,5	45	55
30	0	100
35	0	100
40	90	10
50	90	10

### 3.5.12 Bestimmung des Cystinwertes

Die Bestimmung des Cystinwertes wurde mittels Aminosäureanalyse nach Oxidation mit Perameisensäure und Säurehydrolyse, angelehnt an Spencer et al. (1969) und die Richtlinie 98/64/EG der Kommission vom 03. September 1998<sup>10</sup>, durchgeführt.

#### *Verwendete Reagenzien*

##### Oxidationsreagenz

Ameisensäure und Wasserstoffperoxid wurden im Verhältnis 95:5 vermischt und 1 h bei RT stehen gelassen.

##### Cysteinsäurestandard

Zur Herstellung der Stammlösung (2 µmol/mL) wurden etwa 20 mg Cysteinsäure in 50 mL Masskolben in dest. Wasser gelöst. Die Kalibration erfolgte im Bereich von 2 bis 200 nmol/mL.

5,0 mg der gefriergetrockneten, entfetteten Proben (Gefriertrocknung und Entfettung entfällt bei den Proteinzusätzen) wurden eingewogen, mit 1,5 mL des Oxidationsreagenzes versetzt und 1 h bei 4 °C im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz am N<sub>2</sub>-Evaporator bis zur Trockne entfernt. Der Rückstand wurde in 1,5 mL 6 N Salzsäure aufgenommen und während 15 min im Ultraschallbad gelöst. Die Probe wurde quantitativ in Hydrolyseröhrchen überführt, mit 1,5 mL Salzsäure nachgespült und anschließend 23 h bei 110 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde durch einen Weißbandfilter filtriert und ein Aliquot von 1,5 mL wird über Nacht am Vakuumkonzentrator eingetrocknet. Der trockene Rückstand wurde anschließend in 1000 µL ASA-Puffer im Ultraschallbad gelöst (15 min) und nach Membranfiltration (Ø 0,45 µm) per ASA analysiert. Genaue Bedingungen des Aminosäureanalysators sind nachfolgend dargestellt.

#### *ASA-System*

Aminosäureanalysator	S433, SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH
Säule	analytischer Kationentauscher LCA K07/Li, 7 µm, 4,6 mm x 150 mm,
Detektion	Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung λ=440 nm und λ=570 nm

<sup>10</sup> Richtlinie 98/64/EG der Kommission vom 03. September 1998 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Aminosäuren, Rohfetten und Olaquinox in Futtermitteln und zur Änderung der Richtlinie 71/393/EWG, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 257/15 vom 19.09.1998

Injektionsvolumen	50 µL
Flussrate	Ninhydrin 10 mL/h Elutionsmittel 16 mL/h
Puffer	<b>Tab. 3. 20</b>
Trennprogramm	<b>Tab. 3. 27</b>

**Tab. 3. 27:** Trennprogramm zur Bestimmung des Cystinwertes mittels ASA. \*nur Säulentemperaturänderung

Zeit [min]	1	2	3	4	Säulentemperatur [°C]
0,0	100	0	0	0	42
3,0	100	0	0	0	42
4,0	100	0	0	0	42
7,0*	-	-	-	-	60
10,0	50	50	0	0	74
13,0	0	100	0	0	74
15,0	0	0	100	0	74
18,0	0	0	0	100	74
22,0	0	0	0	100	42
22,1	100	0	0	0	42
27,2	100	0	0	0	42

### 3.5.13 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

#### *Verwendete Reagenzien*

2,5 %ige Glutardialdehydlösung

25 %ige Glutardialdehydlösung wurde 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt.

#### *Probenvorbereitung*

Die zu analysierenden Käse- und Schmelzkäseproben wurden mit Hilfe einer Rasierklinge in 0,5 cm × 0,5 cm × 0,1 cm große Scheiben geschnitten und über Nacht bei 4 °C in Rollrandschnappdeckelgläsern mit 2,5 mL Glutardialdehyd (2,5 %ig) fixiert. Anschließend wurden die Proben jeweils 10 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (10 % bis 100 %) entwässert. Zum Entfetten wurden die dehydrierten Proben je dreimal für 30 min in Chloroform eingelegt und nachfolgend dreimal mit Ethanol gewaschen. Anhaftende Reste an Lösungsmittel wurden vor dem Gefrierdrehen im N<sub>2</sub>-Strom entfernt. Die gefriergetrockneten Proben wurden abschließend auf Standard-Objektträgern für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert (Mulsow 2008).

Die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte durch Frau Dipl. Ing. Ellen Kern am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Technischen Universität Dresden.

*Messparameter*

Bedampfung	Gold / Palladium mit AGAR Manual Sputter Coater B7340 (15-20 nm Schichtdicke)
REM-Gerät	DSM 982 GEMINI, mit therm. Feldemissionskathode
Vergrößerung	1:1000 bis 1:5000
Beschleunigungsspannung	2 kV, 4 kV und 6 kV

### 3.5.14 Sensorische Untersuchungen

Das sensorische Prüfpanel setzte sich aus 8 Mitarbeitern bzw. Diplomanden (2 männlich, 6 weiblich) der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden im Alter von 24 - 39 Jahren zusammen. Als sensorische Tests wurden eine Profilprüfung nach DIN 10967-1:1999-10 sowie eine Hedonische Prüfung mit Entscheidungsbegründung nach Simat (2004) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und Probenpräsentation der Schmelzkäse erfolgte angelehnt an Busch-Stockfisch (2002). Alle Tests wurden im Sensorik-Labor der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden, welches nach DIN 10962 und ISO 8589 ausgestattet ist, durchgeführt.

#### ***A) Profilprüfung***

Zur Schulung der Prüfer wurden zunächst orientierend verschiedene Schmelzkäse unterschiedlicher Zusammensetzung gereicht. Anhand dieser Tests erfolgte dann gemeinsam eine einfache beschreibende Prüfung nach DIN 10964 zur Festlegung qualitätsbestimmender Merkmalseigenschaften. Nachfolgend sollte deren Intensität in einer Profilprüfung bestimmt werden. Der Prüfbogen dazu befindet sich im Anhang. Zur Auswertung werden Verfahren der deskriptiven Statistik (Varianzanalyse, Mittelwertvergleich mittels t-Test; siehe dazu Abschnitt 3.7) angewendet.

#### ***B) Hedonische Prüfung***

Mittels der Hedonischen Prüfung sollen die Prüfer eine Einordnung von Prüfproben hinsichtlich deren Akzeptanz bzw. Präferenz vornehmen, indem diese in einer vorgegebenen Bewertungsskala zwischen 9 (gefällt außerordentlich) und 1 (missfällt außerordentlich) einsortiert werden. Der eingesetzte Prüfbogen befindet sich im Anhang. Zur Auswertung der stark subjektiv geprägten Daten konnten neben einer Häufigkeitsverteilung und dem hedonischen Bewertungsschema auch Verfahren der

beurteilenden Statistik (Varianzanalyse, Mittelwertvergleich mittels t-Test; siehe dazu Abschnitt 3.7.1 und 3.7.2) herangezogen werden.

### 3.5.15 Kopplung HPLC-Massenspektrometrie

Die massenspektroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Elektrospray ionization - time of flight – Massenspektrometer gekoppelt an eine HPLC (LC-ESI-TOF-MS).

#### 3.5.15.1 $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren

Anlage	Agilent 1100 Series, Applied Biosystems
Säule	Eurospher 100-C18, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm (T = 25 °C)
Detektion	1. Diodenarray-Detektor (DAD), Agilent 1100 Series, $\lambda$ = 280 nm 2. Time of Flight-Massenspektrometer (ESI-TOF-MS), PerSeptive Biosystem, Mariner Biospectrometry, Workstation, m/z-Bereich 100-700
Injektionsvolumen	50 $\mu$ L
Flussrate	0,7 mL/min
Elution	Eluent A: 2 % Ameisensäure in Reinstwasser (v:v) Eluent B: 2 % Ameisensäure in Methanol (v:v)
Trennprogramm	<b>Tab 3.18</b>

#### 3.5.15.2 Caseinomakropeptid und Milchproteine

Anlage	Agilent 1100 Series, Applied Biosystems
Säule	Varian PLRP-S (8 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm) (T = 40 °C)
Detektion	1. Diodenarray-Detektor (DAD), Agilent 1100 Series, $\lambda$ = 280 nm 2. Time of Flight-Massenspektrometer (ESI-TOF-MS), PerSeptive Biosystem, Mariner Biospectrometry, Workstation, m/z-Bereich 100-700
Injektionsvolumen	20 $\mu$ L
Flussrate	1,0 mL/min
Elution	Eluent A: 0,1 % Eisessig (v:v) in Reinstwasser Eluent B: 0,05 % Eisessig (v:v) in Acetonitril : Wasser (80:20, v:v)
Trennprogramm	<b>Tab. 3. 26</b>

### 3.5.16 Fettbestimmung nach der Röse – Gottlieb – Methode

Die Fettgehaltsbestimmung nach Röse-Gottlieb wurde zur Charakterisierung der isolierten Proteinstandards angewendet. Die Durchführung erfolgte nach (Matissek et al. 1989).

## 3.6 Darstellung und Isolierung von Referenzsubstanzen

### 3.6.1 Synthese von $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren

Die Synthese ausgewählter  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren erfolgte in Anlehnung an Krause (2005).

2 mmol der jeweiligen Aminosäure wurden in 84 mL Methanol gelöst, mit 12 mmol Glucose (wasserfrei, 2,16 g) versetzt und unter Rückfluss bei 90 °C im Ölbad für 3 bis 9 Stunden erhitzt. Optimierte Reaktionszeiten und Einwaagen sind Tab. 3. 28 zu entnehmen. Nach Reaktionszeitende wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der trockene Rückstand in 20 mL Reinstwasser gelöst und membranfiltriert (0,45  $\mu$ m). Die erhaltenen Lösungen wurden 1:10 mit 0,2 N Salzsäure verdünnt. Anschließend wurde 1 mL der verdünnten Lösung mit 1960  $\mu$ L 12 M Salzsäure (8 M Salzsäure im Ansatz) versetzt, 2 min mit Stickstoff überspült und 23 h bei 110 °C im Sandbad im Trockenschrank hydrolysiert. Nach Abkühlung der Hydrolysate wurden diese über Weißbandfilter filtriert und ein Aliquot von 1 mL wurde am Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 mL 0,2 N Salzsäure aufgenommen, membranfiltriert und nach 1:10 Verdünnung mittels RP-HPLC und LC-ESI-TOF-MS charakterisiert (siehe Kapitel 3.5.7 und 3.5.15.1).

**Tab. 3. 28:** Syntheseansätze der  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren.

Aminosäure	Einwaage [mg]	opt. Reaktionszeit [h]	max. Ausbeute an FMAS bezogen zur eingesetzten Aminosäure [%]
Alanin	178,2	6	27,4
Isoleucin	262,4	4	24,4
Leucin	262,4	6	29,3
Lysin	500,6 ( $\epsilon$ -N-Acetyllysin)	9	10,3
Phenylalanin	330,4	6	40,8
Tyrosin	390,4 (Methylester)	3	27,3
Valin	234,3	5	43,0

### 3.6.2 Isolierung von Säurecasein

Das in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zur  $\kappa$ -Casein-Isolierung eingesetzte Säurecasein wurde in Anlehnung an Siegl (2003) mittels isoelektrischer Fällung aus Rohmilch bzw. pasteurisierter, fettarmer Milch gewonnen.

#### *Verwendete Reagenzien*

##### 1 N Salzsäure

In einem 1 L Masskolben wurden 83 mL 12 M Salzsäure vorgelegt und vorsichtig mit dest. Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

##### 0,1 N Natronlauge

In einem 1 L Masskolben wurden 3,997 g Natriumhydroxid eingewogen, mit frisch abgekochtem dest. Wasser gelöst und zur Marke aufgefüllt.

Zunächst wurden 2 L der vorgekühlten Milch bei 4 °C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das aufgerahmte Fett wurde mittels Abschöpfen und Filtration durch Faltenfilter (Whatman 595 ½) abgetrennt. Nachfolgend wurde unter Rühren mit 1 N Salzsäure auf pH 4,6 eingestellt und das präzipitierte Rohcasein durch Zentrifugation (3000 U/min, 10 min, 4 °C) von der Molke abgetrennt. Nach Suspension des Rohcaseins in wenig dest. Wasser (max. 300 mL) wurde mit 0,1 N Natronlauge vorsichtig auf pH 7,0 eingestellt, was ein vollständiges Lösen der Caseine zur Folge hat. Die Lösung wurde zentrifugiert (3000 U/min, 10 min, 4 °C) und erneut filtriert. Abschließend wurde noch einmal – wie beschrieben – mit Salzsäure gefällt, zentrifugiert und mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. Das so erhaltene Rohcasein wurde nach Zugabe von 1 N Salzsäure wieder ausgefällt, zentrifugiert und vom Überstand durch Abdekantieren getrennt.

Zur Entfettung des Säurecaseins wurde zweimal mit dest. Wasser, zweimal mit Ethanol und zweimal mit Diethylether gewaschen. Nach dem Absetzen der Proteine wurde vom Überstand durch Abdekantieren getrennt und noch anhaftendes Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Zum Schluss wurde das isolierte Säurecasein in wenig dest. Wasser suspendiert, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert. Zur Charakterisierung der isolierten Säurecaseine wurden der Fett-, Protein- und Lactosegehalt sowie die Trockenmasse ermittelt.

### 3.6.3 Isolierung von $\kappa$ -Casein

Die Isolierung von  $\kappa$ -Casein erfolgte nach einer von McKenzie et al. (1961) etablierten Methode aus Säurecasein.

*Verwendete Reagenzien*

1 N Natronlauge

3,997 g Natriumhydroxid wurde in einen 1 L Masskolben eingewogen, in frisch abgekochtem, dest. Wasser gelöst und zur Markierung aufgefüllt.

4 M Calciumchloridlösung

222 g Calciumchlorid (wasserfrei) wurden in einen 500 mL Masskolben eingewogen, in dest. Wasser gelöst und zur Markierung aufgefüllt.

1,5 M Kaliumoxalatlösung

138 g Kaliumoxalat Monohydrat wurden in einen 500 mL Masskolben eingewogen, in dest. Wasser gelöst und zur Markierung aufgefüllt.

5 mM Kochsalzlösung

In 1 L dest. Wasser wurden 0,29 g Natriumchlorid gelöst.

0,2 N Natronlauge

8,004 g Natriumhydroxid wurden in 1 L frisch abgekochtem, dest. Wasser gelöst.

2 M Ammoniumacetatlösung

77,88 g Ammoniumacetat wurden in einen 500 mL Masskolben eingewogen, in dest. Wasser gelöst und zur Markierung aufgefüllt.

6 M Harnstofflösung

In 1 L dest. Wasser wurden 360,36 g Harnstoff gelöst.

0,1 M Kochsalzlösung

In 1 L dest. Wasser wurden 5,844 g Natriumchlorid gelöst.

Zur Isolierung wurden 20 g Säurecasein unter stetigem Rühren in etwa 150 mL 1 N Natronlauge gelöst und mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von circa 300 mL gebracht. Es wurde im Eisbad auf 2 °C abgekühlt und 4 M Calciumchloridlösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 6,5 bis 7,0 hinzugefügt. Zur vollständigen Ausfällung der Ca-sensitiven Caseine wurde der Ansatz 1 h bei 35 °C gerührt. Das Präzipitat I (beinhaltet  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$  und  $\beta$ -Caseine) wurde durch Zentrifugation (3000 U/min, 20 °C, 60 min) abgetrennt. Dem klaren Überstand wurden ca. 100 mL einer 1,5 M Kaliumoxalatlösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 6,5 bis 7,0 zugegeben. Das sich bildende schwerlösliche Calciumoxalat wurde anschließend durch Zentrifugation (3000 U/min, 20 °C, 10 min) abgetrennt. Nach Temperieren des Überstandes für 30 min auf 25 °C im Wasserbad wurden pro 100 mL Ansatz 25 g wasserfreies Natriumsulfat zugegeben. Die gebildete Suspension wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend zentrifugiert (3000 U/min, 20 °C, 30 min). Das Präzipitat II (beinhaltet  $\kappa$ -Casein und Verunreinigungen an  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$  und  $\beta$ -Caseinen) wurde in 50 mL dest. Wasser gelöst und 24 h gegen 5 mM Kochsalzlösung bei 4 °C dialysiert.

Der pH-Wert der dialysierten Lösung wurde mit 0,2 N Natronlauge auf 7,2 gebracht. Nach Zugabe des gleichen Volumens an 50%igem Ethanol und 4 mL 2 M Ammoniumacetatlösung wurde 30 min bei RT gerührt und das gebildete Präzipitat III ( $\kappa$ -Casein mit Verunreinigungen an  $\beta$ -Casein) abzentrifugiert (3000 U/min, 20 °C, 20 min). Zum Waschen des isolierten  $\kappa$ -Casein-Standards wurde nochmals mit 200 mL 50%igem Ethanol und 4 mL 2 M Ammoniumacetatlösung versetzt. Nach der Abtrennung des Überstands wurde das Proteinpellet in 30 mL 6 M Harnstoff gelöst, 24 h gegen 5 mM Kochsalzlösung bei 4 °C dialysiert und nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 (0,2 N NaOH) erneut - wie beschrieben - mit Ethanol / Ammoniumacetat gewaschen. Das so erhaltene  $\kappa$ -Casein wurde in 10 mL 6 M Harnstoff gelöst, 48 h gegen 0,1 M NaCl-Lösung dialysiert, lyophilisiert und bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Charakterisierung des isolierten  $\kappa$ -Casein-Standards wurden elektrophoretische und chromatographische Verfahren eingesetzt (siehe dazu Abschnitt 3.5.10 und 3.5.11).

### 3.6.4 Isolierung von Caseinomakropeptid und para- $\kappa$ -Casein

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Caseinomakropeptid (CMP) und para- $\kappa$ -Casein eignen sich sowohl Milch als auch die daraus isolierbaren Komponenten Säurecasein bzw.  $\kappa$ -Casein. Größere Mengen an CMP können außerdem aus Süßmolkenpulver (2 bis 2,5 g/100 g), einem Abfallprodukt der Käseherstellung, gewonnen werden (Regester et al. 1991). In der Literatur finden sich dazu neben Ultrafiltrations- und ionenaustauschchromatographischen Verfahren (Martin-Diana et al. 2002, Erdmann et al. 1999) auch einfache Vorschriften, welche auf dem Ausfällen der Proteine basieren (Saito et al. 1991). Um weitere aufwendige Isolierungsschritte zu vermeiden, wurden die zur Identifizierung und Charakterisierung benötigten Mengen an CMP und para  $\kappa$ -Casein aus zuvor isoliertem  $\kappa$ -Casein bzw. Säurecasein (3.6.3) gewonnen.

#### A) *Isolierung von Caseinomakropeptid*

Die Isolierung von CMP erfolgte nach Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein bzw. Säurecasein mit Labferment. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.31 angegeben.

#### *Verwendete Reagenzien*

Phosphatpuffer pH 6,7

0,45 g Natriumdihydrogenphosphat und 0,38 g Di-Natriumhydrogenphosphat wurden im 50 mL Masskolben eingewogen und mit bidest. Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,7 erfolgte mit konz. Phosphorsäure.

Perchlorsäure 15 %ig

75%ige Perchlorsäure wurde 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt.

Labfermentlösung 5%ig bzw. Chymosinlösung 5%ig (w:v)

25 mg des Enzyms wurden in 0,5 mL bidest. Wasser unter vorsichtigem Vermischen unmittelbar vor der Hydrolyse gelöst.

**Tab. 3. 29:** Reaktionsbedingungen der enzymatischen Hydrolyse mit Labferment zur Isolierung von Caseinomakropeptid.

	$\kappa$ -Casein	Säurecasein
<b>Konzentration / Einwaage an Probe</b>	100 mg in 20 mL bidest. Wasser	600 mg in 20mL in Phosphatpuffer pH 6,7
<b>Labfermentlösung (5%)</b>	Zugabe bis zur finalen Konzentration von 0,02 %	
	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L
<b>Inkubation</b>	1 h bei 37 °C im Wasserbad	
<b>Inaktivierung</b>	Zugabe von 15%iger Perchlorsäure bis zur Konzentration von etwa 3 % im Ansatz	
	4,0 mL	4,0 mL

Nach erfolgter Inaktivierung wurden die Proben bei 10.000 rpm/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Weißbandfilter filtriert, 24 h gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und bei -18 °C gelagert. Der Rückstand des  $\kappa$ -Casein-Ansatzes konnte nachfolgend zur Isolierung von para- $\kappa$ -Casein genutzt werden. Zur Charakterisierung des isolierten CMP-Standards wurden chromatographische Verfahren eingesetzt (siehe dazu Abschnitt 3.5.10).

### **B) Isolierung von para- $\kappa$ -Casein**

Die Isolierung von para- $\kappa$ -Casein erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein mit Labferment (3.5.11, Tab. 3. 29). Der nach Zentrifugation bei 10.000 rpm / min erhaltene Rückstand wurde dreimal mit je 10 mL Reinstwasser gewaschen, abzentrifugiert, in wenig Reinstwasser suspendiert, lyophilisiert und bei -18 °C gelagert. Zur Charakterisierung des isolierten para- $\kappa$ -Casein-Standards wurden elektrophoretische Verfahren eingesetzt (siehe dazu Abschnitt 3.5.11).

## 3.7 Chemometrische Verfahren

### 3.7.1 Univariate Statistik

**Arithmetisches Mittel** 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$\bar{x}$  - arithmetisches Mittel,  $x_i$  - Einzelwert,  $n$  - Stichprobenumfang,  $i$  - Einzelwertindex ( $i = 1, 2, 3 \dots n$ )

**Median**

$n = \text{gerade}$	$x_{Med} = \frac{x_{n+1}}{2}$
$n = \text{ungerade}$	$x_{Med} = \frac{1}{2} \left( x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right)$

$x_{Med}$  - Median,  $x_n$  - Einzelwert,  $n$  - Stichprobenumfang

**Standardabweichung (Stichprobe)** 
$$s_x = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x})^2}$$

$s$  - Standardabweichung,  $\bar{x}$  - arithmetisches Mittel,  $x_i$  - Einzelwert,  $n$  - Stichprobenumfang,  $i$  - Einzelwertindex ( $i = 1, 2, 3 \dots n$ )

**Standardisieren** 
$$z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$$

$z_i$  - standardisierte Form von  $x_i$ ,  $x_i$  - Einzelwert,  $\bar{x}$  - arithmetisches Mittel,  $s$  - Standardabweichung

**Varianz (Stichprobe)** 
$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$s^2$  - Varianz,  $\bar{x}$  - arithmetisches Mittel,  $x_i$  - Einzelwert,  $n$  - Anzahl der Einzelwerte,  $i$  - Einzelwertindex ( $i = 1, 2, 3 \dots n$ ),  $n-1$  - Anzahl der Freiheitsgrade

**Varianzbreite / Spannweite**

Differenz zwischen kleinstem (Minimum, Min) und größtem (Maximum, Max) Wert der Stichprobe.

**Vergleich von Mittelwerten t-Test**

Zur Untersuchung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei Mittelwerten verschiedener Populationen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte wird ab  $p < 0,05$  und ein hoch signifikanter ab  $p < 0,01$  definiert. Als Voraussetzung zur Durchführung dieses Tests wird Varianzhomogenität des Datensatzes verlangt, welche zuvor mittels Levene Test untersucht wird.

**3.7.2 Multivariate Statistik**

Die in Abschnitt 2.4 vorgestellten multivariaten Analyseverfahren wurden allesamt unter Verwendung der statistischen Software SPSS 15.0 (IBM Corporation, Somers, US) durchgeführt. Genauere Angaben, zu den angewendeten mathematischen Algorithmen und Rechenparametern, sind im jeweiligen Abschnitt der Diskussion aufgeführt. Vor Beginn der multivariaten Analysen wurde der Datensatz auf Normalverteilung mittels des Kolmogorov Smirnov und des Shapiro-Wilk Tests untersucht. Nicht-normalverteilte Messgrößen wurden gegebenenfalls transformiert.

**F-Wert**

$$F = \frac{V(J,G)}{V(J)}$$

V (J, G) – Varianz der Messgröße J im Cluster G; V (J) - Varianz der Messgröße in der Erhebungsgesamtheit

**t-Wert**

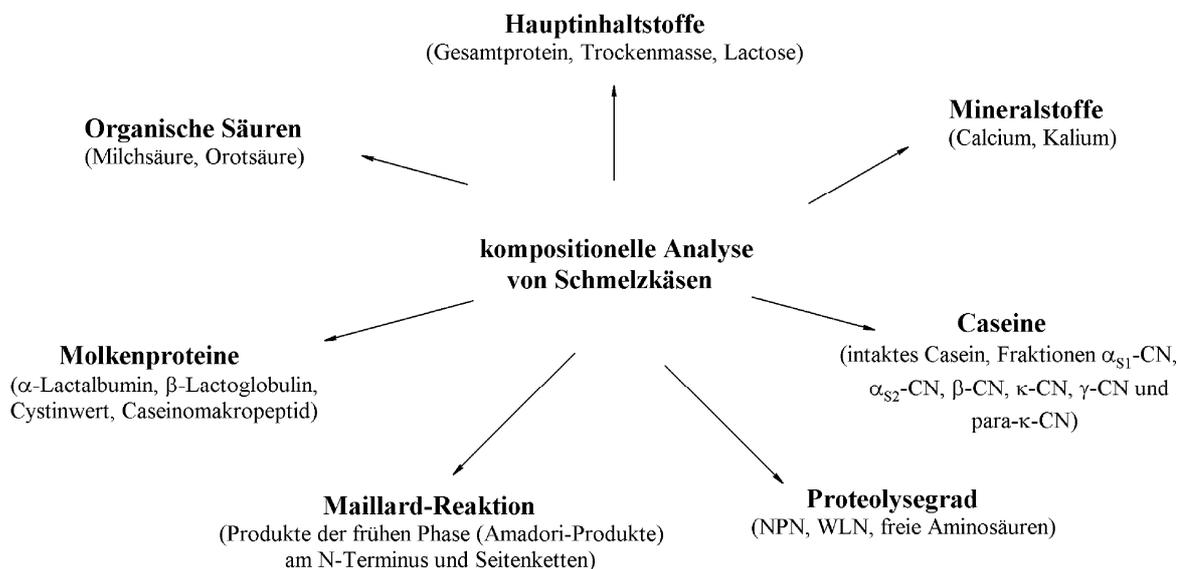
$$t = \frac{X(J,G) - X(J)}{S(J)}$$

$X(J,G)$  - Mittelwert der Messgröße J über die Objekte im Cluster G,  
 $X(J)$ - Gesamtmittelwert der Messgröße J in der Erhebungsgesamtheit,  
 $S(J)$ - Standardabweichung der Messgröße J in der Erhebungsgesamtheit

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ist es, ein Analysenportfolio chemischer Parameter zur Bestimmung der kompositionellen Zusammensetzung von Schmelzkäseerzeugnissen zu erarbeiten, mit dessen Hilfe eine Unterscheidung der am Markt erhältlichen Produktqualitäten möglich ist. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Unterscheidung der Rohwaren Käse und den zum Schmelzkäseprodukt weiteren zugesetzten Proteinpulvern auf Milchbasis (Milcheiweiß-, Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse). Zusammen stellen diese Proteinpulver mengenmäßig den größten Anteil in Schmelzkäsen dar und bestimmen somit maßgeblich die technologischen und sensorischen Eigenschaften und damit verbunden die Qualität der fertigen Produkte.

In Abbildung 4.1 sind alle im Rahmen der Arbeit analysierten chemischen Messgrößen zusammengestellt. Die Auswahl dieser Parameter basiert auf den in Abschnitt 2.3 bereits dargelegten analytischen Grundlagen. Eingeteilt werden können diese Marker in sieben übergeordnete Klassen. Bei diesen handelt es sich um die Hauptinhaltsstoffe, die Mineralstoffe, die organischen Säuren, die Caseine und Molkenproteine, den Proteolysegrad sowie ausgewählte Maillard-Reaktionsprodukte.



**Abb. 4.1** Darstellung der gewählten analytischen Kenngrößen zur Ermittlung der kompositionellen Analyse von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen [CN – Casein, NPN – Nicht-Protein-Stickstoff, WLN- wasserlöslicher Stickstoff].

Im Vergleich zu den bereits von Bong (1997) durchgeführten Arbeiten, welche sich nur mit der Analyse von Modell-Schmelzkäsen anhand proteinchemischer Marker

beschäftigten, stellt die vorliegende Studie eine wesentliche Erweiterung dar. Neben der Kombination verschiedenster chemischer Messgrößen sowie deren anschließender mathematischer Auswertung mittels multivariater Analyseverfahren, ist die vorliegende Arbeit auch dadurch gekennzeichnet, dass das Probenspektrum neben Modell-Schmelzkäserezepturen auch um handelsübliche Schmelzkäse und Rohwaren zu deren Herstellung erweitert wurde.

Als analytische Herausforderungen bzw. Limitierungen der gewählten chemischen Messgrößen zur quantitativen Bestimmung des Käseanteils in Schmelzkäsen und Schmelzkäsezubereitungen sind folgende Punkte zu beachten:

Alle Komponenten entstammen dem gemeinsamem Ausgangsrohstoff Milch. Die chemische Zusammensetzung der Einzelkomponenten ist demzufolge sehr ähnlich, weshalb die Festlegung von charakteristischen Parametern allein für Käse und die einzelnen Proteinzusätze eine große Herausforderung darstellt. Außerdem weist Milch an sich natürliche Schwankungen in deren Zusammensetzung auf (Schlimme et al. 1995), was eine quantitative Bestimmung daraus gewonnener Schmelzrohwaren im fertigen Schmelzkäse zusätzlich erschwert.

Die Zusammensetzung der Rohware Käse schwankt zudem abhängig von der Sorte, den Reifungs- sowie Lagerungsbedingungen (Fox et al. 1998).

Eine Beeinflussung der Zusammensetzung der Rohwaren und des fertigen Schmelzkäseproduktes kann auch durch die, während des Schmelzkäseherstellungsprozesses eingesetzten, hohen Temperaturen und Schereinwirkungen hervorgerufen werden. Das Ausmaß einer solchen Belastung für handelsübliche Schmelzkäseproben ist dabei nur schwer abzuschätzen, da die genauen Herstellungsbedingungen in den einzelnen Proben weitgehend unbekannt sind.

Neben der Analyse handelsüblicher Schmelzkäse ( $n = 60$ ) wurden im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen auch verstärkt die Schmelzrohwaren sowie eingesetzte Proteinzusätze [Milcheiweiß- ( $n = 9$ ), Trockenmilch- ( $n = 7$ ) und Molkeerzeugnisse ( $n = 6$ )] hinsichtlich der gewählten Messgrößen charakterisiert. Ferner konnten von der Fima Hochland bereitgestellte Modell-Schmelzkäse mit genau bekannter Zusammensetzung untersucht werden. In diesen wurde jeweils eine definierte Menge an Käserohware durch die Proteinzusätze Magermilchpulver, Molkenpulver, Milchpulverkonzentrat sowie Säure- und Labcasein ersetzt. Ziel ist es, anhand dieser Proben Informationen zur Beeinflussung der Messgrößen während des Schmelzkäseherstellungsprozesses zu gewinnen. Weiterhin kann mittels der untersuchten Modell-Schmelzkäse beurteilt werden, inwieweit und ab welchen Konzentrationen eine Quantifizierung der Proteinzusätze anhand der jeweiligen Messgrößen im Schmelzkäse möglich ist. Nachfolgend sollen die Ergebnisse der analytischen Untersuchungen der chemischen Messgrößen dargelegt werden. Die

analytisch anspruchsvolleren Parameter Maillard-Reaktionsprodukte sowie Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und  $\kappa$ -Casein werden dabei ausführlich in gesonderten Abschnitten diskutiert.

## 4.1 Übersicht zu den analytischen Einzelkomponenten

### 4.1.1 Hauptinhaltsstoffe, Mineralstoffe und organische Säuren

#### 4.1.1.1 Hauptinhaltsstoffe

Zu dieser Gruppierung wird in der vorliegenden Arbeit neben dem Proteingehalt und der Trockenmasse auch der Lactosegehalt von Schmelzkäsen sowie Rohwaren zu deren Herstellung gezählt. Analytisch erfasst werden diese Parameter anhand der in den Kapiteln 3.5.1, 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen Methoden. Die im Rahmen der Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in den Grafiken **Abb. 4. 2** und **Abb. 4. 3** dargestellt.

Im linken oberen Teil der **Abb. 4. 2** sind die mittels der Kjeldahl-Methode erhaltenen Proteingehalte als Box-Plot-Grafik zusammengefasst. Anhand dieser können grafisch sehr anschaulich die Mittelwerte (Kreuz innerhalb der Boxen), der Median (Querlinie innerhalb der Boxen), die oberen und unteren Höchstwerte (Kreuze außerhalb der Boxen) sowie die Bereiche in denen zwischen 25 % und 75 % aller Messwerte liegen (entspricht den Boxen) gezeigt werden. Zusätzlich repräsentieren die kleinen außerhalb der Boxen liegenden Balken die Messbereiche in denen 5 % bis 95 % des Datensatzes lokalisiert sind.

In den 60 untersuchten handelsüblichen Schmelzkäsen wurden Proteingehalte von minimal 9,3 bis maximal 20,4 % ermittelt. Der über alle analysierten Proben gemittelte Proteingehalt wurde zu 15,7 g / 100 g bestimmt. Vergleichbare Proteingehalte weisen die untersuchten Käse- (Mittelwert - 24,7 %) und Molkenpulverproben (Mittelwert 11,8 %) auf. Für Erstere wurden Proteingehalte von 9,5 bis 34,0 g / 100 g ermittelt. Die sechs analysierten Molkenpulver (MP) enthielten von 10,4 bis 13,3 g / 100 g Protein. Geringfügig höhere Anteile an Protein konnte in den analysierten Magermilchpulvern (MMP) bestimmt werden. In diesen liegen Gehalte von 33,4 bis 35 % vor. Im Gegensatz zu den Schmelzkäseproben sind die, in den Milcheiweißerzeugnissen ermittelten, Proteingehalte um den Faktor 4 bis 8 höher. Für Säurecasein (SC), Labcasein (LC) sowie Milchpulverkonzentrat (MPC) wurde der enthaltene Anteil an Protein zu 85 %, 79 % bzw. 80 % ermittelt.

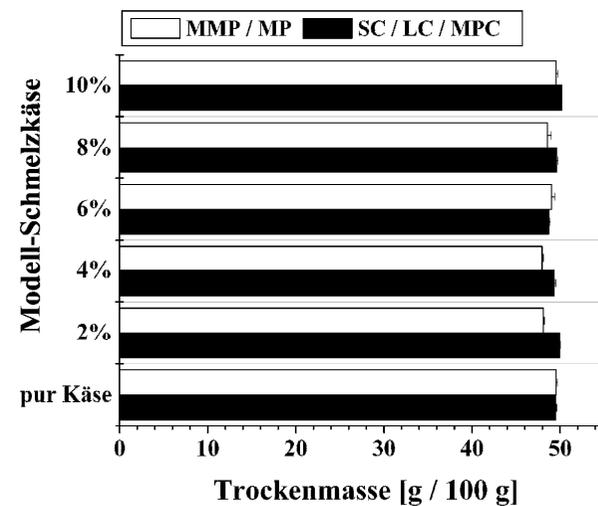
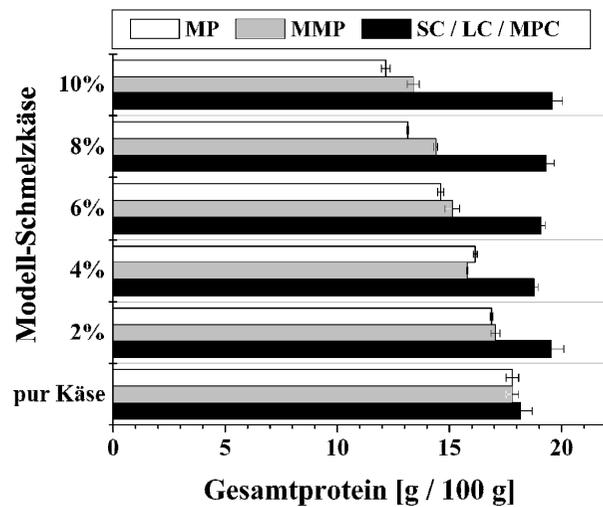
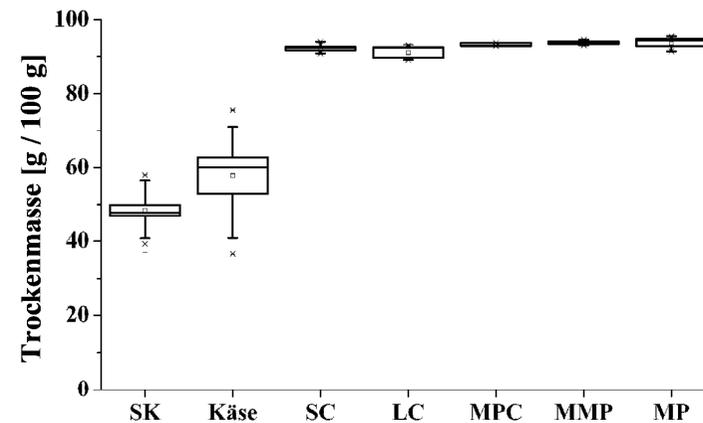
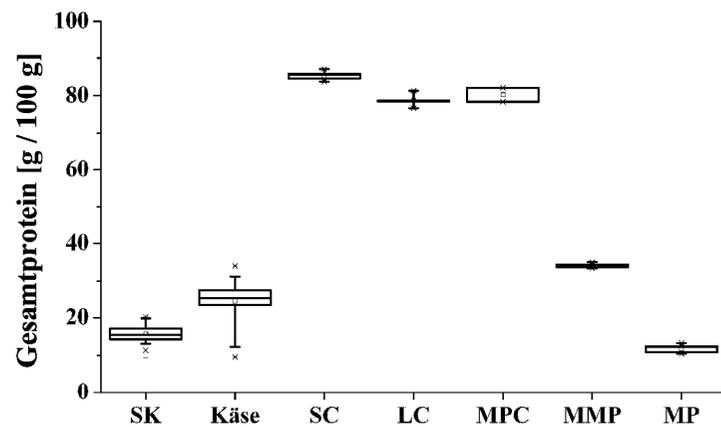
Innerhalb der untersuchten Schmelzkäse sowie der Proteinpulver treten nur geringe Streuungen der Proteingehalte auf. Erkennbar wird dies durch sehr schmale Box Plots

(Abb. 4. 2, oben links). Anhand der rechnerisch ermittelten Standardabweichungen für den Proteingehalt kann dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Proteingehalte schwanken innerhalb der Schmelzkäse und Proteinpulver dabei nur zwischen 0,6 bis maximal 2,2 g / 100 g. Im Vergleich dazu, weisen die untersuchten Käse eine deutlich größere Schwankung auf. Die Ursachen hierfür liegen in den unterschiedlichen Verfahren, welche zur Herstellung der Käse eingesetzt werden. Die je nach hergestellter Käsesorte durchgeführte Bruchbearbeitung und der anschließende Pressvorgang bestimmen dabei maßgeblich die enthaltene Restfeuchte und damit indirekt den Anteil an Gesamtprotein (Pellegrino et al. 1996, Bley et al. 1985). In der bei fast allen Käsen anschließend ablaufenden Reifungsphase, welche zur Entstehung der charakteristischen Aroma- und Geschmackskomponenten in diesen beiträgt (Fox et al. 2004, McSweeney et al. 2000), findet eine weitere Reduzierung des im Käse enthaltenen Wasseranteiles statt. Dies wirkt sich ebenso auf eine Erhöhung der Proteingehalte aus. Für eine quantitative Bestimmung des Käseanteils in Schmelzkäsen ist dies jedoch hinderlich, da kein fester Basiswert an Protein für diese Rohware definiert werden kann.

Anhand definiert hergestellter Modell-Schmelzkäse soll anschließend ermittelt werden, inwieweit ein Austausch von Käserohware durch die im Rahmen der Arbeit untersuchten Proteinpulver MMP, MP, SC, LC sowie MPC nachweisbar ist. Beim Ersatz von Käse durch SC, LC und MPC ist in Schmelzkäsen mit deutlich ansteigenden Proteingehalten zu rechnen, was sich auch in der Realität sehr anschaulich zeigt (Abb. 4. 2, links unten). Die Proteingehalte steigen dabei von ursprünglich 18 % in den Schmelzkäsen ohne Zusatz an Proteinpulver auf etwa 19,8 % in denen mit 10 % Zusatz an SC, LC bzw. MPC an. Ein gegenteiliger Effekt ist in den Proben mit zugesetztem MP und MMP festzustellen. Bei einem maximalem Anteil an Proteinpulver bis zu 10 % sinken die im Modell-Schmelzkäse ermittelten Proteingehalte signifikant um 32 % bzw. 26 % auf nur noch 12,2 % bzw. 13,4 % ab (Abb. 4. 2, links unten).

Die eindeutige und quantitative Abgrenzung der eingesetzten Rohwaren in Schmelzkäsematrices ist mittels des Proteingehaltes basierend auf den dargelegten Ergebnissen allein nicht möglich. Anhand niedriger Anteile an Protein in Schmelzkäsen kann jedoch ein Hinweis auf den Austausch von Käserohware durch MP und / oder MMP gewonnen werden. Im Gegensatz dazu deutet ein hoher Proteingehalt auf viel Käse bzw. anteilig auch viel Protein aus Milcheiweißerzeugnissen in Schmelzkäsen hin.

Als weiterer Hauptinhaltsstoff wurde im Rahmen der wissenschaftlichen Studie der Wasseranteil bzw. die Trockenmasse zur Beurteilung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen und dessen Inhaltsstoffen herangezogen. Die in den handelsüblichen Schmelzkäsen ermittelte Trockenmasse schwankt dabei von 37 bis 58 % (Abb. 4. 2, oben rechts). Der Mittelwert der Trockenmasse der untersuchten Proben konnte somit zu 48 % bestimmt werden.



**Abb. 4.2 links oben:** Proteingehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)

**links unten:** Gemittelte Proteingehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n = 3)

[SK - Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC- Säurecasein, LC – Labcasein].

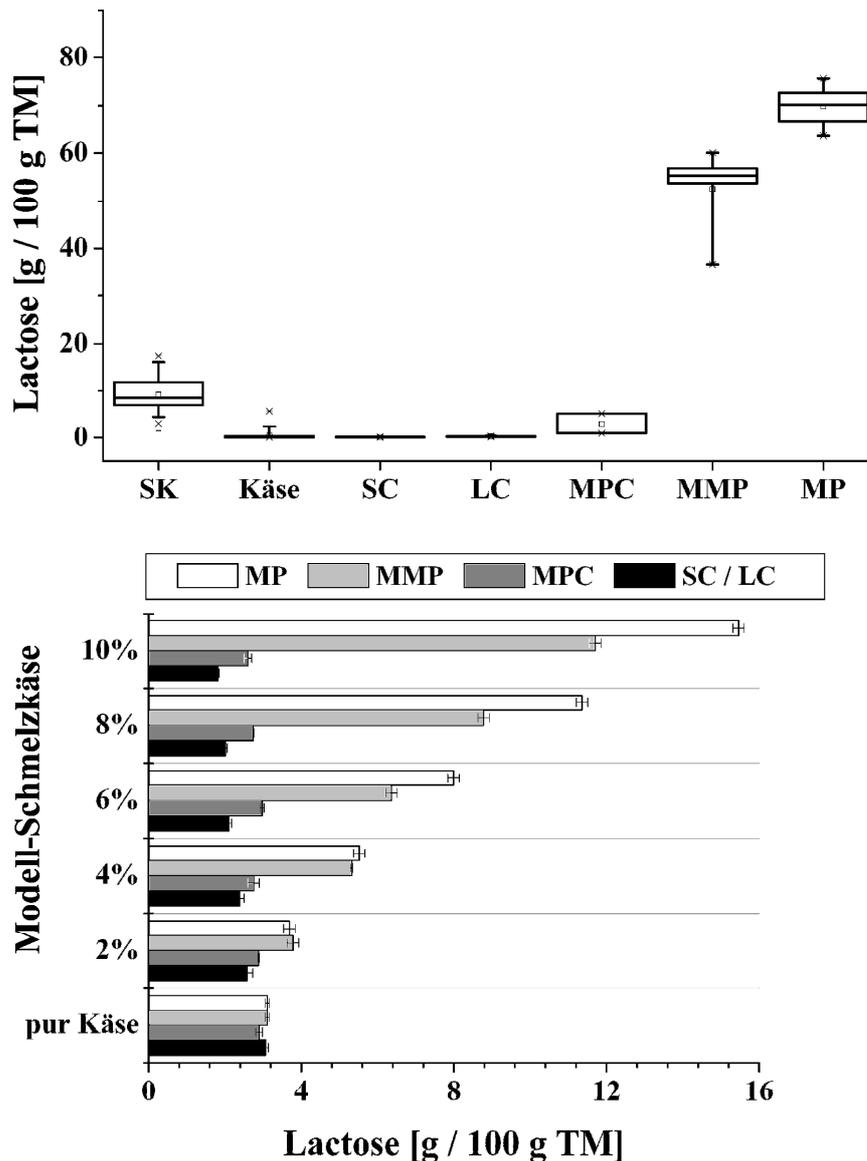
**rechts oben:** Trockenmasse von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)

**rechts unten:** Gemittelte TM-Gehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n = 3)

Als nächste Frage bleibt nun zu klären, welche Rohware dabei maßgeblich die Trockenmasse dieser Produkte bestimmt. Käse, welche den Großteil einer Schmelzkäserezeptur ausmachen, weisen Trockenmassen von minimal 36,6 % bis maximal 75,7 % auf (**Abb. 4. 2**). Je nach eingesetzter Käsesorte wird somit maßgeblich die Restfeuchte im Schmelzkäseprodukt bestimmt. Die klassisch zur Schmelzkäseherstellung eingesetzten Schnitt- und Hartkäse liegen dabei im oberen Drittel (55 bis 75 %). Frischkäse hingegen weisen deutlich niedrigere Trockenmassegehalte auf. Infolge der Bruchbearbeitung, des Abpressens von Molke und der anschließenden Reifung und Lagerung der Käse steigt die Trockenmasse kontinuierlich an (Pellegrino et al. 1996, Bley et al. 1985). Für Käse als auch Schmelzkäse sind große Schwankungen der Trockenmassen innerhalb dieser bestimmt worden. Anhand der in **Abb. 4. 2** (rechts oben) dargestellten sehr breiten Box-Plots ist dies für Käse als auch Schmelzkäse ersichtlich. Im Gegensatz dazu schwanken die ermittelten Trockenmassegehalte innerhalb der untersuchten Proteinpulver nur gering, was durch sehr schmale Box Plots repräsentiert wird (**Abb. 4. 2**, rechts oben). Die Trockenmassen dieser Rohwaren liegen dabei mit 89 % bis 96 % im Vergleich zu Käsen und Schmelzkäsen deutlich höher. Ein Einsatz dieser Proteinpulver in Schmelzkäsen sollte infolgedessen zu einer Anhebung der Trockenmasse führen.

Um diese These zu untermauern wurden die bereitgestellten Modell-Schmelzkäse mit ansteigendem Zusatz an Proteinpulver bis 10 % und gleichzeitig absinkendem Käseanteil hinsichtlich einer Veränderung der Trockenmasse analysiert. Die dazu erhaltenen Daten sind in **Abb. 4. 2** (rechts unten) dargestellt. Entgegen der Erwartung konnte weder durch den Zusatz an SC, LC, MPC, MMP noch MP eine signifikante Erhöhung der Trockenmasseanteile festgestellt werden. Stattdessen wurde in allen untersuchten Modell-Schmelzkäsen eine Trockenmasse von 49 % bzw. 50 % ermittelt. Ein zusätzlicher Informationsgewinn, vergleichbar zum Proteingehalt, ist anhand dieser Messgröße somit nicht möglich. Die in den handelsüblichen Schmelzkäsen festgestellten signifikanten Unterschiede der Trockenmasse von 37 % bis 58 % spiegeln jedoch deutlich die Relevanz dieser Messgröße wieder, weshalb diese in die abschließend durchgeführte statistische Auswertung der Daten mit einfließt.

Abbildung 4.3 spiegelt die Ergebnisse der Lactosebestimmung in Schmelzkäsen, Käsen und Proteinpulvern wieder. Der für alle untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse bestimmte Mittelwert des Lactosegehaltes wurde zu 9,2 g / 100 g TM bestimmt. Anhand des Box Plots (**Abb. 4. 3**, oben) sowie der rechnerisch ermittelten Spannweite ist die Heterogenität dieser Messgröße innerhalb der Schmelzkäseproben deutlich ablesbar. Die ermittelten Lactosegehalte schwanken von 1,5 bis 17,4 g / 100 g TM. Anhand dieser Messgröße kann somit eindeutig eine Eingruppierung der handelsüblichen Schmelzkäse in Produkte mit viel bzw. wenig Lactose vorgenommen werden.



**Abb. 4.3 oben:** Lactosegehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)

**unten:** Gemittelte Lactosegehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3) [SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchprotein-konzentrat, SC- Säurecasein, LC – Labcasein]

Im Vergleich dazu schwanken die Gehalte an Lactose innerhalb der untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung deutlich weniger. Die analysierten Rohwaren können eindeutig in eine Gruppe mit geringem Anteil an Lactose sowie in eine mit sehr hohem Anteil eingeteilt werden. Die Erste beinhaltet neben der Käserohware und den Milcheiweißerzeugnissen (LC, SC) auch MPC. In diesen wurden Lactosegehalte von maximal 5,8 % quantifiziert. In den untersuchten SC- und LC-Proben konnten sogar nur Lactoseanteile von kleiner als 0,5 % nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu weisen die analysierten MPC- und Käseproben mit maximal 5,2 % bzw. 5,8 % zum Teil deutlich höhere Anteile an dieser Messgröße auf. Der Mittelwert des Lactosegehaltes der analysierten Käse wurde zu 0,6 % bestimmt. Sehr hohe Mengen an Lactose konnten

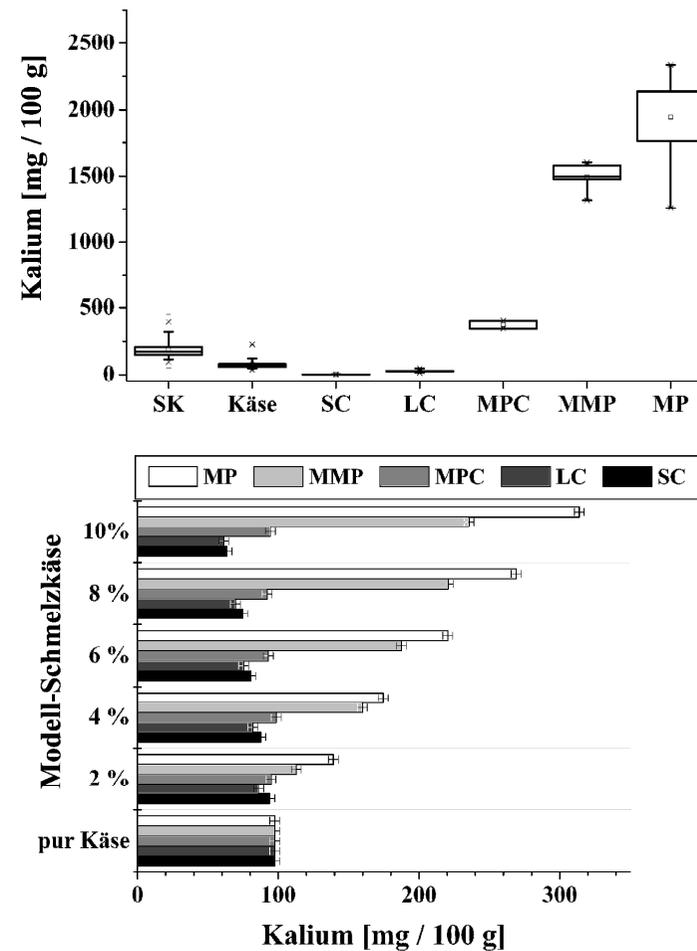
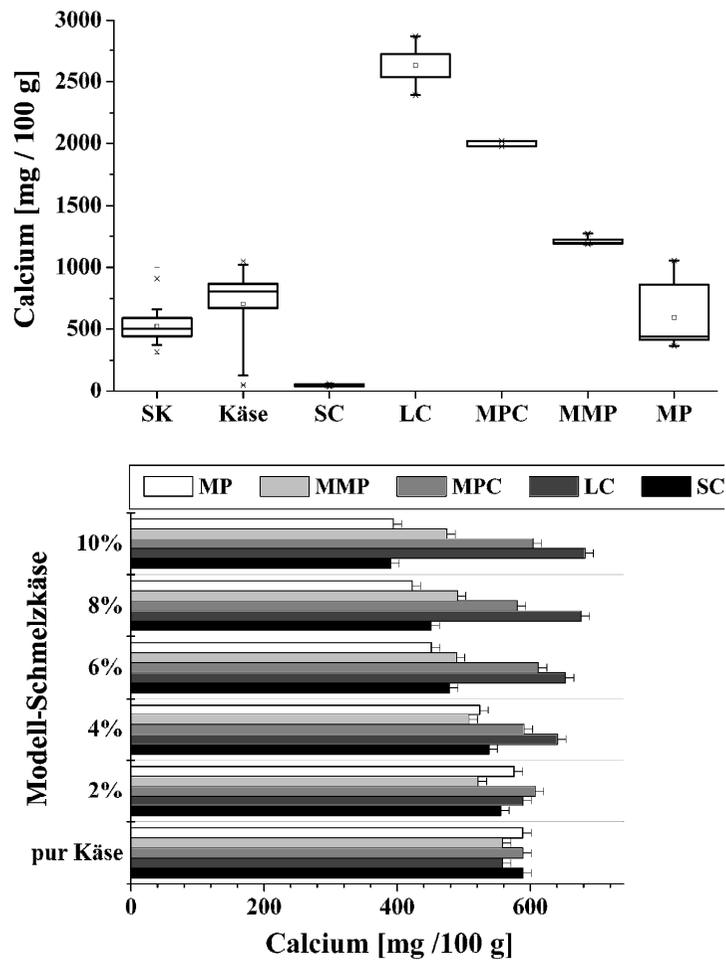
nur in Frischkäsen und sehr kurz gereiften Weißschimmelkäsen ermittelt werden. In den hauptsächlich zur Herstellung von Schmelzkäsen eingesetzten Schnitt- und Hartkäsen ist Lactose hingegen, in Folge der mikrobiellen Aktivität der Starter- und zum Teil auch Nicht-Starterkulturen, nur noch in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Die im Käse enthaltene Lactose wird dabei maßgeblich durch die Käsesorte und die darin enthaltenen Mikroorganismen beeinflusst (Hayaloglu et al. 2005, McSweeney et al. 2004a, Hayaloglu et al. 2007). Zur zweiten Gruppe mit einem Anteil an Lactose von 37 % bis 76 % können nur noch MMP und MP zugeordnet werden. Die in MP enthaltenen Konzentrationen übertreffen die in MMP gefundenen dabei im Mittel um etwa 25 %.

Anhand der aus handelsüblichen Proben gewonnenen Erkenntnisse kann geschlussfolgert werden, dass ein Austausch von Käse durch SC, LC und MPC in Schmelzkäsen nicht anhand der Lactosegehalte nachweisbar sein wird. Im Gegensatz dazu sollte ein Zusatz an MMP und MP in diesen Erzeugnissen durch das Auftreten deutlich erhöhter Lactosegehalte belegbar sein. Zur Kontrolle der soeben getroffenen Hypothese wurden Modell-Schmelzkäse definiert mit Proteinpulver bis zum Erreichen eines maximalen Anteiles von 10 % versetzt. Abbildung **Abb. 4. 3** (unten) fasst die daraus erhaltenen Ergebnisse zusammen. Ein Austausch an Käse durch LC oder SC in Schmelzkäsen ist anhand dieser Untersuchungen eindeutig durch das Absinken der Lactosegehalte um bis zu 40 % nachweisbar. Im Gegensatz dazu erhöht ein 10 %iger Zusatz an MP und MMP die Lactosekonzentration signifikant um 500 % bzw. 380 %. Ein Austausch von Käse durch MPC führt hingegen zu keinen signifikanten Veränderungen dieser Messgröße, da die in den Rohwaren enthaltenen Lactosemengen nahezu identisch sind.

In Bezug auf die Hauptinhaltsstoffe (Protein, Trockenmasse, Lactose) kann eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen durchgeführt werden. Ein erhöhter Protein- und Trockenmassegehalt weist dabei auf den vermehrten Ersatz von Käserohware durch Milcheiweißerzeugnisse (SC, LC) sowie MPC hin. Durch einen Zusatz an MMP sowie MP zu Schmelzkäseerzeugnissen ist eine signifikante Erhöhung der Lactosekonzentrationen nachweisbar. Käse und Milcheiweißerzeugnisse sind dagegen nahezu frei von Lactose und beeinflussen diese Messgröße somit nicht.

#### *4.1.1.2 Mineralstoffe*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mineralstoffe Calcium und Kalium als weitere mögliche Marker für den Austausch von Käserohware in Schmelzkäsen durch Proteinpulver bewertet. Analytisch erfasst wurden beide Mineralstoffe mittels ionenselektiver Elektroden basierend auf den in Abschnitt 3.5.6 dargelegten Methoden.



**Abb. 4.4 links oben:** Calciumgehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)  
**links unten:** Gemittelte Calciumgehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)  
 [SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC- Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** Kaliumgehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)  
**rechts unten:** Gemittelte Kaliumgehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)

Die anhand dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst. Besonders auffällig sind dabei die für beide Mineralstoffe auftretenden großen Gehaltsunterschiede innerhalb der untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse. Calcium konnte in diesen in Konzentrationen von 297 bis 1003 mg / 100 g ermittelt werden Die Gehalte an Kalium sind mit 51 bis 452 mg / 100 g um etwa 25 bis 50 % niedriger. Aufgrund der ausgeprägt schwankenden Gehalte beider Mineralstoffe innerhalb der untersuchten Schmelzkäseproben, sind diese zur qualitativen Unterscheidung handelsüblicher Schmelzkäse somit prinzipiell geeignet. Die ermittelten Gehalte an Mineralstoffen können dabei um den Faktor 5 bzw. 10 variieren.

Weiterhin wurden Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung auf deren Gehalte an Calcium und Kalium untersucht. Ziel ist es dadurch mögliche Eintragsquellen an beiden Mineralstoffen zu Schmelzkäseerzeugnissen zu identifizieren. Rohwaren, welche sich durch sehr hohe Calciumgehalte auszeichnen, sind LC (>2400 bis <2900 mg / 100 g) sowie MPC (2000 mg / 100 g) (Abb. 4. 4). Käse, MMP und MP weisen hingegen mit etwa 600 bis maximal 1200 mg / 100 g geringere Anteile an diesem Mineralstoff auf. In Käsen sind dabei vergleichbar große natürliche Schwankungen innerhalb des Calciumgehaltes wie bei den Schmelzkäsen zu finden. Die in den unterschiedlichen Käserohwaren ermittelten Konzentrationen reichen von 52 bis 1051 mg / 100 g bzw. 90 bis 1812 mg / 100 g TM. Der daraus resultierende mittlere Ca-Gehalt in den untersuchten Käsen ergab sich zu 705 mg / 100 g Käse bzw. 1215 mg / 100 g TM. Solche ausgeprägten natürlichen und herstellungsbedingten Schwankungen des Ca-Levels sind für die Käserohware charakteristisch, wobei mit 450 bis 4040 mg / 100 g TM noch weitaus höhere Gehalte erfasst wurden (Gonzalez-Martin et al. 2011, Morenorojas et al. 1994).

Zum Teil deutlich geringere Konzentrationen wurden hingegen in den untersuchten Säurecaseinen gefunden (max. 61 mg / 100 g). Während der Gewinnung dieser aus Milch wird das zumeist am Casein gebundene Calcium dabei nahezu vollständig entfernt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Eintrag an Calcium durch die Rohwaren basierend auf den dargestellten Daten nur durch LC und MPC erfolgt. Anhand von Modell-Schmelzkäserezepturen konnte dies im Fall eines LC-Zusatzes bestätigt werden (Abb. 4. 4, unten links). Die Calciumgehalte steigen bei einem Zusatz von 10 % LC von anfänglich etwa 560 auf 680 mg / 100 g an. Tauscht man in Modell-Schmelzkäsen Käse durch bis zu 10 % SC, MP bzw. MMP aus, so sinken die enthaltenen Konzentrationen an Calcium kontinuierlich von anfangs 560 auf 390 bzw. 475 mg / 100 g ab. Dies entspricht einer Verringerung der Calciumkonzentration um 30 bzw. 15 %.

Analysiert man die in **Abb. 4. 4** oben rechts dargestellten Box Plots der Kaliumgehalte, so erhält man ein vergleichbares Ergebnis wie bei den Lactosegehalten. MP, MMP und MPC weisen neben hohen Lactose- auch hohe Kaliumgehalte auf. Die für diese Proteinzusätze gemittelten Werte wurden zu 1948, 1495 und 374 mg / 100 g Probe ermittelt. Ein Austausch des im Schmelzkäse enthaltenen Käses durch MP und MMP führt also zu einer signifikanten Erhöhung der Kaliumgehalte. In der unten rechts dargestellten Grafik (**Abb. 4. 4**) ist dies sehr anschaulich gezeigt. Die Konzentration an Kalium steigt nach Zusatz von 10 % MMP in diesen Modell-Schmelzkäsen von 100 auf 230 mg / 100 g an. Ersetzt man den Käseanteil durch 10 % MP, so erhöht sich der Kaliumgehalt sogar auf etwa 315 mg / 100 g Schmelzkäse. Käse als mengenmäßig dominierende Rohware von Schmelzkäsen enthält mit nur 28 bis 226 mg / 100 g sehr viel geringere Kaliumkonzentrationen. Die hohe Streuung ist dabei wiederum stark durch die natürlich schwankenden Gehalte an Kalium in der Käseimilch sowie den käsesortenspezifischen Herstellungsprozess geprägt (Gonzalez-Martin et al. 2011, Morenorojas et al. 1994). Die in SC- und LC-Proben nachweisbaren Kaliumlevel liegen mit < 50 mg / 100 g z.T. noch deutlich unter den in Käse vorliegenden Konzentrationen. Ein Austausch von Käse durch diese Milcheiweißerzeugnisse sollte somit in Schmelzkäsen zu einer Verringerung der Kaliumkonzentration führen. Anhand der Untersuchung definiert hergestellter Modell-Schmelzkäse konnte dies ebenso eindeutig nachgewiesen werden. Die anteilig enthaltenen Kaliumgehalte sinken bei einem Zusatz von maximal 10 % SC oder LC um etwa 36 % ab.

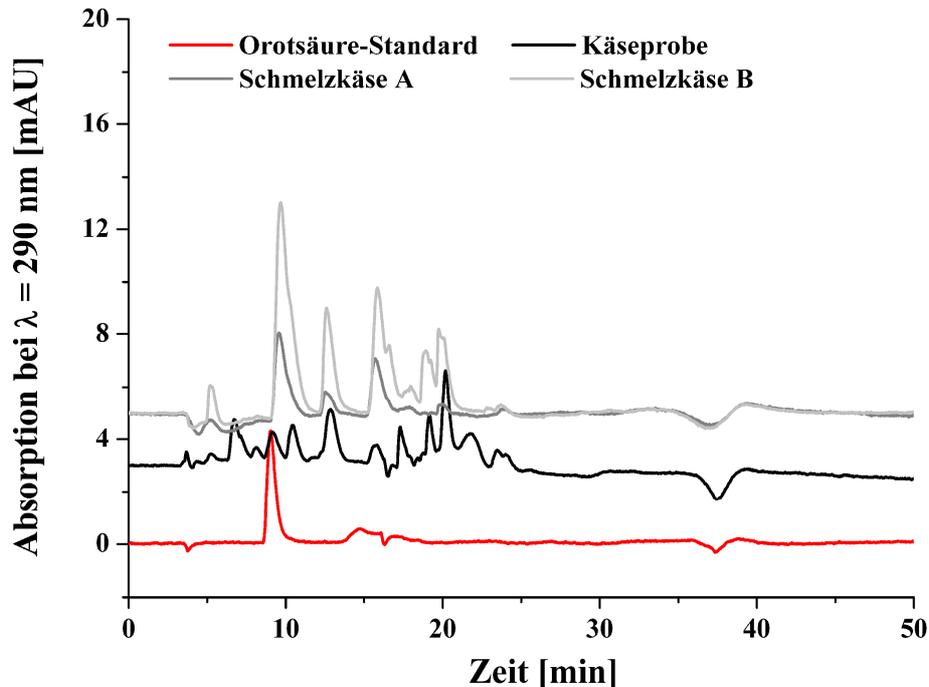
Anhand der dargelegten Messgrößen Calcium und Kalium kann ein Zusatz von LC oder MPC bzw. MMP oder MP zu Schmelzkäse in Modell- als auch Handelsproben qualitativ nachgewiesen werden. Allein mittels dieser beiden Messgrößen kann jedoch nicht auf die Art des Proteinzusatzes geschlossen werden.

#### *4.1.1.3 Organische Säuren*

Als Vertreter der organischen Säuren werden Orotsäure und Milchsäure hinsichtlich deren Eignung als Marker für den in Schmelzkäseerzeugnissen enthaltenen Anteil an Käse diskutiert. Orotsäure, die im Zuge des Pyrimidinstoffwechsels gebildet wird und originär in Milch enthalten ist, wurde im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen analytisch mittels RP-HPLC erfasst (Tormo et al. 2004). **Abbildung 4.5** zeigt exemplarisch ein ausgewähltes RP-HPLC Chromatogramm einer Käse- sowie zweier Schmelzkäseproben.

Die Identifizierung der bei 9,5 min eluierenden Substanz erfolgte anhand des Vergleiches der Retentionszeit sowie des UV-Spektrums mit denen eines kommerziell erhältlichen Orotsäurestandards. Die zur Probenvorbereitung und zur chromatographischen Analyse notwendigen Chemikalien und Bedingungen sind

Abschnitt 3.5.5 zu entnehmen. Die dargestellten Chromatogramme weisen dabei deutliche Unterschiede in der Anzahl der Signale und deren Intensitäten auf. Käse enthält mehr Peaks, welche jedoch z.T. in geringeren Intensitäten vorliegen. Sowohl in Käse als auch in den analysierten Schmelzkäsen konnte Orotsäure eindeutig nachgewiesen werden.

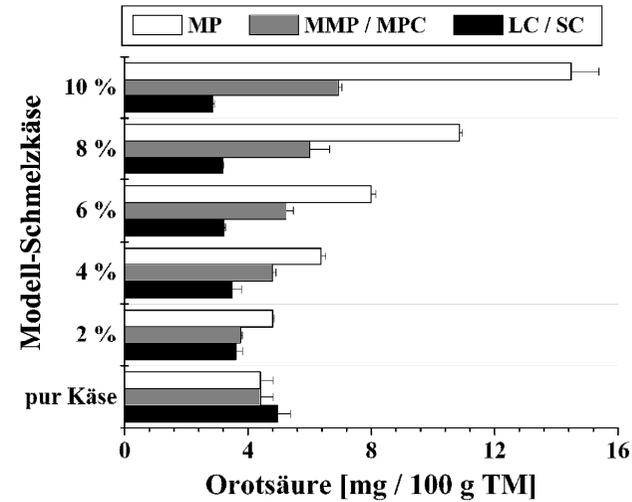
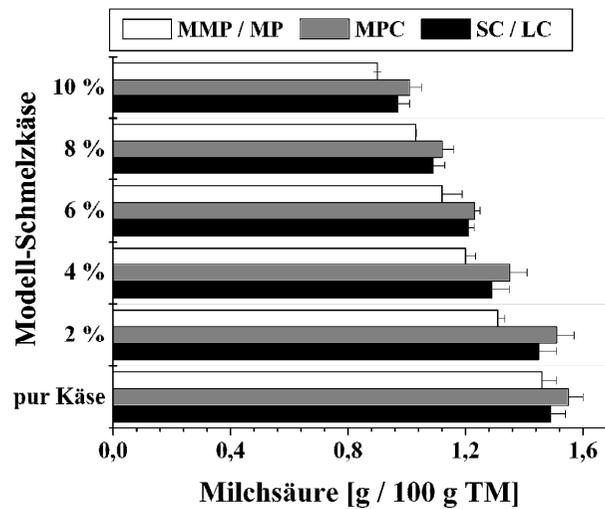
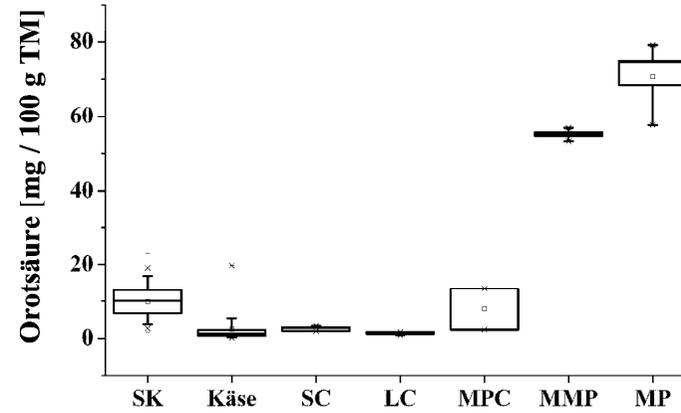
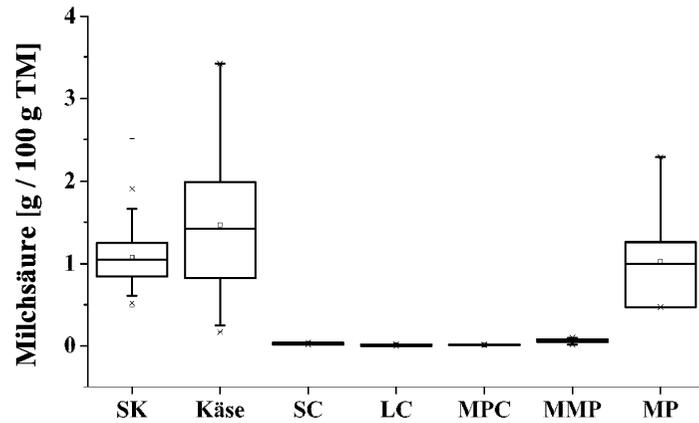


**Abb. 4.5** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 290 nm zur Orotsäurebestimmung in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. [Darstellung übereinandergelagerter Chromatogramme zweier Schmelzkäse, einer Käseprobe sowie eines kommerziell erhältlichen Orotsäurestandards]

Im Vergleich dazu wird Milchsäure mittels einer gerätetechnisch weniger aufwendigen enzymatischen Methode quantifiziert (vergleiche dazu Abschnitt 3.5.4). Die im Rahmen der Untersuchungen der organischen Säuren in Käsen und Schmelzkäsen erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die untersuchten handelsüblichen Schmelzkäseproben weisen für Orotsäure eine deutlich ausgeprägtere Streuung als beispielsweise für Milchsäure auf. So schwanken die Orotsäuregehalte innerhalb der Schmelzkäseerzeugnisse um etwa das 15fache (1,6 bis 23,3 mg / 100 g TM). Im Gegensatz dazu wurden Milchsäuregehalte von etwa 0,5 bis 2,5 g / 100 g TM in Schmelzkäseerzeugnissen nachgewiesen.

Nachfolgend wurden ebenso die zur Schmelzkäseherstellung eingesetzten Rohwaren auf deren Gehalte an Orotsäure und Milchsäure hin untersucht, um einzugrenzen welche Rohwaren diese in den Schmelzkäse einbringen. Weiterhin muss in diesem Zusammenhang geprüft werden, inwieweit diese Messgrößen als Marker für die quantitative Bestimmung der Rohwaren in Schmelzkäsen herangezogen werden können.



**Abb. 4.6 links oben:** Milchsäuregehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)  
**links unten:** Gemittelte Milchsäuregehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)  
 [SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC- Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** Orotsäuregehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)  
**rechts unten:** Gemittelte Orotsäuregehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)

In Käsen, welche zu Schmelzkäsen als geschmacks- sowie als texturbestimmende Komponente eingesetzt werden, wurden Orotsäuregehalte von 0,15 bis 19,7 mg / 100 g TM ermittelt. Der über alle untersuchten Käse bestimmte Mittelwert liegt mit nur 2,5 mg / 100 g TM am unteren Ende dieses Bereiches. In Käsen sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, demzufolge nur sehr geringe Orotsäuregehalte nachweisbar, womit diese Rohware als Haupteintragsquelle zu Schmelzkäsen ausscheidet. Sehr anschaulich ist dies in **Abb. 4. 6** rechts oben anhand eines sehr schmalen Box Plots für Käse gezeigt. Abgesehen von zwei Proben, welche etwa 20 mg Orotsäure / 100 g TM enthalten (K9, EMC Maasdamer), weisen alle anderen deutlich geringere Gehalte an Orotsäure auf (max. 5,4 mg / 100 g TM). Während der Käseherstellung wird Orotsäure basierend auf der sehr guten Wasserlöslichkeit mit der Molke vom Käsebruch abgetrennt. Je nach Bruchbearbeitung und Pressung, welche in Abhängigkeit der Käsesorte erheblich variieren können, verbleibt mehr oder weniger Orotsäure im Käsebruch. Für Schnitt- und Hartkäse, die typischerweise zur Herstellung von Schmelzkäsen eingesetzt werden, konnten Orotsäuregehalte von kleiner als 3,8 mg / 100 g TM nachgewiesen werden. Der Mittelwert an Orotsäure wurde in diesen Sorten (n=19) zu  $[1,2 \pm 0,8]$  mg / 100 g TM bestimmt. Durch die stärkere Bruchbearbeitung und Pressung dieser Käse wird der größte Teil der Molke und damit auch die Orotsäure entfernt. In Frisch- und Weißschimmelkäsen wurden hingegen Orotsäurekonzentrationen von bis zu 5,4 mg / 100 g TM ermittelt. Die in Milch natürlich schwankende Konzentration an Orotsäure, bedingt durch die Kuhrasse, die Laktationsphase sowie eine jahreszeitlich variierende Fütterung, trägt neben der Reifung von Käsen ebenso zu den beobachteten Schwankungen bei (Buiarelli et al. 2003, Akalin et al. 2002).

Die in Schmelzkäserezepturen eingesetzten Proteinpulver können anhand der darin ermittelten Orotsäuregehalte in 3 Gruppen unterteilt werden. Sehr anschaulich zeigt dies **Abb. 4. 6** rechts oben, wobei SC und LC mit Gehalten  $< 3,3$  mg / 100 g TM vergleichbar niedrige Orotsäurekonzentrationen wie die Käserohware aufweisen. Ein Austausch von Käse in Schmelzkäsen durch SC oder LC sollte demzufolge zu leicht absinkenden bis gleichbleibenden Anteilen an Orotsäure führen. Im Gegensatz dazu ist ein MP- oder MMP-Zusatz in Schmelzkäsen durch sehr hohe Orotsäurekonzentrationen gekennzeichnet, da diese Messgröße in Gehalten von 71 bzw. 55 mg / 100 g TM darin enthalten ist. Für MPC ist basierend auf den ermittelten Konzentrationen nur schwer eine Aussage zur möglichen Beeinflussung des Orotsäuregehaltes in Schmelzkäsen möglich.

Untersuchungen von Modell-Schmelzkäsen zur Bewertung und Bestätigung der dargelegten Vermutungen wurden abschließend durchgeführt (**Abb. 4. 6**, rechts unten). Anhand dieser Versuche ist eindeutig bei einem Austausch von Käse in Schmelzkäsen durch MPC, MMP sowie MP ein ansteigender Orotsäuregehalt im untersuchten

Probenspektrum festzustellen. Bei Austausch von Käse in Schmelzkäsen durch 10 % MMP oder MPC steigt der Gehalt an Orotsäure um etwa 63 % an. Durch 10 % MP in Schmelzkäsen ist dieser Wert sogar auf knapp 330 % steigerbar. Der Zusatz von SC und LC zu Schmelzkäsen führt hingegen zu absinkenden Gehalten an Orotsäure.

Betrachtet man anstatt der Orotsäure- die Milchsäuregehalte der Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung so ergibt sich ein vollkommen anderes Bild (**Abb. 4. 6**, links oben). Mit Ausnahme von MP konnten in den Rohwaren SC, LC, MPC als auch MMP Milchsäuregehalte von weniger als 0,06 g / 100 g TM ermittelt werden. Die in handelsüblichem Schmelzkäse gefundenen Milchsäureanteile von 0,5 bis maximal 2,5 g / 100 g TM können demzufolge nicht durch diese Proteinpulver eingetragen worden sein. Käse (0,2 bis 3,4 %) als wie auch MP (0,5 bis 2,3 %) enthalten im Vergleich dazu deutlich mehr Milchsäure. Diese entsteht erst nach Zugabe von Milchsäurebakterien während der Käseherstellung und führt zu einem mikrobiellen Abbau der enthaltenen Lactose zu Milchsäure. Die im fertigen Käse enthaltenen Konzentrationen an Milchsäure werden dabei durch die eingesetzten Milchsäurekulturen sowie die während der Käseherstellung und anschließenden Reifung vorherrschenden Bedingungen beeinflusst (McSweeney et al. 2004a). In MP enthaltene Milchsäure entsteht ebenso durch die bei der Käseherstellung zugesetzten Starterkulturen. Man unterscheidet dabei Süß- und Sauermolke, welche in Abhängigkeit der Herstellung unterschiedliche Gehalte an Milchsäure (1500 - 4700 mg / 100 g TM) aufweisen kann (Souci et al. 2008).

Üblicherweise wird in Schmelzkäsen zumeist nur Süßmolke eingesetzt, da diese in weitaus größeren Mengen bei der Herstellung von Labkäse im Vergleich zu Quark oder Dickmilch anfällt.

Mittels speziell hergestellter Modell-Schmelzkäserezepturen, in denen definiert Käse durch die Proteinpulver SC, LC, MPC, MMP sowie MP ersetzt wurde, sollten die anhand der Handelsproben erhaltenen Erkenntnisse überprüft werden. Dargestellt ist dies in **Abb. 4. 6** unten links. Unabhängig vom Zusatz kann für alle diese Schmelzkäse erwartungsgemäß ein Absinken der Milchsäurekonzentration beim Austausch von Käse durch die untersuchten Proteinpulver beobachtet werden. Der Gehalt an Milchsäure in Schmelzkäsen wird demzufolge maßgeblich durch den im Produkt enthaltenen Käse bestimmt. Je weniger davon im Schmelzkäse enthalten ist, desto geringere Milchsäurekonzentrationen liegen vor.

Eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen kann somit anhand der analysierten zwei organischen Säuren durchgeführt werden. Ein erhöhter Orotsäuregehalt weist dabei auf den vermehrten Ersatz von Käserohware durch MMP, MP und MPC hin. Die in Schmelzkäsen enthaltene Milchsäure wird nahezu vollständig durch die eingesetzte Käserohware eingetragen. Wird diese schrittweise ersetzt, sinkt

der Milchsäuregehalt kontinuierlich ab. Als alleiniger Marker zur Ermittlung des im Schmelzkäse eingesetzten Käseanteils kann Milchsäure jedoch nur begrenzt eingesetzt werden, da die Milchsäuregehalte reifungs- und käsesortenabhängig erheblich schwanken können (Califano et al. 2000, Upreti et al. 2006).

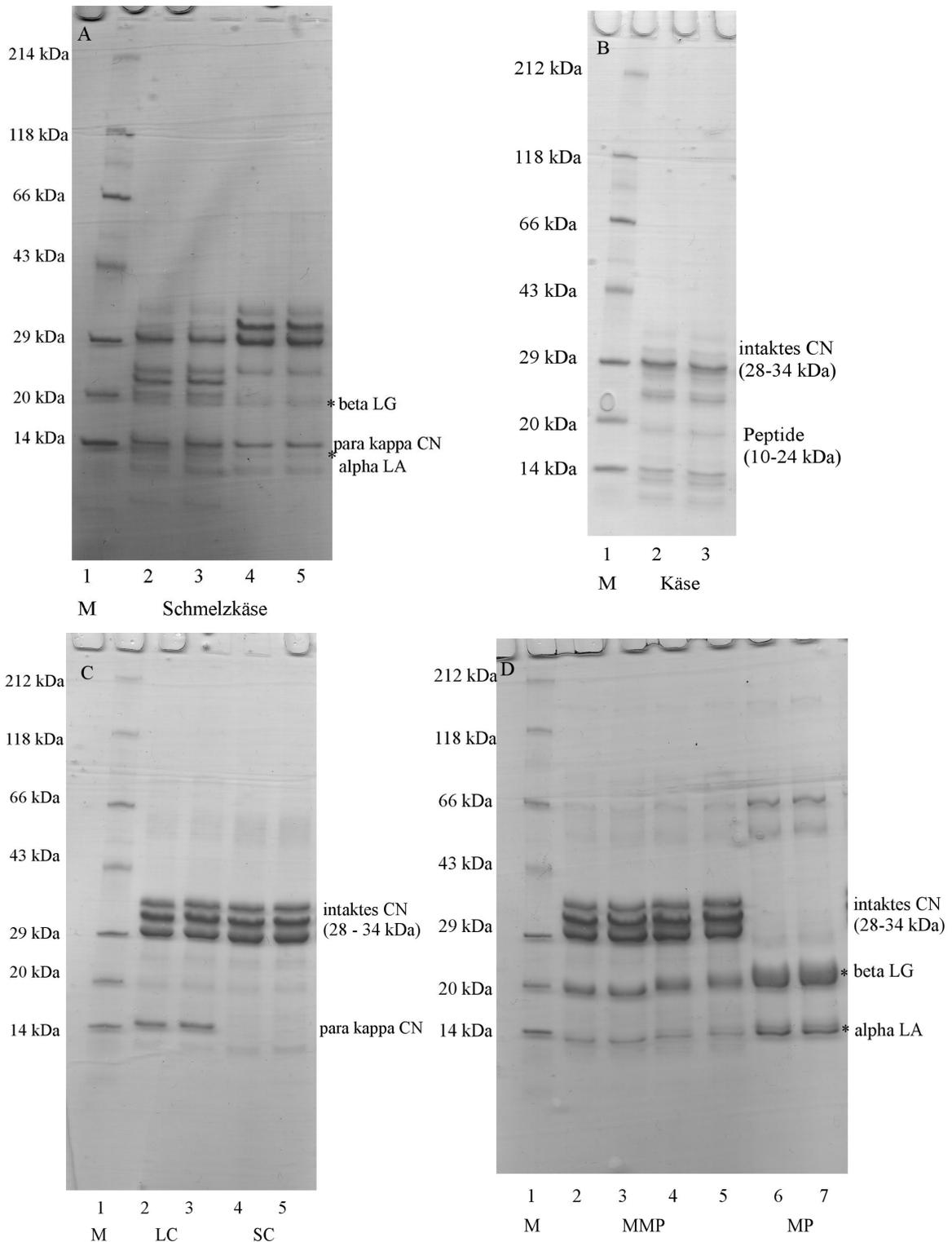
#### 4.1.2 Caseine, Molkenproteine und Proteolyseparameter

In Schmelzkäsematrices leisten Proteine neben der Fettphase einen maßgeblichen Anteil zur Ausbildung der Produktbeschaffenheit, der Qualität und v.a. der Textur (Heertje et al. 1981). Als proteineintragende Rezepturbestandteile von Schmelzkäseprodukten sind neben der Käserohware selbst auch Caseine sowie Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse zu nennen. Charakteristische proteinchemische Kenngrößen zur Unterscheidung dieser Milcherzeugnisse sind neben dem Verhältnis von Caseinen zu Molkenproteinen sowie deren Fraktionen auch die in Folge proteolytischer Prozesse ansteigenden Konzentrationen an Peptiden und Aminosäuren. Zur Analyse der Rezeptur von Schmelzkäseerzeugnissen werden diese Parameter mittels elektrophoretischer, chromatographischer sowie spektroskopischer Methoden (siehe Abschnitt 3.5.8, 3.5.9, 3.5.10 und 3.5.12) ermittelt. Die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend für ausgewählte proteinchemische Kenngrößen dargelegt. Diese bilden das analytische Grundgerüst, in welches alle weiteren Messgrößen Erkenntnis-orientiert eingegliedert werden. In Folge des komplexen Datensatzes werden exemplarisch nur ausgewählte proteinchemische Messgrößen detaillierter diskutiert. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden anschließend wieder alle erhobenen Daten zu proteinchemischen Markern in Schmelzkäsen und Rohwaren einbezogen.

##### 4.1.2.1 Caseine

Mittels SDS-Elektrophorese (3.5.10) wurden die Anteile an intaktem Casein (CN), Molkenprotein (MPr) und deren Fraktionen ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG) sowie ausgewählte, in Folge proteolytischer Prozesse gebildete, Peptide (u.a.  $\gamma$ -CN, para- $\kappa$ -CN) analysiert. Exemplarisch ist dies anhand der in Abbildung 4.7 dargestellten Elektropherogramme (A-D) gezeigt. Die Identifizierung der erhaltenen Banden erfolgte dabei anhand mitgeführter Standards. Im Anschluss an die qualitative Auswertung der Gele erfolgte die Quantifizierung der Anteile der jeweiligen Protein- und Peptidfraktionen nach densitometrischer Auswertung der Gele mittels einer speziellen Software (TotalLab) Dazu wurden die Bandenintensitäten (relative Flächen) der einzelnen Protein- / Peptidbanden auf alle innerhalb einer Bahn detektierbaren Banden bezogen und als prozentuale (relative) Anteile ermittelt. Die Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Methode hängt dabei stark vom verwendeten Färbereagenz

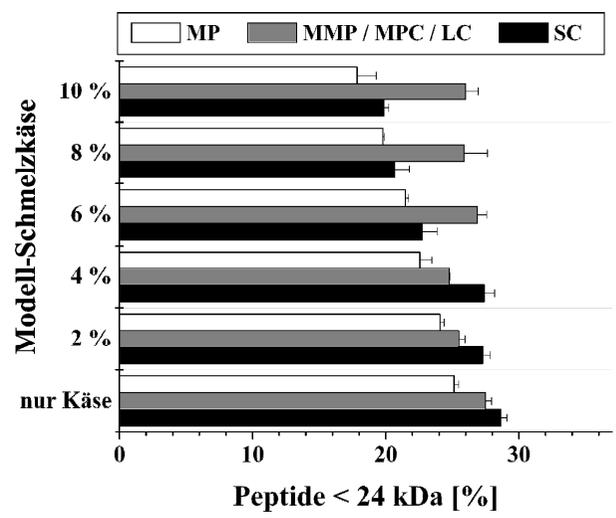
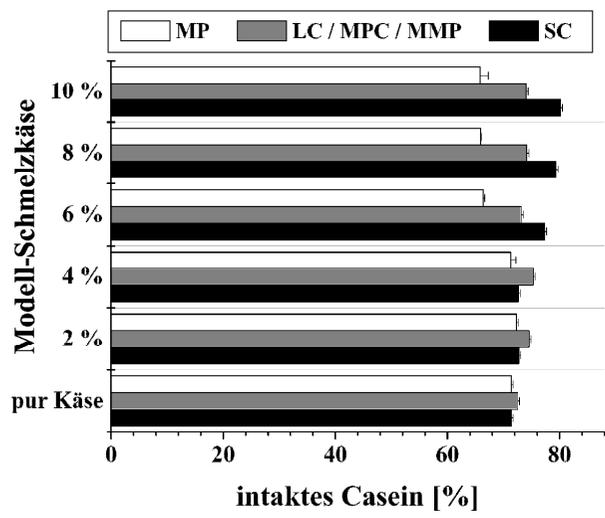
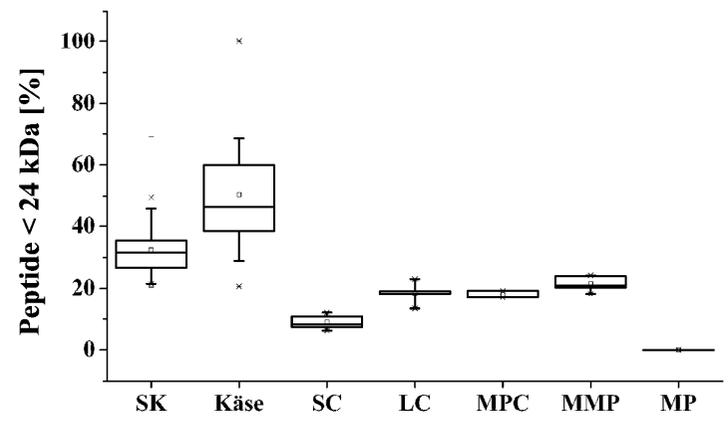
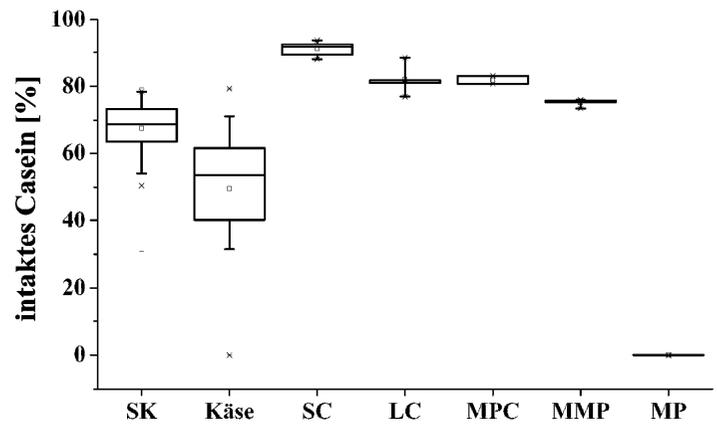
und der Einhaltung standardisierter Bedingungen ab. Für Schmelzkäse sind exemplarisch im Teil A der **Abb. 4.7** (Bahnen 2 bis 5) zwei voneinander deutlich abweichende Proben als Doppelbestimmung gezeigt.



**Abb. 4.7** SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung von Caseinen, Molkenproteinen und Peptiden in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (n=2).[\* markiert Molkenproteine,  $\alpha$ -LA –  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -LG –  $\beta$ -Lactoglobulin; A – Schmelzkäse 2/3 – SK-Probe 1,;4/5- SK-Probe 2; B – Käse 2/3 – eine Käseprobe; C – Caseine 2/3 – Labcasein (LC); 4/5 – Säurecasein (SC); D – Magermilchpulver (MMP) 2/3 – MMP1 und 4/5 – MMP2, Molkepulver (MP) 6/7]

Probe 1 (Bahn 2/3) weist einen intensiven Abbau von intaktem Protein auf, wobei besonders  $\alpha_{S1}$ - und  $\alpha_{S2}$ -Caseine (Molmasse 33 bzw. 34 kDa) betroffen sind. Ebenso ist die fortgeschrittene Proteolyse anhand des vermehrten Auftretens von Peptiden beobachtbar, welche Banden im Bereich von 10 bis 24 kDa und teilweise auch darunter aufweisen. Das Proteinbandenmuster dieses Schmelzkäses ähnelt dabei sehr dem Bandenmuster einer gereiften Käseprobe (Abb. 4.7, Teil B, Bahn 2/3). Dies lässt vermuten, dass zur Herstellung dieses Schmelzkäseerzeugnisses v.a. gereifte Käserohware eingesetzt wurde. Weiterhin kann anhand der bei 13,5 und 20 kDa nachweisbaren Banden der Molkenproteine  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG auf den Zusatz von MMP, MPC oder MP zu diesem Schmelzkäse geschlossen werden. Im Gegensatz dazu ist die zweite Schmelzkäseprobe (Abb. 4.7, Teil A, Bahn 4 / 5) durch eine schwächere Proteolyse gekennzeichnet. Neben deutlich stärker ausgeprägten Banden der intakten Caseine (29 - 34 kDa) und schwächer ausgeprägten Peptidbanden, weist diese Probe ebenso geringere Mengen an den beiden Molkenproteinen  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG auf. Vergleicht man das Bandenmuster dieses Schmelzkäses mit weiteren proteinhaltigen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Abb. 4.7, Teil C und D), so kann in Folge der ausgeprägten Banden der Caseine und des para- $\kappa$ -Caseins (14 kDa) auf kaum oder nur gering gereifte Käserohware oder Labcasein als Hauptbestandteil der Schmelzkäseerzeugung geschlossen werden. Neben diesen beiden Rohwaren werden auch geringe MMP- und / oder MP-Anteile enthalten sein. Eine eindeutige Differenzierung zwischen MMP und MP ist unter den gewählten elektrophoretischen Bedingungen jedoch nicht möglich, da das im MMP enthaltene  $\kappa$ -CN nicht vollständig vom  $\beta$ -CN separiert werden kann. Eine Unterscheidung der Rohwaren LC und SC kann, basierend auf dieser Limitierung, ebenso nur anhand des Nachweises von para- $\kappa$ -CN vorgenommen werden. Im Gegensatz dazu kann Käse, abhängig von der Reifung, in Folge eines ausgeprägten Peptidmusters sehr gut von den anderen Rohwaren SC, LC, MMP, MPC und MP unterschieden werden, da diese hauptsächlich nur intaktes Casein bzw. Molkenproteine enthalten.

Mittels SDS-Elektrophorese können sehr anschaulich und schnell eine Vielzahl an Informationen über die Zusammensetzung von Schmelzkäseproben und den zur deren Herstellung eingesetzten Rohwaren gewonnen werden. Exemplarisch werden davon nachfolgend nur die prozentualen Anteile an intaktem Casein sowie der Peptide am Gesamtprotein hinsichtlich deren Eignung als Marker für den Anteil an Käse, Milcheiweiß-, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen in Schmelzkäse bewertet. Die im Rahmen dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in der Abbildung 4.8 dargestellt.



**Abb. 4.8 links oben:** Anteil an intakten Casein am Gesamtprotein von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)

**links unten:** Anteil an intakten Casein am Gesamtprotein von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3) [SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC – Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** Peptid-Gehalte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / Whisker: 5 % / 95 %)

**rechts unten:** Gemittelte Peptid-Gehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n = 3)

In den untersuchten handelsüblichen Schmelzkäsen wurden die Anteile an intaktem Casein zu durchschnittlich 68 % bezogen auf das Gesamtprotein bestimmt. Betrachtet man die Minimum- (31 %) und Maximumwerte (80 %) dieser Datenmenge, so ist ersichtlich, dass anhand dieser Messgröße eine Gruppierung der Schmelzkäse untereinander vorgenommen werden kann.

Als proteineintragende Rohwaren zu Schmelzkäsen wurden im Rahmen der Arbeit neben Käse auch Milcheiweißerzeugnisse (SC, LC), Trockenmilch- (MMP, MPC) sowie Molkeerzeugnisse (MP) identifiziert. Diese können anhand der enthaltenen Menge an intaktem Casein anschaulich in 3 Gruppen eingeteilt werden (Abb. 4. 8, oben links). Zur ersten zählen SC, LC, MPC und MMP, welche zwischen 74 bis 92 % intaktes Casein enthalten und damit z.T. deutlich höhere Caseingehalte als Schmelzkäse aufweisen. Ein Zusatz dieser Rohwaren zu Schmelzkäseerzeugnissen sollte demnach durch hohe Caseinanteile gekennzeichnet sein. Im Gegensatz zu den eben genannten Rohwaren weist MP kein intaktes Casein auf. Wird diese Rohware anstelle von Käse in Schmelzkäsen eingesetzt, so sollten die Anteile an intaktem Casein absinken.

Bei der Analyse der Käserohware wurde ein reifungsabhängiger Abbau von intaktem Casein beobachtet. Mit fortschreitender Reifung sinkt der Gehalt an intaktem Casein dabei zugunsten der Bildung von Peptiden und freien Aminosäuren kontinuierlich ab (Verdini et al. 2004). Bevorzugt abgebaut wird dabei zunächst  $\alpha_{S1}$ -CN, wobei mit fortschreitender Proteolyse auch Teile des  $\beta$ -CNs,  $\alpha_{S2}$ -CNs und para- $\kappa$ -CNs abgebaut werden können (Hui 2006, Gagnaire et al. 2001, Carles et al. 1985). Die analytisch ermittelten Caseinanteile liegen in nicht gereiften Käsen bei etwa 80 %. Dies ist vergleichbar mit Caseingehalten von reinem MMP, MPC, LC und Milch. Mit fortschreitender Reifung der Käse sinken die Gehalte an intaktem Casein dann ab. So sind beispielsweise in mittelaltem Gouda (mind. 4 Monate gereift) nur noch 65 % und in altem Gouda (mind. 12 Monate gereift) sogar nur noch 42 % intaktes Casein nachweisbar. Im Durchschnitt lag in den untersuchten handelsüblichen Käsen ein Anteil von etwa 50 % intaktem Casein vor. Für einen speziellen, enzymatisch und mikrobiell schnell gereiften Käse (EMC Maasdamer, K9) konnte mittels der angewandten, elektrophoretischen Methode gar kein intaktes Casein mehr nachgewiesen werden. Schmelzkäsen, denen zum großen Teil Käse zugesetzt wurde, werden in Folge dessen im Vergleich zu LC-, SC-, MPC- und MMP-haltigen Produkten durch niedrigere Anteile an intaktem Casein gekennzeichnet sein.

Mittels speziell hergestellter Modell-Schmelzkäserezepturen, in denen definiert Käse durch die Proteinpulver SC, LC, MPC, MMP sowie MP ersetzt wurde, sollten die, anhand der Handelsproben, erhaltenen Erkenntnisse überprüft werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4. 8 unten links dargestellt. Ein Zusatz an LC, MPC und MMP führt im Rahmen von bis zu 10 % Zusatz im Modell-Schmelzkäse zu keiner signifikanten

Veränderung des ermittelten Anteils an intaktem Casein von etwa 73 %. Die Empfindlichkeit dieser Methode reicht in diesem Fall nicht aus, um zwischen der eingesetzten wenig gereiften Käserohware (73 % intaktes Casein) und den Proteinpulvern MMP, LC und MPC (75 bis 82 % intaktes Casein) zu differenzieren. Beim Austausch von Käse in Schmelzkäsen durch SC steigt diese Messgröße bei einem 10 %igem Zusatz hingegen um etwa 10 % auf einen Anteil von 80 % intaktem Casein bezogen zum Gesamtprotein an. Durch 10 % MP in Schmelzkäsen ist im Gegensatz dazu eine Verringerung des enthaltenen intakten Caseinanteils um 11 % messbar.

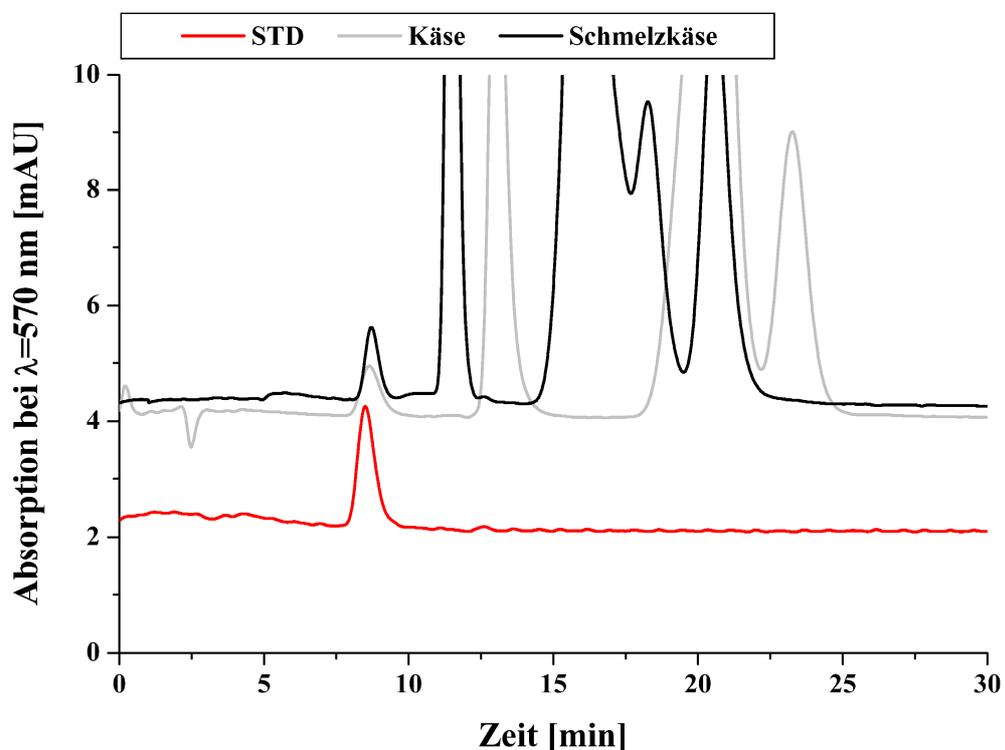
Mittels dieser elektrophoretischen Methode wurde ebenfalls der prozentuale Anteil an Peptiden mit Molekulargewichten zwischen 10 und 24 kDa in handelsüblichen Schmelzkäsen ermittelt (Abb. 4. 8 oben rechts). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen dabei ein nahezu umgekehrtes Bild im Vergleich zum Caseingehalt. In Käsen steigen die Gehalte an Peptiden beispielsweise in Abhängigkeit des Reifegrades von anfänglich etwa 20 % auf durchschnittlich 50 % an. Alle untersuchten Proteinzusätze weisen im Vergleich dazu keine (MP) oder nur geringe Anteile (SC, LC, MPC, MMP – max. 22 %) an Peptiden auf. Die in den handelsüblichen Schmelzkäsen enthaltenen Peptidfraktionen werden somit zum großen Teil durch die eingesetzte Käserohware eingetragen. In Folge der unterschiedlichen Reifung der Käserohware können die in handelsüblichen Schmelzkäseprodukten gefundenen Peptidgehalte zwischen 20 bis 70 % schwanken. Basierend auf diesen, anhand von handelsüblichen Erzeugnissen gewonnenen, Erkenntnissen wurden im Anschluss Modell-Schmelzkäse mit ansteigenden Gehalten an den oben genannten Proteinzusätzen (0 bis 10 %) hergestellt (Abb. 4. 8 unten rechts). Im Falle eines SC- oder MP-Zusatzes sinken die prozentualen Gehalte an Peptiden dabei signifikant ab.

Die angewendete elektrophoretische Messmethode ermöglicht es sehr anschaulich und schnell eine Vielzahl an Informationen über die Zusammensetzung der Schmelzkäseproben und Rohwaren zu deren Herstellung zu gewinnen. Neben den Anteilen an intaktem Casein (CN), Molkenprotein (MPr) und deren Fraktionen ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG) können ebenso ausgewählte, in Folge von proteolytischen Prozessen gebildete, Peptide (u.a.  $\gamma$ -CN, para- $\kappa$ -CN) analysiert werden. Die untersuchten Proteinpulver, welche zur Herstellung von Schmelzkäsen eingesetzt werden (MMP, MPC, LC, SC), sind dabei durch hohe Anteile an intaktem Casein und geringe bis keine nachweisbaren Gehalte an Peptiden gekennzeichnet. Als Ausnahme hierzu muss MP erwähnt werden, da dieses weder Caseine noch daraus, durch proteolytische Prozesse, gebildete Peptide, dafür aber hohe Gehalte an Molkenproteinen ( $\alpha$ -LA 13,5 kDa,  $\beta$ -LG 20 kDa), enthält. Der im Schmelzkäse enthaltene Peptidanteil wird demzufolge maßgeblich durch die Käserohware eingetragen. Da dieser Anteil in Abhängigkeit des Reifegrades besonders stark

schwankt, kann diese Messgröße nur bedingt zur Berechnung der Anteile an Käse- bzw. Nichtkäseprotein in Schmelzkäsen herangezogen werden.

#### 4.1.2.2 Molkenproteine

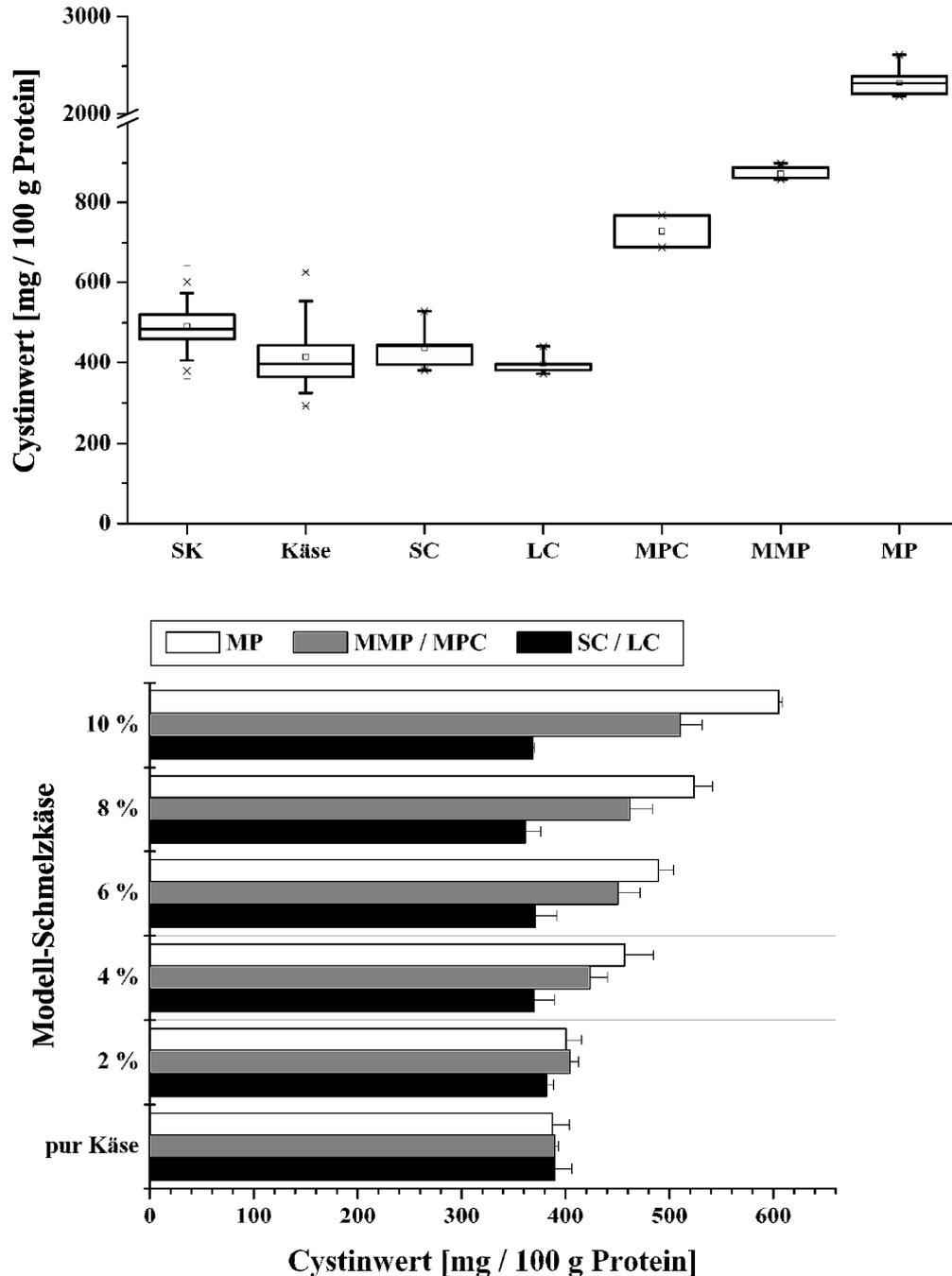
Zur Ermittlung des Molkenproteinanteils werden häufig neben spektroskopischen (De Koning et al. 1971), elektrophoretischen und chromatographischen Methoden auch polarographische Analyseverfahren angewendet (Lechner et al. 1985). Molkenproteine weisen dabei mit etwa 2,4 g / 100 g Protein einen um den Faktor acht höheren Cystin- und Cysteingehalt im Vergleich zu Caseinen auf (Töpel 2004). Ausgenutzt wird dieser Sachverhalt u.a. zur Bestimmung des Cystinwertes im Speisequark (Lechner et al. 1985). Dieser ist dabei ein Maß für die anteilig in Proteinen enthaltene Menge an Cystin und Cystein, welche zur Bestimmung des Molkenproteinanteiles herangezogen werden kann (Spencer et al. 1969). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird diese Messgröße mittels Aminosäureanalyse nach vorheriger Oxidation des in der Probe befindlichen Cystins und Cysteins zur Cysteinsäure und anschließender Säurehydrolyse (Abschnitt 3.5.12) erfasst. Ein repräsentatives Chromatogramm ausgewählter Milchproben ist in Abbildung 4.9 gezeigt.



**Abb. 4.9** Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Cysteinsäurebestimmung in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. [Darstellung übereinandergelagerter Chromatogramme eines Schmelzkäses, einer Käseprobe sowie eines kommerziell erhältlichen Cysteinsäure-Standards]

Die Identifizierung der bei 8 min eluierenden Substanz erfolgte anhand des Vergleiches der Retentionszeit mit einem kommerziell erhältlichen Cysteinsäurestandard. Die zur Probenvorbereitung und zur chromatographischen Analyse notwendigen Chemikalien und Bedingungen sind Abschnitt 3.5.12 zu entnehmen. Anhand der dargestellten Chromatogramme wird ersichtlich, dass sowohl in Schmelzkäse als auch Käse Cysteinsäure nach erfolgter Probenvorbehandlung identifiziert und in variierenden Konzentrationen bestimmt werden konnte. Die im Rahmen dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind Abbildung 4.10 zusammengefasst. In den untersuchten handelsüblichen Schmelzkäsen wurden Cystinwerte von durchschnittlich 490 mg / 100 g Protein ermittelt. Betrachtet man die Minimum- (360 mg / 100 g Protein) und Maximumwerte (645 mg / 100 g Protein) dieses Datensatzes so ist erkennbar, dass anhand dieser Messgröße eine qualitative Unterscheidung der Schmelzkäse vorgenommen werden kann. Die Unterschiede innerhalb dieser Produkte fallen dabei jedoch weitaus geringer aus als dies beispielsweise bei den Messgrößen für Lactose oder Calcium beobachtet werden konnte.

Zur Beurteilung, welche der eingesetzten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung die im Endprodukt gefundenen Cystinwerte beeinflussen, wurden handelsübliche Käse, SC, LC, MP sowie MPC und MMP mittels der im Kapitel 3.5.12 dargelegten Analysenvorschrift untersucht. Die für SC, LC und Käse erhaltenen durchschnittlichen Cystinwerte liegen mit 437, 396 und 415 mg / 100 g Protein deutlich unter dem für handelsübliche Schmelzkäse bestimmten Mittelwert. Käse weisen schwankende Cystinwerten auf (290 bis 625 mg / 100 g Protein), wobei dies in Abhängigkeit der Käsesorte auftritt. Schnitt- und Hartkäse, welche während der Herstellung durch eine intensivere Bruchbearbeitung gekennzeichnet sind, zeigen beispielsweise mit durchschnittlich 390 mg / 100 g Protein sehr geringe Cystinwerte. Im Gegensatz dazu konnte für Weichkäse eine durchschnittliche Konzentration an Cystin von 540 mg / 100 g Protein ermittelt werden. In Folge der weitaus geringeren Bruchbearbeitung und des Pressens von Weichkäsen, verbleibt in diesen mehr Molke und damit einhergehend mehr Molkenprotein, welches die erhöhten Cystinwerte hervorruft. Zur Herstellung von Schmelzkäsen wird jedoch typischerweise v.a. Schnitt- und Hartkäse eingesetzt. Ein Ersatz von Käse durch SC oder LC sollte daher für die im Schmelzkäseerzeugnis verbleibende Menge an Molkenprotein keinen Einfluss haben. Im Gegensatz dazu führen anteilig im Schmelzkäse enthaltene Beimischungen von MP, MMP und MPC zur Erhöhung des Cystinwertes. Der durchschnittlich in diesen Proben enthaltene Cystinwert liegt mit 730 bzw. 870 mg / 100 g Protein für MPC und MMP sowie mit über 2000 mg / 100 g Protein für MP deutlich über den Gehalten in Käse, SC und LC.



**Abb. 4. 10 oben:** Cystinwerte von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Summenparameter bestimmt als Cysteinsäure mittels Aminosäureanalyse nach Oxidation und saurer Hydrolyse, Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %]

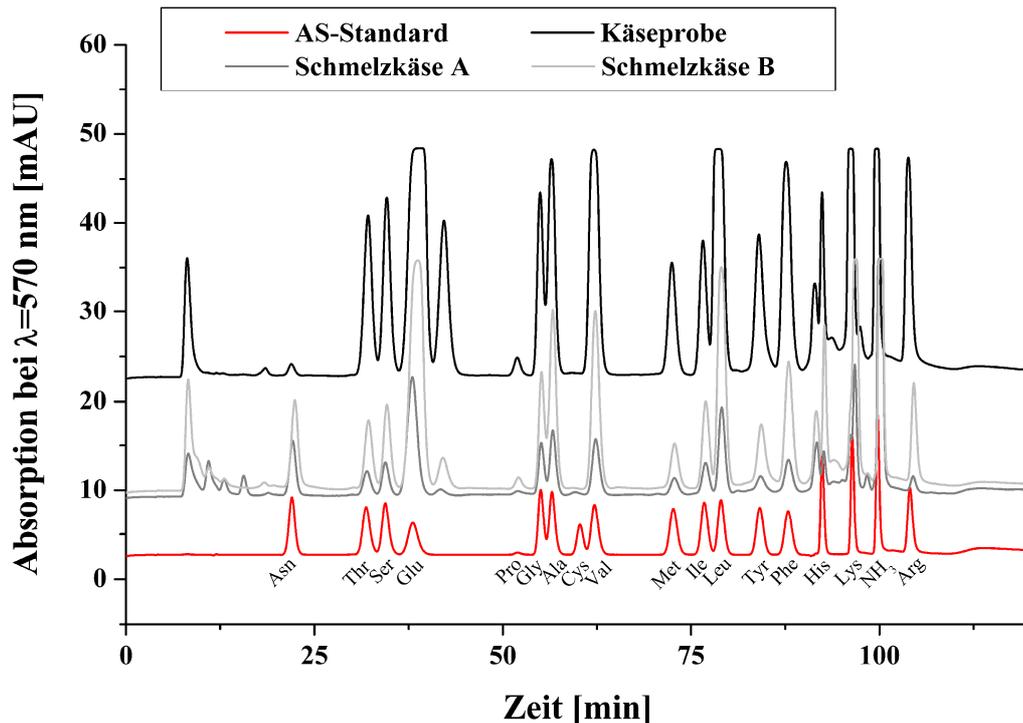
**unten:** Gemittelte Cystinwerte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3) [SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC - Säurecasein, LC – Labcasein; gestrichelte rote Linie - Gehalt Referenz-SK ohne Zusatz]

Mittels speziell hergestellter Modell-Schmelzkäserzepturen, in denen definiert Käse durch die Proteinpulver SC, LC, MPC, MMP sowie MP ersetzt wurde, sollten die anhand der Handelsproben erhaltenen Erkenntnisse überprüft werden. Dargestellt ist dies in Abb. 4. 10 unten. Hohe Anteile an Milcheiweißerzeugnissen (SC, LC) ziehen

dabei eine Senkung des Cystinwertes in diesen Proben nach sich. MMP / MPC und MP hingegen führen bereits ab Konzentrationen von 3 bis 4 % zu deutlich erhöhten Cystinwerten. Steigert man diese Beimischung auf bis zu 10 % so können beispielsweise mit einem MP-Zusatz Cystinwerte von etwa 600 mg / 100 g Protein nachgewiesen werden, was einer Steigerung des Cystinwertes um etwa 60 % entspricht. Damit erlangt man nur knapp die höchsten in Handelsproben gefundenen Cystinwerte. Würde man versuchen diese mit einem Zusatz an MMP und MPC zu erreichen, so müsste man etwa 13 % dieser Rohwaren zusetzen. Vergleichbar zu allen bislang diskutierten Messgrößen ist allein anhand des Cystinwertes ebenso keine eindeutige Abgrenzung der Rohwaren Käse, SC, LC, MPC, MMP sowie MP in Schmelzkäsen möglich.

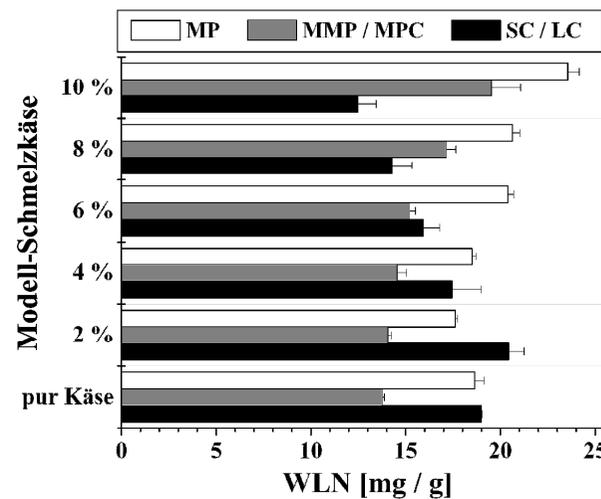
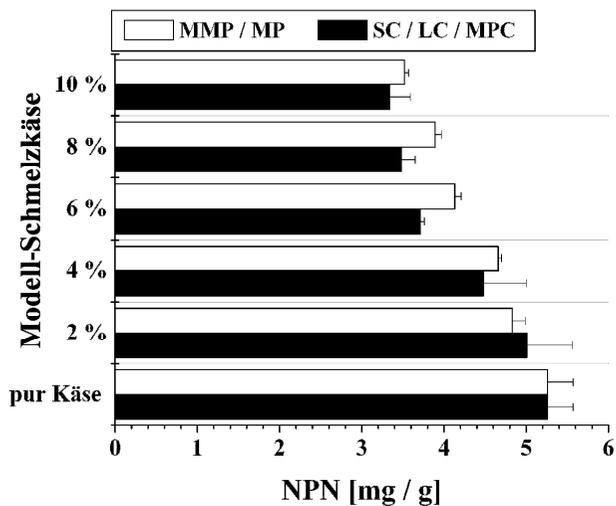
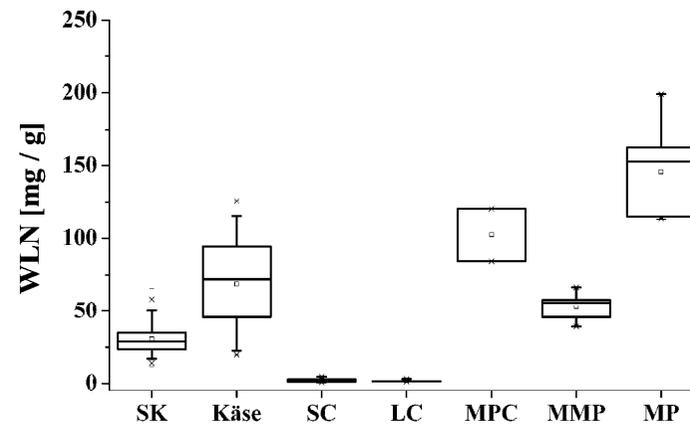
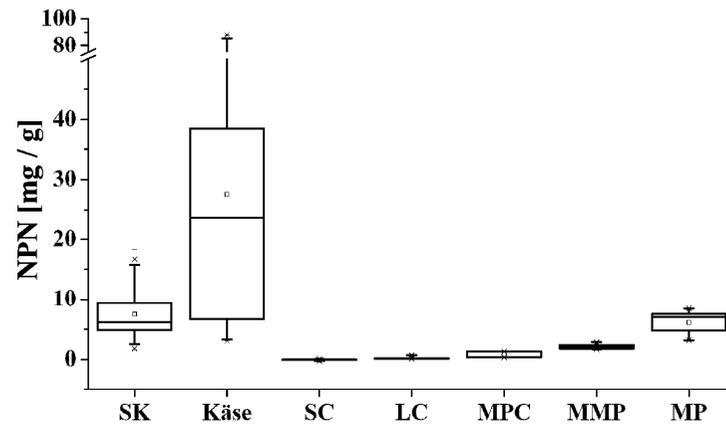
#### 4.1.2.3 *Proteolyseparameter*

Als klassische Messgrößen zur Charakterisierung der Proteolyse in Milch und Milchprodukten werden in der vorliegenden Arbeit der Nicht-Protein-Stickstoff (NPN), der wasserlösliche Stickstoff (WLN) sowie die freien Aminosäuren analysiert. Besondere Bedeutung haben diese Parameter zur Verfolgung der Käsereifung erlangt (Rohm et al. 1996, Tschager 1994a). Die Detektion der Parameter erfolgt zumeist photometrisch nach Umsetzung der freien Aminogruppen mit Derivatisierungsreagenzien (Panasiuk et al. 1998, Jarrett et al. 1982). Zur Bestimmung des NPN und WLN wird in der vorliegenden Arbeit, basierend auf Arbeiten von Tschager 1994b und Bong 1997, eine Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) in Anwesenheit von Thiolen zu stabilen Indolverbindungen angewendet (siehe Kapitel 3.5.8). Die Gehalte an freien Aminosäuren werden hingegen mittels Aminosäureanalyse, einer Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung, quantifiziert (siehe Abschnitt 3.5.9) (Henle et al. 1991, Krause et al. 2003). Repräsentative Chromatogramme ausgewählter Käse- und Schmelzkäseproben sind in **Abb. 4. 11** gezeigt. Die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den entsprechenden Aminosäuren erfolgte anhand des Vergleiches der Retentionszeiten mit denen eines kommerziell erhältlichen Aminosäurestandards. Die zur Probenvorbereitung und zur chromatographischen Analyse notwendigen Chemikalien und Bedingungen sind Abschnitt 3.5.9 zu entnehmen. Anhand der dargestellten Chromatogramme können deutliche Unterschiede zwischen Käsen und Schmelzkäsen in Bezug auf die Peakintensitäten festgestellt werden. Käse enthalten dabei deutlich mehr freie Aminosäuren als Schmelzkäse, wobei die Menge und Art der gebildeten Aminosäuren von der Käsesorte und den eingesetzten Starter- und Nicht-Starterkulturen sowie der Reifungsführung abhängt (McSweeney 2004). Zur Auswertung wurden sowohl die Einzelgehalte der 17, in **Abb. 4. 11** dargestellten, Aminosäuren sowie der daraus gebildete Summenparameter in mg / 100 g Protein herangezogen.



**Abb. 4. 11** Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Darstellung übereinandergelagerter Chromatogramme zweier Schmelzkäse, einer Käseprobe sowie eines kommerziell erhältlichen Aminosäurestandards].

Die im Rahmen dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind den Abbildungen 4.12 und 4.13 zuzunehmen. Die Mittelwerte der NPN- und WLN-Gehalte, welche ein Maß für die vorhandenen kleinen bis mittleren sowie großen Peptide darstellen, wurden in den 60 untersuchten, handelsüblichen Schmelzkäsen dabei zu 7,4 bzw. 31 mg / g ermittelt. Dabei können sowohl für den analysierten NPN- (3 bis 18 mg / g) als auch WLN-Gehalt (12 bis 66 mg / g) um den Faktor 9 bzw. 6 schwankende Werte innerhalb der untersuchten, handelsüblichen Schmelzkäse beobachtet werden. Im Vergleich dazu liegen die, in diesen Schmelzkäseprodukten analysierten, Konzentrationen an freien Aminosäuren im Mittel bei 228 mg / 100 g Protein. Betrachtet man die Minimum- (57 mg / 100 g Protein) und Maximumwerte (581 mg / 100 g Protein) dieses Datensatzes, so wird ersichtlich, dass auch anhand dieser Messgröße Schwankungen um den Faktor 10 innerhalb der Schmelzkäseproben nachweisbar sind (Abb. 4. 13). Basierend auf den natürlich auftretenden großen Abweichungen der Proteolyseparameter innerhalb dieser Produkte sollte eine Unterscheidung dieser untereinander anhand der drei gewählten Messgrößen prinzipiell möglich sein.



**Abb. 4.12 links oben:** NPN von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %)

**links unten:** Gemittelte NPN-Gehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)

[SK – Schmelzkäse, NPN – Nicht-Protein-Stickstoff, WLN - wasserlöslicher Stickstoff, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC – Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** WLN von Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker 5 % / 95 %)

**rechts unten:** Gemittelte WLN-Gehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)

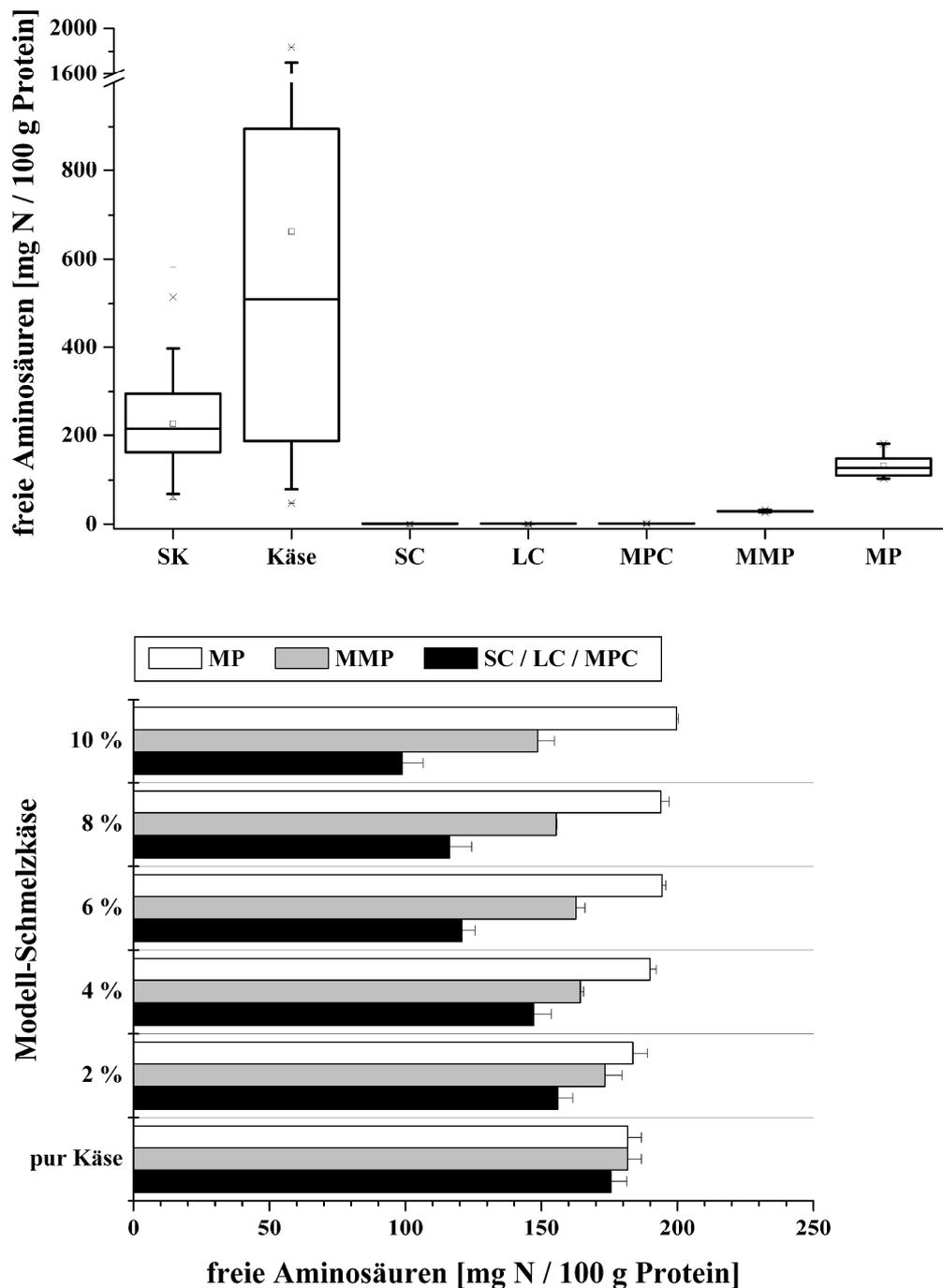
Im Folgenden wurden die Rohwaren Käse sowie ausgewählte Proteinzusätze (SC, LC, MMP, MP MPC) auf deren Konzentrationen an NPN, WLN sowie der freien Aminosäuren hin analysiert. Ziel dieser Tests ist es herauszufinden, welche Anteile die einzelnen Rohwaren zum NPN, WLN und dem Gehalt an freien Aminosäuren beitragen. In den untersuchten Käseproben wurden NPN-Gehalte von 4 bis 88 mg / g ermittelt (Abb. 4. 12 oben links). Die beobachteten großen Gehaltsunterschiede in Käsen werden dabei v.a. durch die Reifung und z.T. auch durch die Herstellung von Käsen verursacht (Rohm et al. 1996). In wenig gereiften Schnittkäsen, welche typischerweise als Strukturbildner zur Herstellung von Schmelzkäsen eingesetzt werden, konnten beispielsweise mit 4 bis 17 mg / g geringe bis mittlere NPN-Gehalte nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in Hartkäsen, welche als geschmacksgebende Rohware zu Schmelzkäseerzeugnissen zugegeben werden, NPN-Gehalte von 24 bis 88 mg / g gefunden. Analysiert man im Vergleich dazu die Konzentrationen an NPN in den Proteinzusätzen (SC, LC, MPC, MMP, MP), so ist erkennbar, dass diese durch deutlich geringere Mengen an NPN (0 bis 8 mg / g) gekennzeichnet sind. Die in handelsüblichen Schmelzkäsen gefundenen NPN-Gehalte von 3 bis maximal 18 mg / g sollten demzufolge hauptsächlich durch die Käserohware selbst, aber nicht oder nur zu geringen Anteilen durch die untersuchten Proteinzusätze eingetragen werden. Anhand der Untersuchung von Modell-Schmelzkäsen, in denen definierte Mengen an Käserohware durch Proteinzusätze ersetzt wurden, soll diese Hypothese anschließend bestätigt werden. Die dazu erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4. 12 unten links dargestellt. Dabei kann durch den Austausch von Käse durch Proteinzusatz in allen Schmelzkäsen eine Verringerung der NPN-Gehalte nachgewiesen werden. Unabhängig vom eingesetzten Proteinpulver wird durch eine 10 %ige Beimischung der NPN um bis zu 35 % gesenkt. Die im Schmelzkäse enthaltene Menge an NPN entstammt somit größtenteils der Käsemasse und kann als Marker dafür in Schmelzkäseprodukten herangezogen werden. Ein Zusatz von Proteinpulvern in Schmelzkäseerzeugnissen kann dabei bereits in Konzentrationen von 2 bis 3 % nachgewiesen werden.

Im Vergleich dazu kann anhand des WLN-Gehaltes in Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung ein weniger eindeutiges Ergebnis abgeleitet werden. Neben der Käserohware, welche einen WLN-Gehalt von 20 bis 125 mg / g enthalten kann, sind auch in MMP, MPC und MP mittlere bis sehr hohe Anteile an großen Peptiden zu finden. Die in diesen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung enthaltenen Mengen an WLN reichen dabei, abhängig von der im Produkt enthaltenen Menge an Molkenproteinen, von 40 bis 200 mg / g. Je mehr Molkenproteine in diesen Produkten enthalten sind, desto höhere WLN-Gehalte wurden ermittelt. Diese Messgröße stellt somit keinen alleinigen Marker für Käse in Schmelzkäseerzeugnissen dar. SC und LC, welche hingegen nur Casein enthalten, weisen vergleichbar zum NPN nur geringe WLN-Gehalte auf. Die in handelsüblichen Schmelzkäsen gefundenen Konzentrationen

an WLN von 12 bis maximal 66 mg / g werden demzufolge nicht allein durch die Käserohware sondern auch bzw. v.a. durch molkenproteinhaltige Zusätze (MMP, MPC, MP) eingetragen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Anschluss Modell-Schmelzkäse mit ansteigenden Gehalten an den oben genannten Proteinzusätzen (0 bis 10 %) hergestellt (Abb. 4. 12 unten rechts). Im Falle eines SC- oder LC-Zusatzes sinken die prozentualen Gehalte an großen Peptiden, analytisch ermittelt als WLN, dabei signifikant von ursprünglich 19 mg / g (nur Käse, ohne Proteinzusatz) auf 12 mg / g (Zusatz von 10 % LC / SC) ab. Dies entspricht einer Verringerung des WLN um knapp 35 %. Im Gegensatz dazu wurden sowohl für MMP-, MPC- als auch MP-haltige Modell-Schmelzkäse ansteigende WLN-Gehalte im Vergleich zur jeweiligen Referenz-Schmelzkäseprobe, welche nur Käserohware enthält, beobachtet. Der WLN-Gehalt steigt dabei um 30 % bis 40 % bei einem Zusatz von 10 % molkenproteinhaltigem Proteinpulver an. Im Gegensatz zum NPN eignet sich der WLN nicht als Marker für den Anteil an Käserohware in Schmelzkäsen. Vielmehr könnte ein hoher WLN bei gleichzeitig niedrigem NPN in Schmelzkäseproben einen Hinweis auf den Zusatz von molkenproteinhaltigen Proteinpulvern (MP, MPC, MMP) liefern.

Als weitere Parameter zur Abschätzung der stattgefundenen Proteolyse wurden in den untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung die freien Aminosäuren bestimmt. In nachfolgend abgebildeter Grafik (Abb. 4. 13) sind die dazu erhaltenen Ergebnisse als Summenparameter dargestellt. Die anhand dieser Messgröße ermittelten Daten entsprechen in großen Teilen den bereits durch Analyse der NPN-Gehalte gewonnenen Erkenntnissen. Käserohware kann auch hier als Haupteintragsquelle von Aminosäuren zu Schmelzkäseerzeugnissen identifiziert werden. Die Gehalte an freien Aminosäuren der untersuchten Käseproben wurden dabei zu 49 bis 1836 mg / 100 g Protein ermittelt. Hervorgerufen werden die großen natürlichen Schwankungen in Käsen in Folge der Reifung (Rohm et al. 1996). Im Vergleich dazu konnten in den Proteinpulvern SC, LC, MPC und MMP nur Gehalte an freien Aminosäuren von maximal 34 mg / 100 g Protein nachgewiesen werden. Als Ausnahme muss an dieser Stelle MP erwähnt werden, da dieses mit 103 bis 181 mg / 100 g Protein vergleichbar hohe Gehalte an freien Aminosäuren wie beispielsweise wenig gereifter Schnittkäse (137 mg / 100 g Protein) aufweist. Im Gegensatz dazu können in länger oder schneller gereiften Hart- bzw. Weichkäsen deutlich höhere Konzentrationen an freien Aminosäuren nachgewiesen werden. In diesen Käsesorten können z. T. Gehalte von bis zu 1836 mg / 100 g Protein vorliegen. Da in Schmelzkäsen zur Ausbildung der Struktur mengenmäßig sehr viel gering gereifte Käserohware enthalten ist, sollte eine eindeutige Unterscheidung von Käse und Trockenmolkeerzeugnissen (MP) in Schmelzkäsematrices anhand des Summenparameters der freien Aminosäuren somit nur schwierig möglich sein. Im Vergleich dazu wird ein Einsatz von

Milcheiweißerzeugnissen (SC, LC) und Trockenmilcherzeugnissen (MMP, MPC) in Schmelzkäsen zum Absinken der Konzentrationen an freien Aminosäuren führen.



**Abb. 4.13 oben:** Summenparameter der freien Aminosäuren in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung [Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)

**unten:** Gemittelte Summenparameter der freien Aminosäuren von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n = 3)

[SK – Schmelzkäse, MMP - Magermilchpulver, MP - Molkenpulver, MPC - Milchproteinkonzentrat, SC - Säurecasein, LC - Labcasein]

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden nachfolgend Modell-Schmelzkäse mit ansteigenden Gehalten an den oben genannten Proteinzusätzen (0 bis 10 %) untersucht

(Abb. 4. 12 unten). Der Austausch von Käse im Schmelzkäseprodukt durch SC, LC, MPC und MMP ist dabei durch sinkende Konzentrationen an freien Aminosäuren gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu steigt in den analysierten Modell-Schmelzkäsen der Anteil an freien Aminosäuren durch den Austausch von Käse durch MP geringfügig an. Letztere Beobachtung hängt jedoch wesentlich vom Reifegrad der eingesetzten Käserohware ab.

Eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen kann anhand der analysierten Proteolysemarker NPN, WLN und freie Aminosäuren durchgeführt werden. Ein erhöhter NPN-Gehalt sowie sehr hohe Anteile an freien Aminosäuren deuten dabei auf den vermehrten Einsatz von Käserohware hin. Wird diese schrittweise ersetzt, sinken beide Messgrößen kontinuierlich ab. Als alleiniger Marker zur Ermittlung des im Schmelzkäse eingesetzten Käseanteils können beide jedoch nur begrenzt eingesetzt werden, da diese reifungs- und käsesortenabhängig erheblich schwanken können (McSweeney 2004). Damit können, basierend auf diesen Daten allein bislang jedoch keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Die in Schmelzkäsen enthaltenen Konzentrationen an WLN werden hingegen nicht nur durch die Käserohware, sondern auch durch anteilig enthaltenes MMP, MPC sowie MP eingetragen.

## 4.2 Caseinomakropeptid und intaktes $\kappa$ -Casein in Milchprodukten

Im folgenden Abschnitt wird die Verwendung von Caseinomakropeptid (CMP), para- $\kappa$ -Casein sowie  $\kappa$ -Casein als Marker zur Unterscheidung von Käseprotein und Nichtkäseprotein in Schmelzkäsen diskutiert. CMP und para- $\kappa$ -CN entstehen dabei als Spaltprodukte der enzymatischen Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein durch Chymosin (Delfour et al. 1965). Angewendet wird dieser Prozess seit Menschengedenken bei der Herstellung von Käse, infolgedessen Molke vom koagulierten Käsebruch abgetrennt wird. Dabei wird CMP nahezu vollständig mit der Molke vom Käse separiert, wohingegen para- $\kappa$ -Casein in diesem verbleibt. Im Schmelzkäse enthaltenes CMP und intaktes  $\kappa$ -Casein sollten demzufolge nicht durch die Käserohware selbst sondern nur durch zugesetzte Proteinpulver eingetragen werden. Zur Quantifizierung dieser Protein- bzw. Peptidmarker wurden chromatographische und elektrophoretische Methoden etabliert und auf ein Spektrum an Milch- und Molkereiprodukten übertragen. Zur Identifizierung dieser Verbindungen in Milchprodukten war zunächst eine Isolierung von geeignetem Standardmaterial notwendig, welche nachfolgend kurz dargelegt ist.

### 4.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Standardmaterialien

Ausgangspunkt der Isolierung von  $\kappa$ -Casein, CMP und para- $\kappa$ -Casein stellt jeweils Säurecasein dar, welches zunächst aus pasteurisierter Milch (1,5 % Fett) bzw. Rohmilch

isoliert wurde. Als Methode wurde eine isoelektrische Fällung der Caseine bei pH 4,6 angewendet, gefolgt von Entfettungs- und Reinigungsschritten (siehe Abschnitt 3.6.2). Die erhaltenen Ausbeuten an Säurecasein liegen dabei für fettarme, past. Milch bei ca. 33,5 g / L. Aus Rohmilch wurden mit circa 27 g / L geringere Ausbeuten erzielt. Diese sind mit der theoretisch aus Milch isolierbaren Menge an Casein von 24 – 28 g / L (Hui 2006) vergleichbar. Zur Charakterisierung der isolierten Säurecaseine wurden anschließend chemische Kennzahlen ermittelt, welche in Tab. 4. 1 zusammengefasst sind.

**Tab. 4. 1** Vergleich ausgewählter chemischer Parameter der aus pasteurisierter und Rohmilch isolierten Säurecaseine.

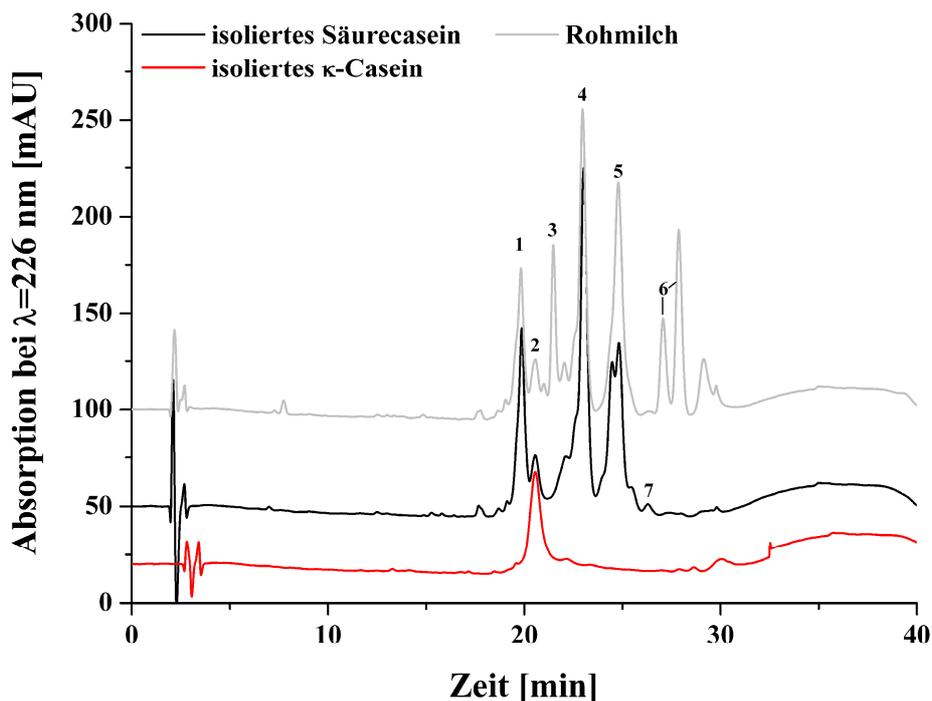
Säurecasein aus	Ausbeute [%]	Fett [%]	Protein [%]	TM [%]	Lactose [%]
Past. Trinkmilch (1,5 % Fett)	33,5	13,8 ± 0,3	76,1 ± 0,4	94,8 ± 0,7	0,3 ± 0,1
Rohmilch	27	0,3 ± 0,1	96,1 ± 0,5	97,9 ± 0,7	n.b.

Zur anschließenden Isolierung von  $\kappa$ -Casein wurde nur noch das aus Rohmilch gewonnene Säurecasein verwendet. Dieses ist gekennzeichnet durch höhere Proteingehalte sowie niedrigere Fett-, Lactose- und Wassergehalte. Selbst aufwendige weitere Entfettungsschritte führten zu keiner Reduzierung des hohen Fettanteils (14 %) der aus past. Milch gewonnenen Säurecaseine. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine stärkere Bindung von Fett ans Protein, welche durch die Prozesse der Homogenisierung und Pasteurisierung hervorgerufen wird (Krömker 2007, Präve et al. 1984).

Mittels chromatographischer und elektrophoretischer Verfahren wurde die Reinheit des isolierten Säurecaseins überprüft. Exemplarisch ist dies in den Abbildungen Abb. 4. 14 und Abb. 4.15 gezeigt.

Anhand beider Analyseverfahren konnte die Reinheit des isolierten Säurecaseins zu 98 % bestimmt werden. Weiterhin konnte mittels der gewählten elektrophoretischen Methode eine vollständige Trennung der Caseinfraktion in  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde aus dem isolierten und gereinigten Säurecasein, basierend auf der Methode von Mckenzie et al. (1961) durch schrittweise Fällung mit unterschiedlichen Salzlösungen und Ethanol, eine stufenweise Abtrennung der störenden Caseinkomponenten –  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$  und  $\beta$ -CN – erreicht. Die Kontrolle der Reinheit des erhaltenen  $\kappa$ -Casein-Isolates wurde ebenso mittels chromatographischer sowie elektrophoretischer Verfahren durchgeführt (Abb. 4. 14, Abb. 4.15). Mittels RP-HPLC Analyse wurde diese zu 96 % bestimmt. Als noch enthaltene Verunreinigungen wurden geringe Mengen an  $\alpha_{S1-}$  und  $\alpha_{S2-}$ -Casein nachgewiesen.

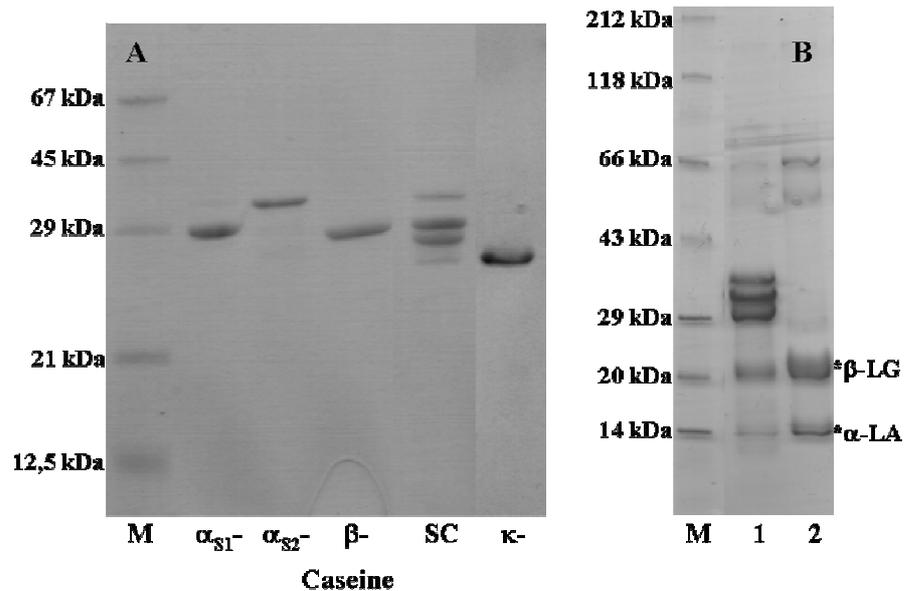


**Abb. 4.14** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zur Charakterisierung von isoliertem Säurecasein und daraus gewonnenem  $\kappa$ -Casein mittels einer PLRP-S Phase [Darstellung der Chromatogramme eines äurecaseinisolates,  $\kappa$ -Caseinisolates sowie der Ausgangsmatrix Rohmilch. 1 –  $\alpha_{S2}$ -Casein, 2 –  $\kappa$ -Casein, 3 –  $\alpha$ -Lactalbumin, 4 –  $\alpha_{S1}$ -Casein, 5 –  $\beta$ -Casein, 6 –  $\beta$ -Lactoglobulin, 7 –  $\gamma$ -Caseine].

Anhand beider Analyseverfahren konnte die Reinheit des isolierten Säurecaseins zu 98 % bestimmt werden. Weiterhin konnte mittels der gewählten elektrophoretischen Methode eine vollständige Trennung der Caseinfraktion in  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde aus dem isolierten und gereinigten Säurecasein, basierend auf der Methode von McKenzie et al. (1961) durch schrittweise Fällung mit unterschiedlichen Salzlösungen und Ethanol, eine stufenweise Abtrennung der störenden Caseinkomponenten –  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\beta$ -CN – erreicht. Die Kontrolle der Reinheit des erhaltenen  $\kappa$ -Casein-Isolates wurde ebenso mittels chromatographischer sowie elektrophoretischer Verfahren durchgeführt (Abb. 4.14, Abb. 4.15). Mittels RP-HPLC Analyse wurde diese zu 96 % bestimmt. Als noch enthaltene Verunreinigungen wurden geringe Mengen an  $\alpha_{S1}$ - und  $\alpha_{S2}$ -Casein nachgewiesen.

Auch mittels SDS-PAGE konnte die hohe Reinheit des isolierten  $\kappa$ -CNs (99 %) bestätigt werden (Abb. 4.15). Im Vergleich zu Milch und einem Molkenpulver, welche in Abb. 4.15 B gezeigt sind, weisen sowohl das isolierte Säurecasein als auch  $\kappa$ -Casein keine Verunreinigungen an Molkenproteinen mehr auf. Dies ist belegbar durch fehlende Banden bei etwa 14 kDa ( $\alpha$ -Lactalbumin) und 20 kDa ( $\beta$ -Lactoglobulin).

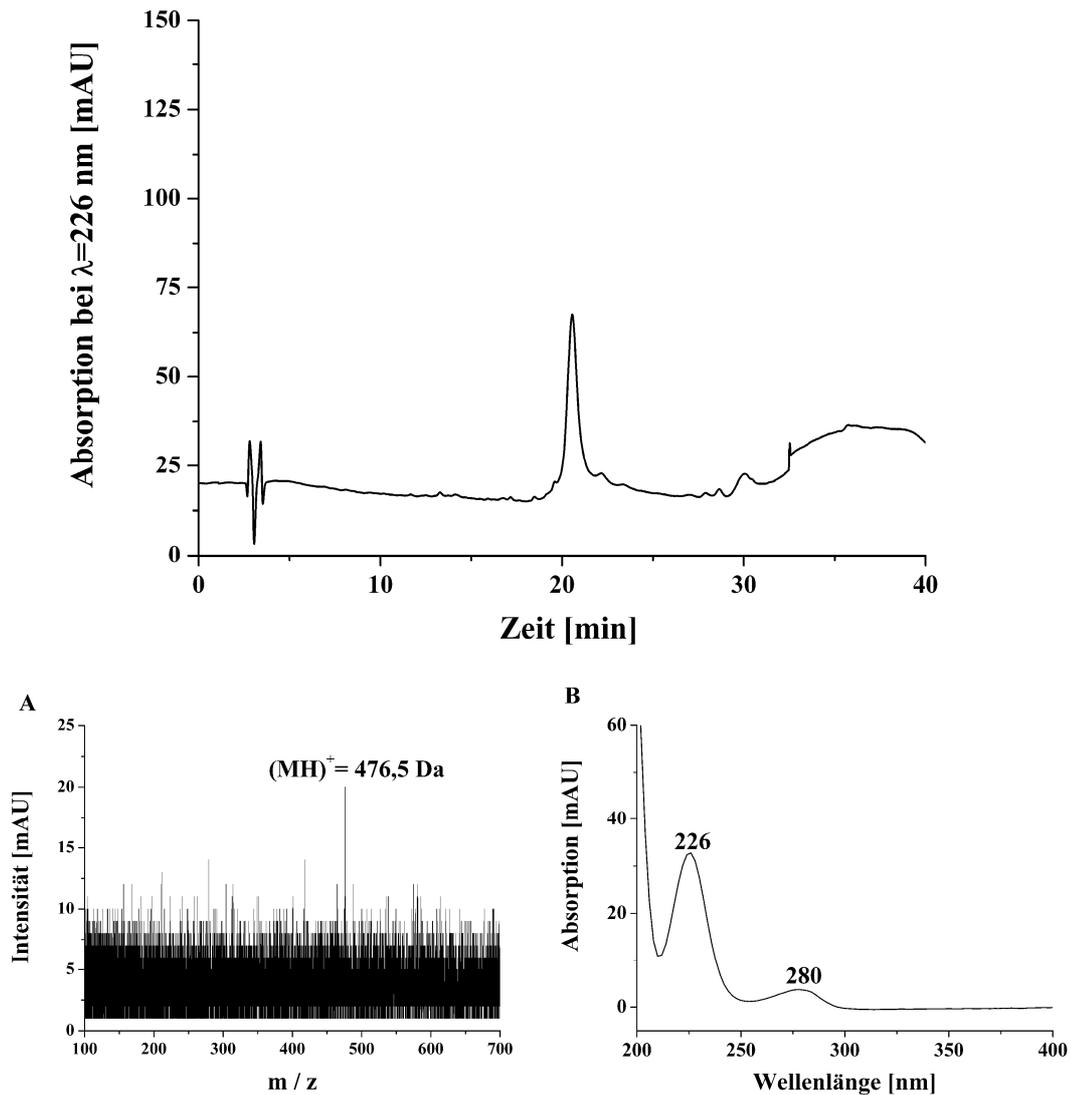


**Abb. 4.15** A) SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Reinheit von isoliertem Säurecasein (SC) und  $\kappa$ -Casein B) SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion von Rohmilch (1) und Molkenpulver (2). \* markiert Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) und  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -LG), M – Molmassenmarker (siehe dazu **Tab. 8.1**).

Die Identifizierung des gewonnenen  $\kappa$ -Caseins wurde abschließend durch die Überprüfung der Molmasse mittels LC-MS geführt (**Abb. 4.16**). Berechnet wurde die theoretische Molmasse eines  $\kappa$ -Caseinmoleküls anhand des mittels LC-MS bestimmten Verhältnisses aus Masse zu Ladung ( $m/z$ ). Multipliziert man dieses mit der ermittelten durchschnittlichen Ladung eines  $\kappa$ -Caseinmoleküles ergibt sich dessen theoretische Molmasse.

Die Molmasse des isolierten  $\kappa$ -Caseins wurde zu  $20489,4 \pm 6,6$  Da ermittelt. Im Vergleich zu Literaturwerten von etwa 19 kDa (Swaisgood 1982) liegt diese nur knapp höher. Die auftretenden geringen Abweichungen werden zum größten Teil durch die verschiedenen genetischen Varianten und Glycosylierungsgrade, in welchen  $\kappa$ -Casein vorliegen kann, hervorgerufen. Weiterhin können geringe Verunreinigungen an  $\alpha_{S1}$ - bzw.  $\alpha_{S2}$ -Caseinen, welche mittels RP-HPLC in Anteilen kleiner 4 % nachgewiesen werden konnten, zur Erhöhung der Molmasse führen.

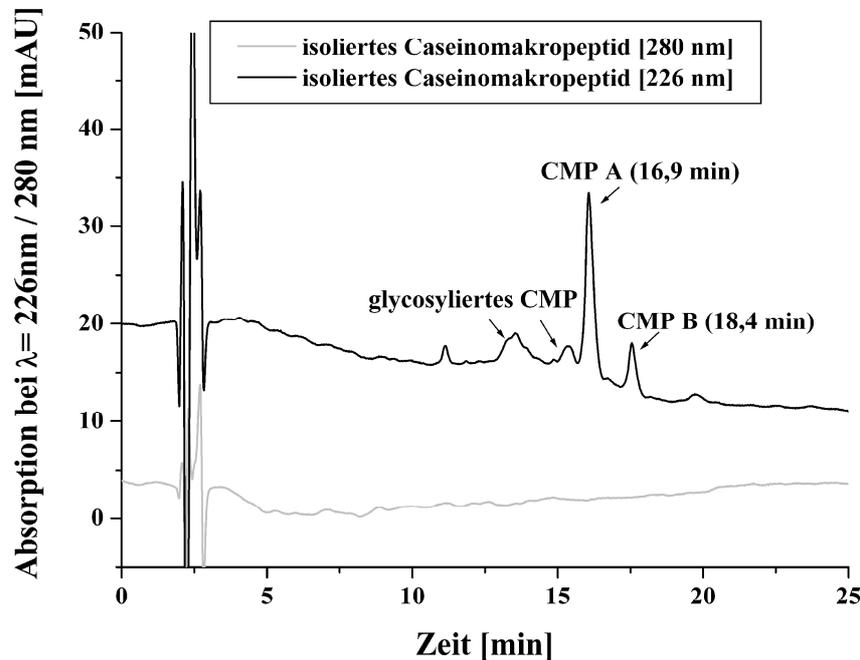
Die anschließende Gewinnung von CMP und para- $\kappa$ -Casein kann mittels einer enzymatischen Spaltung von intaktem  $\kappa$ -Casein erfolgen. Durchgeführt wurde dies bislang beispielsweise durch eine Chymosinbehandlung von Säurecasein, Na-Caseinat oder Magermilchpulver (Coolbear et al. 1996, Morr et al. 1988). Die Gewinnung größerer Mengen an CMP ist ebenso direkt aus Süßmolke möglich (Shammet et al. 1992, Saito et al. 1991). Nach Prüfung der genannten Verfahren wurde im Rahmen der Arbeit zur Isolierung beider Spaltprodukte bereits gereinigtes  $\kappa$ -Casein mittels Labferment behandelt.



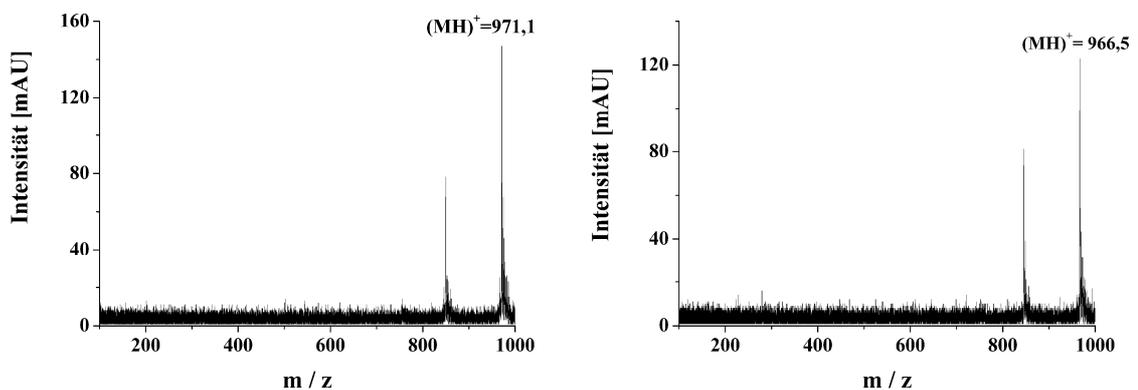
**Abb. 4.16** LC-MS Chromatogramm mit UV-Detektion bei 226 nm zur Charakterisierung des isolierten  $\kappa$ -CN-Standards. Darstellung des zugehörigen Massenspektrums (A) sowie UV-Spektrums (B) [Berechnung der Molmasse des  $\kappa$ -CN-Standards aus dem Verhältnis von  $m/z$  (476,5 Da) und einer mittels der Gerätesoftware bestimmten durchschnittlichen Ladung eines  $\kappa$ -CN-Moleküls von 43].

Vorteil dieser Methode ist die einfache nachfolgende Abtrennung von CMP (Überstand) und para- $\kappa$ -Casein (Präzipitat), basierend auf den unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften. In Abbildung 4.17 ist exemplarisch ein RP-HPLC Chromatogramm der isolierten CMP-Fraktion gezeigt. Als charakteristische Peaks können bei 16,9 min und 18,4 min die zwei nicht-glycosylierten genetischen Hauptvarianten des CMP A sowie CMP B detektiert werden. Deren eindeutige Identifizierung wurde mittels LC-MS geführt. Die erhaltenen Massenspektren des jeweiligen Peaks sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Für CMP A konnte eine durchschnittliche Molmasse von  $6790 \pm 4,5 \text{ Da}$  sowie für CMP B von  $6755,1 \pm 6,8 \text{ Da}$  ermittelt werden. Diese stimmen mit Literaturangaben von 6787 Da für CMP A und 6755 Da für CMP B sehr gut überein (Swaisgood 1975). Die Peaks im Bereich des RP-HPLC Chromatogrammes von etwa 14 bis 16,5 min können nach Literaturvergleich

(Thoma et al. 2006) den glycosylierten CMP zugeordnet werden. Die eindeutige Identifizierung dieser Fraktion konnte mittels LC-MS-Analysen in Folge zu geringer Intensitäten jedoch nicht geführt werden.



**Abb. 4.17** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm / 280 nm zur Charakterisierung von isoliertem CMP mittels einer PLRP-S Phase. CMP – Caseinomakropeptid, CMP A, CMP B – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids, Peaks von 14 – 16,5 min – glycosylierte CMP]



**Abb. 4.18** Darstellung der Massenspektren von isoliertem CMP: Links) genetische Variante CMP-A sowie rechts) genetische Variante des CMP-B ermittelt mittels LC-MS [Berechnung der theoretischen Molmasse basierend auf dem ermittelten Verhältnis aus  $m/z$  sowie der durchschnittlichen Ladung des CMP A (7) bzw. CMP B (7), PLRP-S Phase, 3.5.15.2].

Die Reinheit des isolierten CMP wurde per RP-HPLC zu etwa 96 % ermittelt. Als Verunreinigungen sind noch geringe Mengen an  $\kappa$ -Casein (Peak bei etwa 20 min) enthalten. Diese können jedoch durch eine weitere Optimierung der unvollständig abgelaufenen Hydrolyse minimiert werden. Als weitere Methode zur Charakterisierung der CMP-Fraktion wurde ein Aliquot nach saurer Hydrolyse mittels Aminosäureanalyse

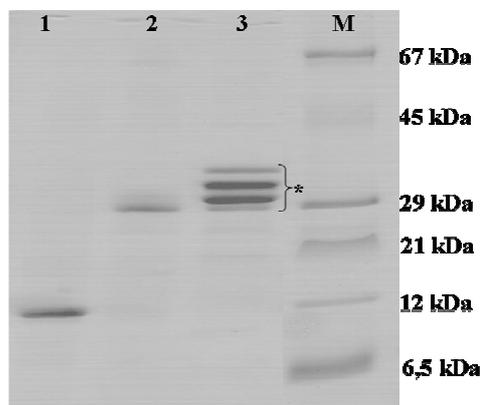
untersucht. Die resultierende AS-Zusammensetzung (**Tab. 4.2**) wurde anschließend mit Literaturwerten verglichen (Dekoning et al. 1966, Eigel et al. 1984, Hill et al. 1970). Die ermittelte AS-Zusammensetzung der isolierten CMP-Fraktion weicht bis auf wenige Ausnahmen (Thr, Ser, Gln / Glu) nur gering bis gar nicht von der, in der Literatur, für CMP A bzw. CMP B angegebenen ab. Die Gehalte an Glu / Gln wurden dabei leicht überschätzt, wohingegen Ser und Thr in zu geringen Konzentrationen vorliegen. Ursache hierfür sind vermutlich noch enthaltene Verunreinigungen an Caseinen bzw. Molkenproteinen, welche den späteren Einsatz des isolierten CMP-Standards zur Identifizierung und Quantifizierung in Milch- und Milchprodukten jedoch nicht limitieren. Im Falle von Serin und Threonin kann auch ein säurekatalysierter Abbau zu diesen Verlusten führen.

**Tab. 4.2** Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von isoliertem CMP mit Literaturwerten zu CMP A bzw. CMP B gefunden (Dekoning et al. 1966, Eigel et al. 1984, Hill et al. 1970) [Durchführung der ASA nach 3.5.9, fett markierte AS – Abweichungen von Literaturangaben].

	isoliertes CMP	CMP A	CMP B
Asn /Asp	5	5	4
Thr	<b>9</b>	12	11
Ser	<b>4</b>	6	6
Gln /Glu	<b>13</b>	10	10
Pro	8	8	8
Gly	1	1	1
Ala	5	5	6
Val	6	6	6
Ile	6	6	7
Leu	2	1	1
Tyr	-	-	-
Phe	-	-	-
His	-	-	-
Lys	4	3	3
Arg	-	-	-
Met	1	1	1
<b>Summe</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>64</b>

Als weiteres Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein mittels Labferment entsteht ein schwer lösliches 105 Aminosäuren großes Peptid, welches als para- $\kappa$ -Casein bezeichnet wird. Zur Charakterisierung dieser isolierten Fraktion konnte infolge der begrenzten Löslichkeit nur eine elektrophoretische Untersuchungsmethode angewendet werden. (**Abb. 4.19**). Die Molmasse von para- $\kappa$ -Casein (**Abb. 4.19**, Bahn 1) wurde zu etwa 12 kDa ermittelt, was mit den in der Literatur angegebenen 12,3 kDa sehr gut übereinstimmt (Brignon et al. 1972). In Folge des Fehlens charakteristischer

weiterer Banden kann die Reinheit des isolierten para- $\kappa$ -Casein-Standards mit 99 % abgeschätzt werden.



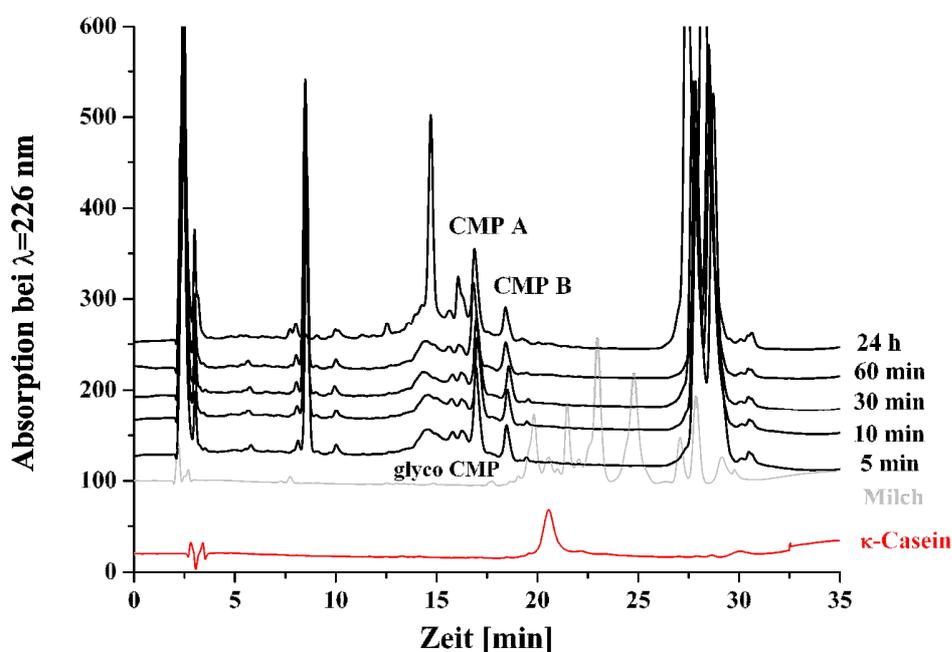
**Abb. 4. 19** SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Reinheit von isoliertem para- $\kappa$ -Casein. [1 - para  $\kappa$ -CN, 2 -  $\kappa$ -CN, 3 - SC, M - Marker (**Tab. 8. 1**), \*von oben nach unten  $\alpha_{S2}$ -,  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -CN]

#### 4.2.2 Etablierung analytischer Methoden zur Bestimmung von Caseinomakropeptid, para- $\kappa$ -Casein und intaktem $\kappa$ -Casein in Milchprodukten

Nachdem sowohl intaktes  $\kappa$ -Casein sowie dessen, nach enzymatischer Hydrolyse gebildeten, Spaltprodukte CMP und para- $\kappa$ -Casein erfolgreich aus Säurecasein isoliert werden konnten, soll anschließend die Quantifizierung dieser Peptide in Milch und Milchprodukten dargelegt werden. Dabei werden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen kann CMP direkt per RP-HPLC angelehnt an eine Methode von Thoma et al. (2006) analysiert werden. Parallel dazu ist es möglich, para- $\kappa$ -Casein sowie intaktes  $\kappa$ -Casein mittels SDS-PAGE nachzuweisen. Eine zweite indirekte Möglichkeit zur Bestimmung von  $\kappa$ -Casein beruht auf der enzymatischen Hydrolyse und anschließenden Quantifizierung des neugebildeten CMP mittels oben genannter RP-HPLC-Methode. Nach Abzug des vor der enzymatischen Behandlung in der Probe bestimmten CMP-Gehaltes kann direkt auf den Gehalt an enthaltenem intaktem  $\kappa$ -Casein geschlossen werden. Notwendige Optimierungs- und Etablierungsschritte der enzymatischen Hydrolyse, sowie der chromatographischen und elektrophoretischen Analyseverfahren, welche bei der Übertragung von einfachen Standardlösungen zu komplexen Milchprodukten erforderlich sind, werden nachfolgend kurz dargelegt.

#### 4.2.2.1 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse

Die Voruntersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von intaktem  $\kappa$ -Casein wurden nach den in Abschnitt 3.5.11 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Als Substrate wurden isoliertes  $\kappa$ -Casein und Säurecasein eingesetzt. Um vorhandene Wechselwirkungen einer komplexen Milchproduktmatrix, welche den kinetischen Ablauf der enzymatischen Reaktion beeinflussen können, auszuschließen, wurden zusätzlich pasteurisierte Milchproben mit Labferment behandelt. Die Optimierung der Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein wurde im Bereich von 0 min bis 24 h bei 37°C mit 0,02 % Labferment (75 % Chymosin, 25 % Pepsin) im Ansatz (0,25  $\mu$ g Labferment / mg Protein, 1:4000) durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde mittels 3%iger Perchlorsäure (PCA) inaktiviert. Die Inaktivierung mit 3 % PCA basiert dabei auf Arbeiten von Thoma et al. (2006), welche zeigen konnten, dass mit dieser Methode nur geringe Verluste (max. 4,5 %) an CMP auftreten. Anhand eigener Untersuchungen konnte dies bestätigt werden (4,3 % Verlust an CMP bei 3 % PCA). Im Vergleich zur sonst üblichen Inaktivierung mit 12%iger Trichloressigsäure (TCA), welche bereits in Konzentrationen von kleiner 1 % zu Verlusten an CMP von etwa 10 % führt (Van Hooydonk et al. 1984), sind diese zu vernachlässigen. Die Verfolgung der enzymatischen Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein anhand der Gehalte an CMP wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. Repräsentative Chromatogramme sind in Abbildung 4.20 gezeigt.

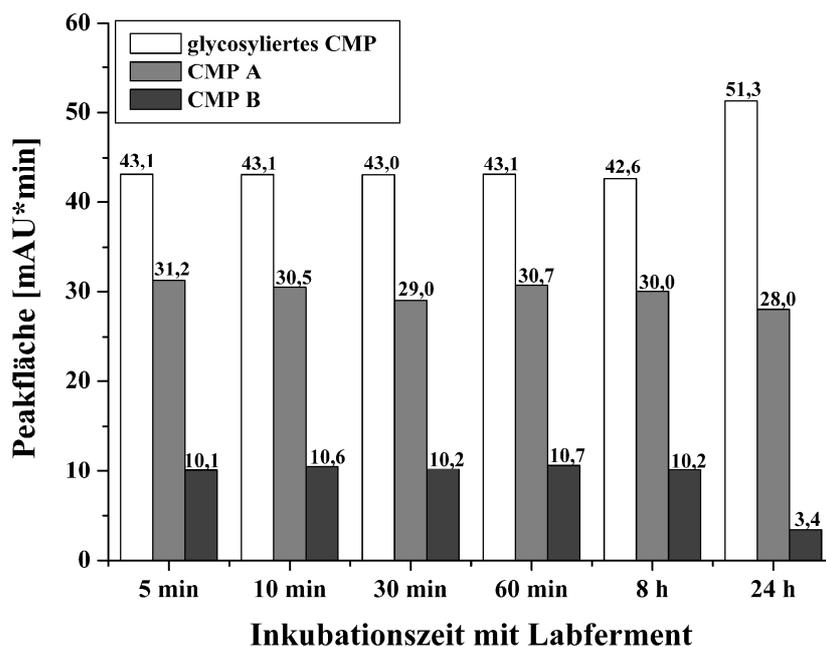


**Abb. 4.20** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von Milch mit Labferment (PLRP-S Phase). [Darstellung der Chromatogramme der 5 min, 10 min, 30 min, 60 min sowie 24 h mit Labferment behandelten Milchproben im Vergleich zu unbehandelte Milch (0 min) und  $\kappa$ -Casein. CMP – Caseinomakropeptid, CMP A (16,9 min), CMP B (18,4 min), Peaks von 14 – 16,5 min – glycosylierte CMP, mit \* markierte Peaks sind die nach 24 h mit Labferment entstehenden Peptide, welche nicht zum CMP zählen]

Die Identifizierung der gebildeten CMP A und CMP B Peaks erfolgte mittels LC-MS sowie anhand des Vergleiches der Retentionszeiten mit Standardmaterial. Die Peaks mit Retentionszeiten von 14 bis 16,5 min können anhand eines Literaturvergleiches (Thoma et al. 2006) den glycosylierten CMP zugeordnet werden.

Bereits nach 5 min Inkubation der Milchproben mit Labferment sind keine intakten Caseine mehr nachweisbar. Der Abbau intakten  $\kappa$ -Caseins und damit einhergehend die Koagulation aller anderen Caseine scheint vollständig abgelaufen zu sein. Beim visuellen Vergleich der Chromatogramme bis 60 min sind keine Veränderungen mehr wahrnehmbar. Die 24 h mit Labferment behandelte Milchprobe weist hingegen Veränderungen im Bereich des Chromatogrammes von 12 bis 22 min auf. Anhand dieser wird ersichtlich, dass durch eine unspezifische proteolytische Aktivität von Labferment weitere Peaks im Bereich der glycosylierten und nichtglycosylierten CMP, mit steigender Hydrolysedauer gebildet werden. Für Chymosin ist beispielsweise bekannt, dass es neben der spezifischen Spaltung der Bindung Phe<sup>105</sup> – Met<sup>106</sup> im  $\kappa$ -Casein, weitere unspezifische Spaltstellen im para- $\kappa$ -Casein (Leu<sup>79</sup> – Ser<sup>80</sup>, Tyr<sup>30</sup> – Val<sup>31</sup>),  $\beta$ -Casein (Leu<sup>192</sup> – Tyr<sup>193</sup>, Leu<sup>165</sup> – Ser<sup>166</sup>, Ala<sup>189</sup> – Phe<sup>190</sup>, Leu<sup>139</sup> – Leu<sup>140</sup>) sowie  $\alpha_{S1}$ -Casein (Phe<sup>23</sup> – Phe<sup>24</sup>) besitzt (Fox et al. 2004, Kobayashi et al. 1985, Carles et al. 1985). Neben der proteolytischen Wirkung von Chymosin und Pepsin kann in Milchproben zusätzlich originär enthaltenes Plasmin zur Entstehung von störenden Peptidfragmenten führen. Gerade bei längeren Inkubationszeiten kann es so zur Entstehung eines großen Spektrums an Peptidfragmenten kommen, welches eine Quantifizierung von CMP infolge auftretender Co-Elutionen erheblich erschweren kann.

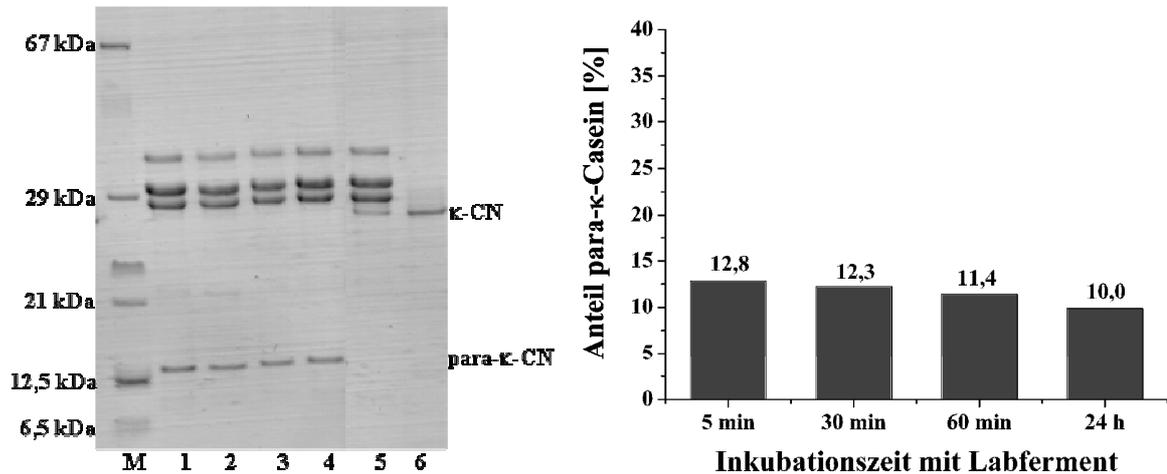
Zur Überprüfung der visuell gewonnenen Eindrücke wurden die Flächen der Peaks des CMP A, CMP B sowie der glycosylierten CMP, der von 5 min bis 24 h mit Labferment inkubierten Milchproben, ermittelt und in **Abb. 4. 21** zusammengestellt. Über den gesamten Zeitraum bis 8 h sind keine signifikanten Flächenab- oder -zunahmen für CMP A / B sowie die glycosylierten Peptide feststellbar. Das Verhältnis an glycosylierten zu nichtglycosylierten CMP beträgt bis 8 h etwa 1:1, das von CMP A zu CMP B etwa 3:1. Erst ab 24 h zeigen sich deutliche Verschiebungen innerhalb der Verhältnisse der CMP-Fraktionen zueinander. So steigen die Anteile an glycosylierten CMP deutlich an, wohingegen CMP A / B absinken. Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit Labferment an Milchproben kann eine unerwünschte, proteolytische Reaktion, welche die reproduzierbare Quantifizierung von CMP erschweren würde, über den Zeitraum bis 8 h ausgeschlossen werden. Eine vollständige Umsetzung des in Milch enthaltenen  $\kappa$ -Caseins kann jedoch bereits nach 5 min festgestellt werden. Zur Quantifizierung von Gesamt-CMP kann das konstante Verhältnis der glycosylierten zur nicht-glycosylierten Form herangezogen werden. Somit reicht eine Bestimmung der CMP A sowie B Formen aus, um auf den in der Probe enthaltenen Anteil an Gesamt-CMP zu schließen.



**Abb. 4. 21** Peakflächen der CMP A / B sowie glycosylierten CMP nach Behandlung von Milchproben mit Labferment im Zeitraum von 5 min bis 24 h. Die Darstellung der 0 min entspricht reiner Milch und ist in Folge der fehlenden Peaks hier nicht dargestellt [n=2]

Für die enzymatisch mit Labferment behandelten  $\kappa$ -Casein- und Säurecasein-Standards wurden im Zeitraum bis 60 min vergleichbare Ergebnisse erzielt. Bei längerer Hydrolyse zeigten diese im Vergleich zu Milch jedoch eine deutlich ausgeprägtere Proteolyse.

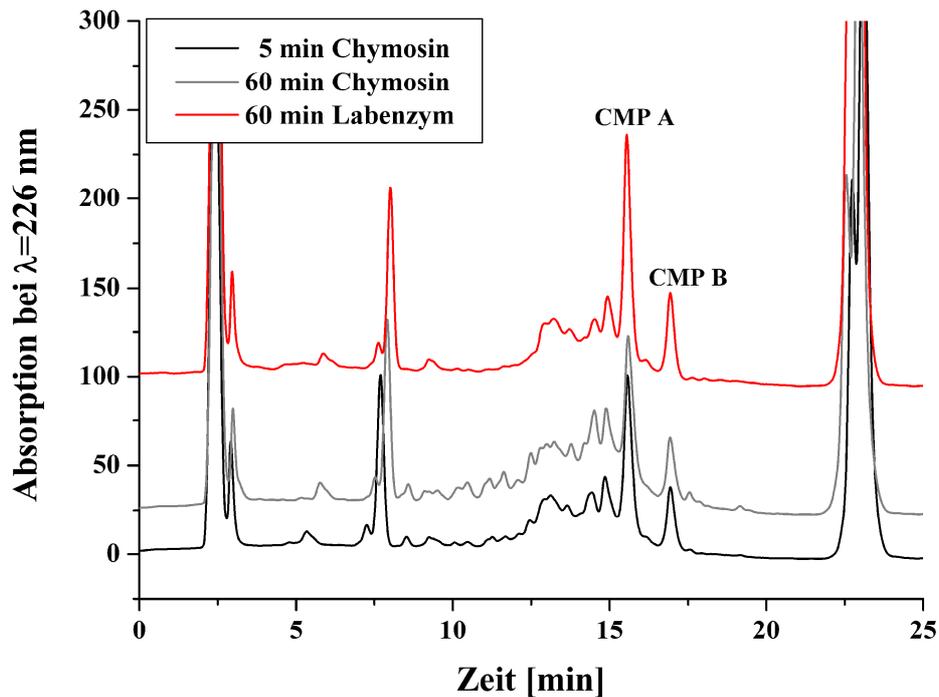
In Ergänzung zu den RP-HPLC Untersuchungen sollte parallel der Abbau intakten  $\kappa$ -Caseins anhand der Bildung von para- $\kappa$ -Casein, welches mittels elektrophoretischer Techniken verfolgt werden kann, analysiert werden. Dazu wurden die jeweiligen Präzipitate (0 min bis 24 h) der enzymatisch hydrolysierten Proben ( $\kappa$ -Casein, Säurecasein und Milch) abgetrennt und mittels SDS-PAGE (3.5.10) untersucht. Ein repräsentatives Elektropherogramm der mit Labferment behandelten Milchproben ist nachfolgend dargestellt. Entsprechend den bereits mit RP-HPLC erhaltenen Ergebnissen kann auch hier kein signifikanter Unterschied der Intensität der, bei etwa 12,5 kDa befindlichen, Bande des para- $\kappa$ -Caseins im Zeitraum von 5 min (Bahn 1) bis 60 min (Bahn 3) festgestellt werden. Der Abbau intakten  $\kappa$ -Caseins ist ebenso nach 5 min vollständig abgeschlossen. Nach einer Inkubation von insgesamt 24 h (Bahn 4) treten im Elektropherogramm im Gegensatz zum HPLC-Chromatogramm keine signifikanten Veränderungen, hervorgerufen durch neugebildete Peptidfragmente, auf. Für die analysierten  $\kappa$ -Casein- und Säurecasein-Standards wurden im gewählten Zeitraum bis 24 h mittels SDS-PAGE vergleichbare Ergebnisse erzielt.



**Abb. 4.22** links) SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Färbung zur Bestimmung der para-κ-Casein in Labferment behandelten Milchproben. rechts) % Anteil an para-κ-Casein ermittelt nach densitometrischer Auswertung [M – Marker, 1 – 5 min, 2 – 30 min, 3 – 60 min, 4 – 24 h, 5 – Säurecasein, 6 – κ-Casein, n=2]

Neben der Analyse von para-κ-Casein eignet sich die dargelegte elektrophoretische Methode ebenso zum Nachweis von intaktem κ-Casein, was aus der vollständigen Trennung von Säurecasein in die Fraktionen  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein (Bahn 5) hervorgeht. Anhand der Voruntersuchungen kann für die enzymatische Hydrolyse von Milchprodukten mit Labferment, sowohl mittels chromatographischer als auch elektrophoretischer Analyseverfahren, als optimierte Hydrolysedauer der Bereich zwischen 5 min bis 60 min ermittelt werden. Für alle folgenden Untersuchungen von Milchprodukten wurde basierend auf den dargelegten Ergebnissen als Inkubationszeit mit Labferment 60 min gewählt.

Das in Abbildung 4.23 dargestellte RP-HPLC Chromatogramm zeigt den Vergleich von enzymatisch hydrolysierten Milchproben mit Labferment (75 % Chymosin / 25 % Pepsin, 0,25  $\mu\text{g}$  / mg Protein) bzw. reinem Chymosin (0,0025  $\mu\text{g}$  / mg Protein). Anhand dieser Darstellung kann für reines Chymosin eine deutlich ausgeprägtere Proteolyse ermittelt werden, welche bereits nach 5 min durch die Entstehung störender, coelulierender Peptidfragmente im Bereich von 12 – 18 min charakterisiert ist. Bei längeren Inkubationszeiten treten diese Prozesse verstärkt auf, was zur Folge hat, dass in Chymosin-behandelten Proben die Quantifizierung von CMP nicht mehr fehlerfrei möglich ist. Auf weitere Tests und Optimierungen der enzymatischen Hydrolyse mit Chymosin wurde im Rahmen der Arbeit verzichtet, da zum Einen mit Labferment weitaus bessere Ergebnisse erzielt wurden und dieses zum Anderen geringere Analysekosten verursacht.

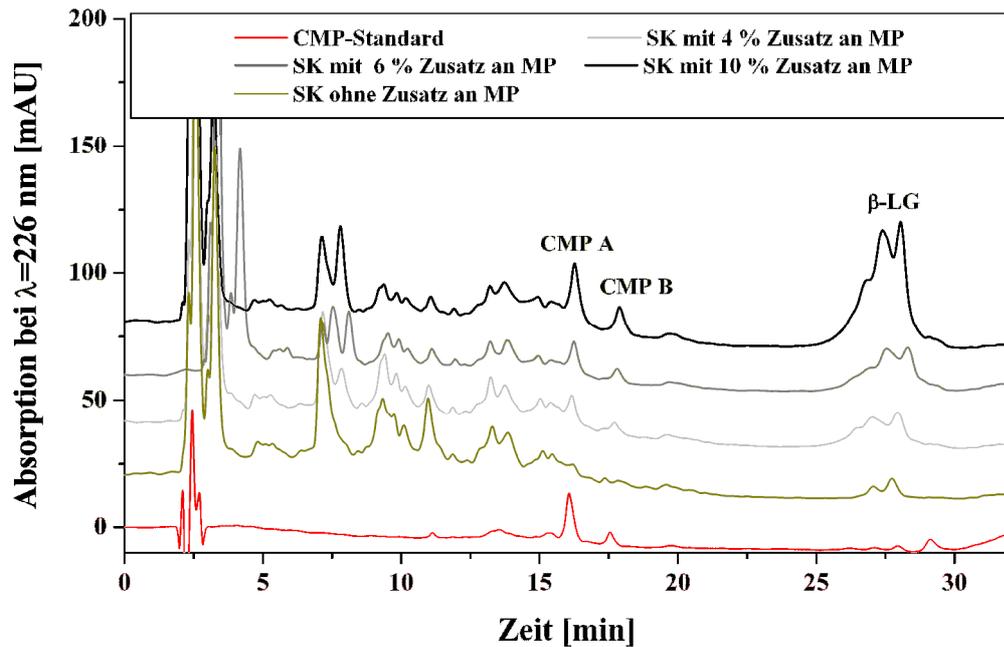


**Abb. 4.23** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich der enzymatischen Hydrolyse von Milch mit Labferment bzw. Chymosin (PLRP-S Phase) [CMP – Caseinomakropeptid, CMP A (15,5 min), CMP B (17,0 min) – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids, Peaks von 13 – 15 min – glycosylierte CMP].

#### 4.2.2.2 Chromatographische Bestimmung von Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein in Milchprodukten

Die bereits zur Charakterisierung der Standardmaterialien eingesetzte RP-HPLC Methode, welche auf einer Methode von Thoma et al. (2006) basiert, wurde im Folgenden auf die komplexen Matrices von Schmelzkäse und Rohwaren zu dessen Herstellung übertragen und hinsichtlich deren Anwendbarkeit bewertet. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Milch-, Säurecasein- und  $\kappa$ -Casein-Proben sollte sich der Nachweis und die Quantifizierung von CMP in Schmelzkäsen und Käsen in Folge der enthaltenen originären Milchenzyme (Plasmin), sowie weiterer zur Käseherstellung eingesetzter mikrobieller Enzyme der Starter- und Nicht-Starterkulturen analytisch anspruchsvoller gestalten. Neben Propionsäurebakterien, Edelschimmelpilzen und Rotschmierekulturen, die für bestimmte Käsesorten charakteristisch sind, weisen Schnitt- und Hartkäse, welche hauptsächlich zur Schmelzkäseherstellung eingesetzt werden, nur Milchsäurebakterien auf (Fox et al. 2004). Diese führen ebenso mit fortschreitender Reifung zur Ausbildung charakteristischer Peptidspektren, die einen positiven Einfluss auf das Aroma und den Geschmack der Käse haben, die Analytik von CMP jedoch negativ beeinflussen können.

Das in Abbildung 4.24 dargestellte RP-HPLC Chromatogramm zeigt exemplarisch Schmelzkäse, denen in unterschiedlichen Anteilen Molkenpulver (MP) zugesetzt sind.

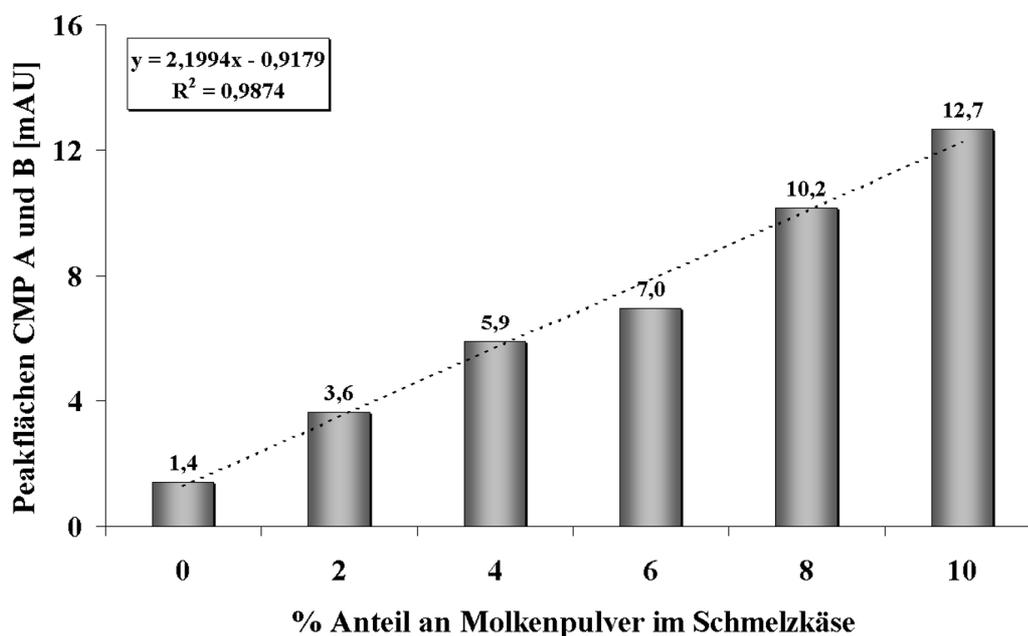


**Abb. 4. 24** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich von Schmelzkäsen mit und ohne Zusatz an Molkenpulver (MP) [Darstellung der Chromatogramme von Schmelzkäsen mit 4 %, 6 % und 10 % Zusatz an MP im Vergleich zu Schmelzkäse ohne MP-Zusatz. CMP- Caseinomakropeptid, CMP A (15,5 min), CMP B (17,0 min) – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids,  $\beta$ -LG -  $\beta$ -Lactoglobulin].

Im Vergleich zur Probe ohne Zusatz an MP (grüne Linie) sind in den Schmelzkäsen mit MP-Zusatz (graue und schwarze Linien) deutlich die charakteristischen Peaks des CMP A sowie B detektierbar. Identifiziert wurden diese anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des UV- sowie Massenspektrums mit zuvor isoliertem und charakterisiertem CMP-Standardmaterial.

Mit ansteigendem Anteil an MP ist eine signifikante Vergrößerung der Peakflächen an CMP A und B, in der Abbildung repräsentiert durch Schmelzkäse mit 4 %, 6 % und 10 % Zusatz an Molkenpulver, zu verzeichnen (Abb. 4. 24). Eine vergleichbare Beobachtung kann für den Doppelpeak bei etwa 27 min, welcher anhand von Standards als  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -LG) identifiziert wurde, gemacht werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den bereits in Abschnitt 4.1.2.2 gewonnenen Erkenntnissen, worin der hohe Anteil an Molkenproteinen in Molkenpulvern zur signifikanten Erhöhung dieser in Schmelzkäsen führt. Der Anteil an glycosyliertem CMP kann in Folge der bereits im molkenproteinfreien Schmelzkäse vorhandenen ausgeprägten Peaks zwischen 12-15 min nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Bei diesen Signalen handelt es sich vermutlich um Peptide, welche durch proteolytische Prozesse während der Käsureifung entstanden sind und durch diese in den Schmelzkäse eingebracht werden. Die noch im Schmelzkäse enthaltenen intakten Caseine sind in Folge der Probenvorbehandlung mit 15%iger Perchlorsäure ausgefällt worden und können somit nicht mehr mittels RP-HPLC, sondern nur noch mittels SDS-PAGE analysiert werden. Zur besseren

Veranschaulichung der Zunahme der Flächenanteile an CMP A / B wurden diese in den analysierten Schmelzkäsen mit ansteigendem MP-Zusatz in Abbildung 4.25 dargestellt.



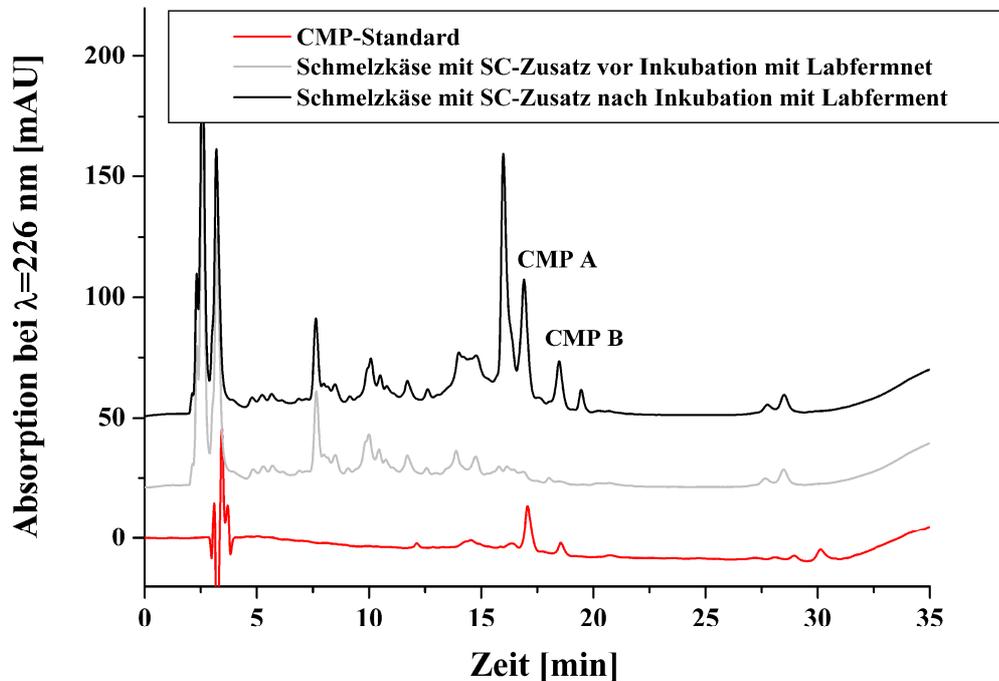
**Abb. 4. 25** Darstellung der, in den mit 0 % bis 10 % Molkenpulver versetzten Schmelzkäsen, ermittelten Peakflächenanteile an CMP A sowie CMP B. Nach linearer Regression wurde die abgebildete Ausgleichsgerade erhalten.

Innerhalb des gewählten Bereiches von 0 % bis 10 % Zusatz an Molkenpulver führt ein Eintrag dieser Komponente zu einer stetigen Erhöhung der analytisch erfassten Konzentration an CMP A sowie CMP B. Nach linearer Regression konnte ein hohes Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,99$  für die ermittelte Funktion erhalten werden, womit die Voraussetzung für eine Quantifizierung von CMP A / B als Marker für enthaltenes Molkenpulver erfüllt ist. Weiterhin konnte für das ermittelte Verhältnis der beiden genetischen Hauptvarianten CMP A zu CMP B innerhalb des untersuchten Bereiches ein konstant bleibender Wert von 3:1, wie bereits bei isoliertem CMP gezeigt werden konnte, ermittelt werden. Die Wiederfindungen an Molkenpulver, welche basierend auf dem Gehalt an CMP ermittelt wurden, konnten anhand von Dotierungsversuchen in unterschiedlichen Matrices zu 90 % bis 112 % ermittelt werden.

Die zugrundeliegende Berechnung für die Umrechnung von CMP auf Molkenpulver basiert dabei auf dem in 6 verschiedenen Molkenpulvern ermittelten Mittelwert an gesamtem CMP von etwa 2,4 %. Die Anteile an CMP A und B am Gesamt-CMP machen davon etwa 45 % aus.

Neben der direkten Messung von CMP als Marker für einen Molkenpulver-Zusatz in Schmelzkäsen soll nachfolgend indirekt ein Zusatz an Säurecasein, Magermilchpulver und Milchproteinkonzentrat über die enzymatische Spaltung von eingetragenen intaktem  $\kappa$ -Casein zu CMP und para- $\kappa$ -Casein in Schmelzkäsen erfolgen. Exemplarisch

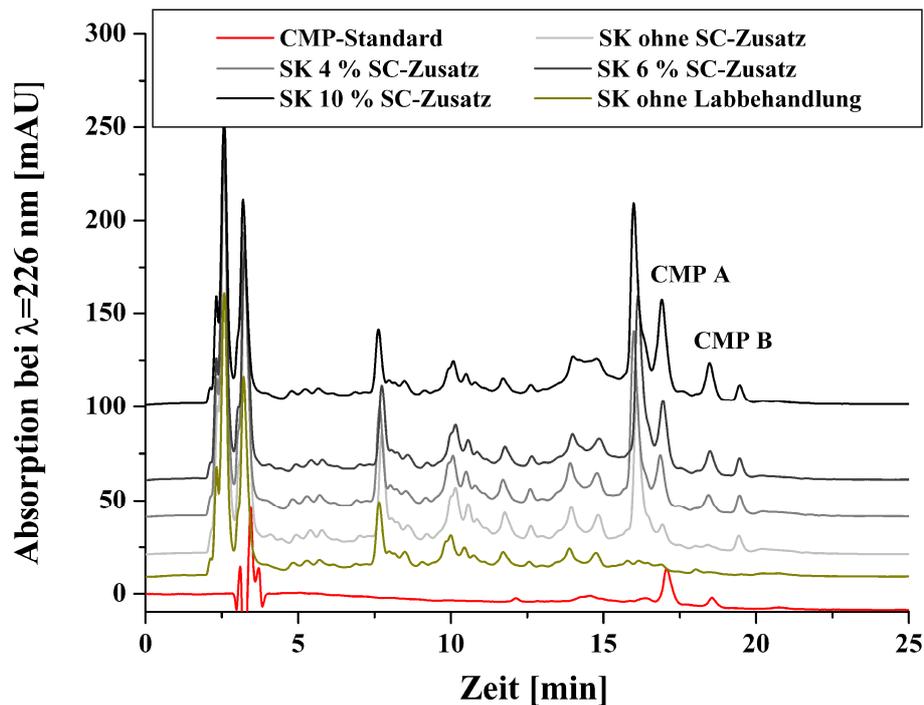
ist dies in den nachfolgend dargelegten Abbildungen (Abb. 4. 26, Abb. 4. 27, Abb. 4. 28) für Schmelzkäse, in welchem definierte Mengen an Käse durch Säurecasein ersetzt wurden, dargestellt. Zunächst wurde überprüft, ob Schmelzkäse ohne zugesetztes Säurecasein bereits geringe Mengen an CMP aufweist. Anhand der folgenden Abbildung (Abb. 4. 26) ist dies am Beispiel von Schmelzkäse mit 10 % SC-Zusatz dargestellt.



**Abb. 4. 26** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich einer mit 10 % SC versetzten Schmelzkäseprobe vor und nach enzymatischer Behandlung mit Labferment (PLRP-S Phase). CMP-Caseinomakropeptid, CMP A, CMP B – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids]

Es ist ersichtlich, das im untersuchten Schmelzkäse vor der enzymatischen Behandlung mit Labferment weder CMP A noch CMP B nachweisbar sind (Abb. 4. 26, graue Linie). Dies lässt den Rückschluss zu, dass sowohl die eingesetzte Käse- als auch die Säurecaseinrohware frei von CMP sind. Im Vergleich dazu können nach der enzymatischen Behandlung mit Labferment eindeutig die charakteristischen Peaks des CMP A sowie B in Schmelzkäsen mit zugesetztem Säurecasein detektiert werden (Abb. 4. 26, schwarze Linie). Identifiziert wurden diese anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des UV- sowie Massenspektrums mit zuvor isoliertem und charakterisiertem CMP-Standardmaterial.

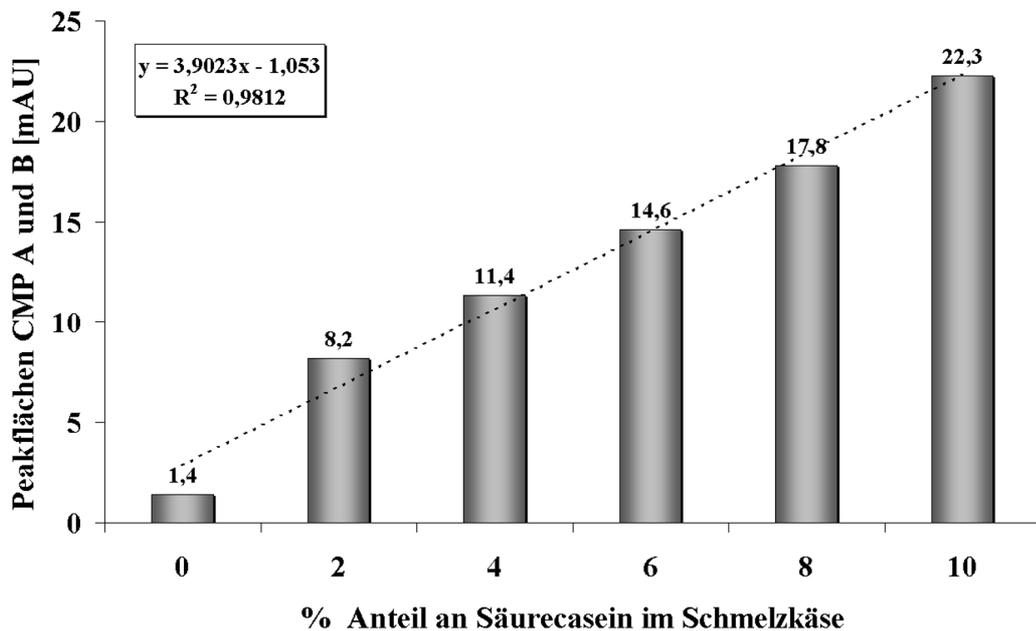
Nachfolgend abgebildetes RP-HPLC Chromatogramm (Abb. 4. 27) zeigt exemplarisch Schmelzkäse nach Labfermentbehandlung, denen in unterschiedlichen Anteilen Säurecasein zugesetzt wurde.



**Abb. 4. 27** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich von Schmelzkäses mit und ohne Zusatz an SC (PLRP-S Phase). [Darstellung der Chromatogramme von Schmelzkäses mit 4 %, 6 % und 10 % Zusatz an SC im Vergleich zu Schmelzkäse ohne SC-Zusatz. CMP- Caseinomakropeptid, CMP A (16,9 min), CMP B (18,4 min) – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids]

Im Vergleich zur Probe ohne Zusatz an SC (hellgraue Linie) sind in den Schmelzkäses mit SC-Zusatz (mittel- sowie dunkelgraue und schwarze Linien) deutlich die nach enzymatischer Behandlung mit Labferment gebildeten charakteristischen Peaks des CMP A sowie B detektierbar. Mit ansteigendem Anteil an SC ist eine signifikante Vergrößerung der Peakflächen an CMP A und B, in der Abbildung repräsentiert durch Schmelzkäse mit 4 %, 6 % und 10 % Zusatz an Säurecasein, zu verzeichnen. Der Anteil an glycosyliertem CMP kann in Folge der, bereits im säurecaseinfreien und ohne Labferment behandelten Schmelzkäse (grüne Linie) vorhandenen, ausgeprägten Peaks zwischen 12-16 min nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Bei diesen Signalen handelt es sich vermutlich um Peptide, welche durch proteolytische Prozesse während der Käseerzeugung entstanden sind und durch diese in den Schmelzkäse eingebracht werden. Durch Inkubation mit Labferment treten in diesem Bereich des Chromatogrammes noch vermehrt Peaks auf, welche jedoch eine Quantifizierung der zwei genetischen Hauptvarianten des CMP A und B nicht erschweren. Zur besseren Veranschaulichung der Zunahme der Flächenanteile an CMP A / B wurden diese in den analysierten Schmelzkäses mit ansteigendem SC-Zusatz in **Abb. 4. 28** dargestellt. Innerhalb des gewählten Analysenbereiches von 0 % bis 10 % Zusatz an SC führt ein Eintrag dieser Komponente zu einer stetigen Erhöhung der analytisch erfassbaren Konzentration an CMP A sowie CMP B nach enzymatischer Hydrolyse mit Labferment. Nach linearer Regression konnte ein hohes Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,98$

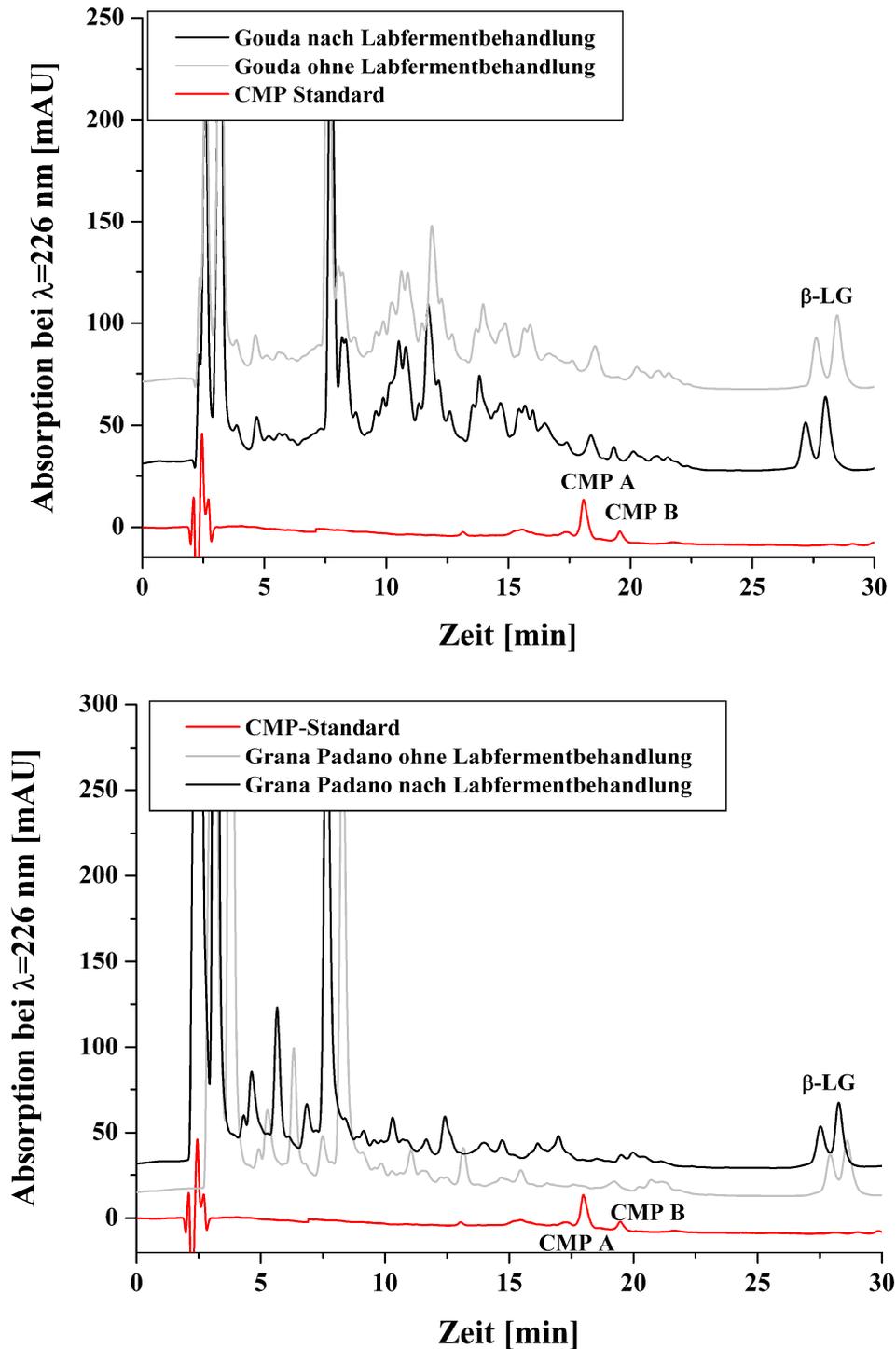
für die ermittelte Funktion erhalten werden, womit die Voraussetzung für eine Quantifizierung von CMP A / B als Marker für enthaltenes intaktes  $\kappa$ -Casein erfüllt ist.



**Abb. 4. 28** Darstellung der nach enzymatischer Hydrolyse mit Labferment, in den mit 0 % bis 10 % Säurecasein versetzten Schmelzkäsen, ermittelten Peakflächenanteile an CMP A sowie CMP B. Nach linearer Regression wurde die abgebildete Ausgleichsgerade mit der dargestellten Gleichung erhalten.

Für Schmelzkäse mit Magermilchpulver- (MMP) und Milchproteinkonzentrat-Zusatz (MPC) konnten vergleichbare Erkenntnisse gewonnen werden. Einzig die enthaltenen Mengen an eingetragendem  $\kappa$ -Casein liegen mit 270 mg (10 % MMP-Zusatz) bzw. 760 mg / 100 g Probe (10 % MPC-Zusatz) deutlich unter denen der Schmelzkäse mit SC-Zusatz (960 mg / 100 g). Die ermittelten Wiederfindungen an SC, MMP und MPC, welche basierend auf dem nach enzymatischer Behandlung mit Labferment ermittelten Gehalten an CMP beruhen, konnten anhand von Dotierungsversuchen in unterschiedlichen Matrices zu 91 % bis 105 % ermittelt werden. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen ist demzufolge mit einer vollständigen Hydrolyse des enthaltenen intakten  $\kappa$ -Caseins zu rechnen. Die zugrundeliegende Berechnung für die Umrechnung von CMP auf den Zusatz an Säurecasein in Schmelzkäsen basiert dabei auf einem prozentualen Anteil von im Mittel 40 % CMP in  $\kappa$ -Casein, welches selbst wiederum zu durchschnittlich 12 % in SC enthalten ist.

Die etablierte RP-HPLC Methode zur Quantifizierung von CMP in Schmelzkäsen sollte nachfolgend auf die Rohwaren zur Herstellung von Schmelzkäsen übertragen werden. Zwei ausgewählte RP-HPLC Chromatogramme eines jungen Schnittkäses (Gouda) sowie eines langgereiften Hartkäses (Grana Padano) sind in Abbildung 4.29 exemplarisch gezeigt.



**Abb. 4. 29** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 226 nm zum Vergleich zweier Käsematrices vor und nach enzymatischer Behandlung mit Labferment (PLRP-S Phase). [Darstellung der Chromatogramme von Gouda (oben) und Grana Padano (unten). CMP- Caseinomakropeptid, CMP A, CMP B – zwei genetische Hauptvarianten des Caseinomakropeptids,  $\beta$ -LG –  $\beta$ -Lactoglobulin]

Im Chromatogramm des noch relativ wenig gereiften Gouda Käses sind zwischen 7 bis 16 min noch deutlich ausgeprägte Peptidspeaks zu erkennen, welche durch eine weitere Inkubation mit Labferment nur geringe Veränderungen aufweisen, da die spezifischen für Chymosin und Pepsin vorhandenen Spaltstellen zu diesem Zeitpunkt der Reifung bereits längst abgebaut sind. Geringe Mengen an CMP A sind in diesem

Käse bereits vor der Labfermentbehandlung nachweisbar. Je nach Herstellung verbleiben unterschiedliche Restgehalte an Molke im Käse, durch welche CMP aber auch  $\beta$ -Lactoglobulin (LG; Doppelpeak bei 28 min) eingetragen werden können. Nach der enzymatischen Hydrolyse ist zusätzlich eine Neubildung an CMP A und B detektierbar, welche auf geringe Restmengen an intaktem  $\kappa$ -Casein im Gouda Käse schließen lässt. Im Vergleich dazu kann im langgereiften Grana Padano weder vor noch nach der enzymatischen Behandlung mit Labferment enthaltenes oder neu gebildetes CMP nachgewiesen werden. Als typischer Hartkäse ist dieser deutlich stärker proteolytisch angegriffen, was zur Bildung kleiner Peptide und vieler freier Aminosäuren führt, welche in der angewendeten analytischen Methode früher eluieren und somit in einer Verschiebung des Peptidspektrums zu kürzeren Elutionszeiten ablesbar sind. Reste an intaktem  $\beta$ -LG sind im Grana Padano Käse ebenso enthalten und weisen vergleichbar zum Gouda Käse auf noch enthaltene Molkereste hin.

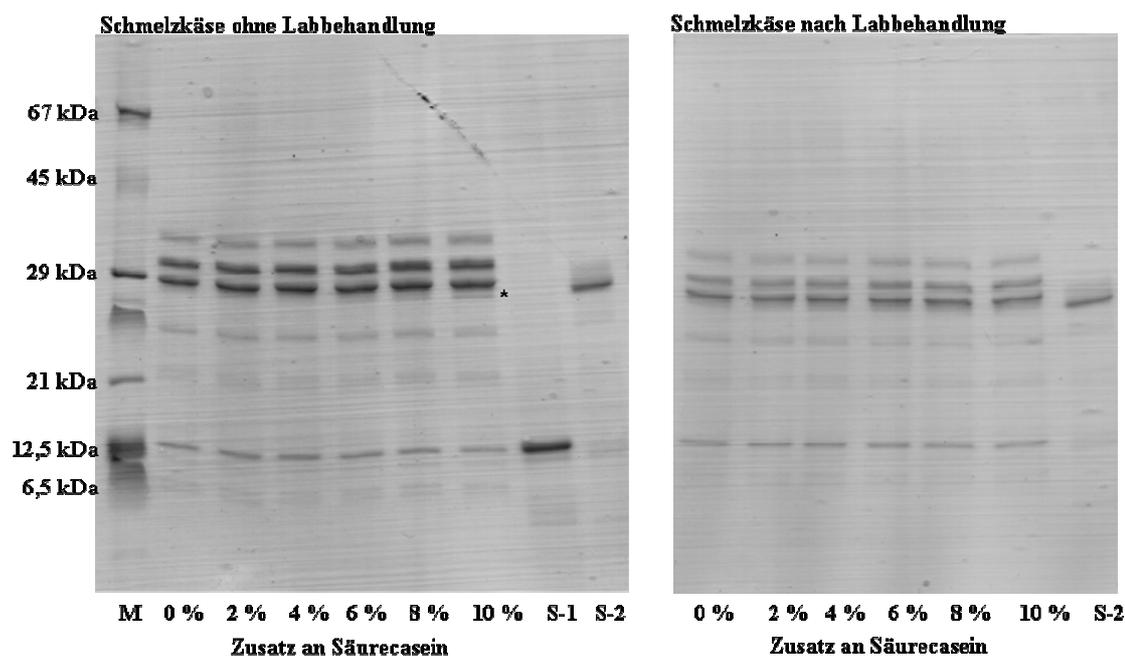
Mittels der hier vorgestellten Methode ist es somit möglich, durch Differenzbildung zum einen direkt vorhandenes CMP bzw. nach enzymatischer Spaltung mit Labferment neu gebildetes CMP zu erfassen. Eine Bestimmung des in Schmelzkäsen enthaltenen Anteiles an Molkenpulver ist somit eindeutig durch ersteres möglich. Anhand des Anteiles an neugebildetem CMP kann auf den Gehalt an intaktem  $\kappa$ -Casein, welcher für SC, MMP und MPC charakteristisch ist, geschlossen werden. Die bislang für Rohwaren und Schmelzkäse mit bekannter Zusammensetzung etablierte Methode soll im Folgenden auf handelsübliche Schmelzkäse übertragen werden.

#### 4.2.2.3 *Elektrophoretische Bestimmung von para- $\kappa$ -Casein und $\kappa$ -Casein in Milchprodukten*

Neben der Etablierung einer RP-HPLC Methode zur Bestimmung von CMP soll parallel dazu mittels SDS-PAGE eine Möglichkeit zum Nachweis von  $\kappa$ -Casein sowie para- $\kappa$ -Casein, da letzteres mittels der beschriebenen chromatographischen Methode gar nicht erfasst werden kann, erarbeitet werden. Die Ergebnisse der durchgeführten elektrophoretischen Untersuchungen sind nachfolgend am Beispiel von Schmelzkäse mit SC-Zusatz kurz dargelegt. In **Abb. 4. 30** ist ein repräsentatives Elektropherogramm von Schmelzkäseproben mit ansteigendem SC-Zusatz (0 % bis 10 %) jeweils vor und nach einer Behandlung mit Labferment gezeigt. Die nach densitometrischer Auswertung erhaltenen Ergebnisse dazu sind in **Abb. 4. 31** gezeigt.

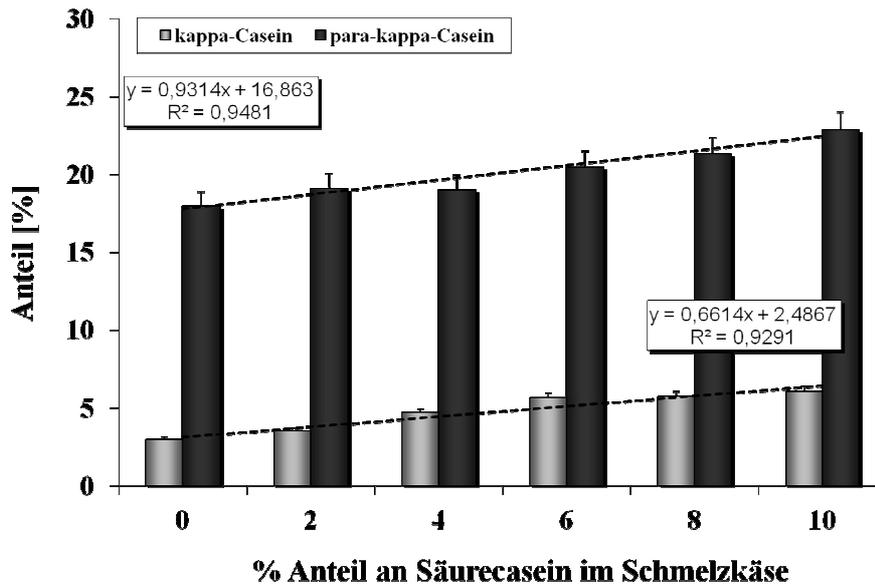
Neben der Analyse von para- $\kappa$ -Casein (12,5 kDa) eignet sich die dargelegte elektrophoretische Methode ebenso zum Nachweis von intaktem  $\kappa$ -Casein (28 kDa). Die Identifizierung der erhaltenen Banden erfolgte dabei anhand mitgeführter Standards. Analog zu den bereits mit RP-HPLC erhaltenen Ergebnissen kann auch mittels SDS-PAGE ein Nachweis und eine semiquantitative Bestimmung von  $\kappa$ -Casein

in den untersuchten Schmelzkäsen und Rohwaren zu deren Herstellung vorgenommen werden, wobei mit steigendem Säurecasein-Gehalt ein höherer  $\kappa$ -Casein Anteil ermittelt werden konnte. Ebenso ist mit dieser Methode eine Bestimmung der Gehalte an para- $\kappa$ -Casein möglich. Im Vergleich zum  $\kappa$ -Casein steigen auch diese innerhalb der Schmelzkäse mit zunehmendem SC-Zusatz an, wobei zu beachten ist, dass dies nur nach enzymatischer Behandlung mit Labferment analysierbar ist. Im Gegensatz dazu ist nach einer enzymatischen Behandlung in allen untersuchten Schmelzkäseproben kein intaktes  $\kappa$ -Casein mehr nachweisbar.



**Abb. 4. 30** SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung der Gehalte an  $\kappa$ -Casein und para- $\kappa$ -Casein in Schmelzkäsen mit variierendem Säurecasein-Zusatz (0 % bis 10 %). **links**) vor Labfermentbehandlung **rechts**) nach Labfermentbehandlung [M – Marker, S-1 – para- $\kappa$ -Casein Standard, S-2 –  $\kappa$ -Casein Standard, \*  $\kappa$ -Casein].

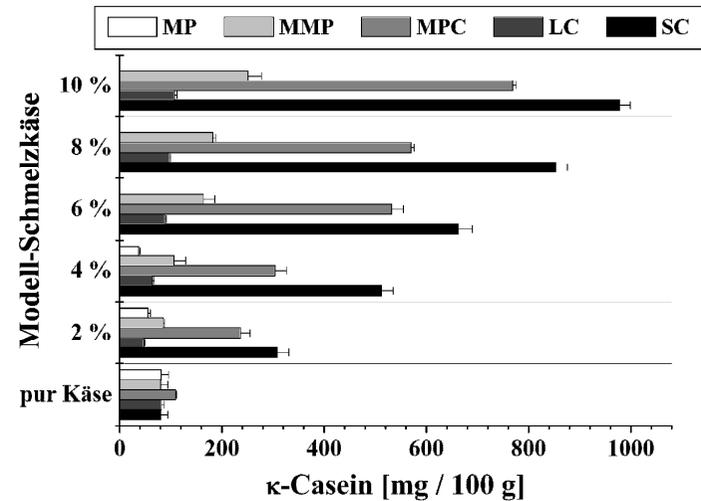
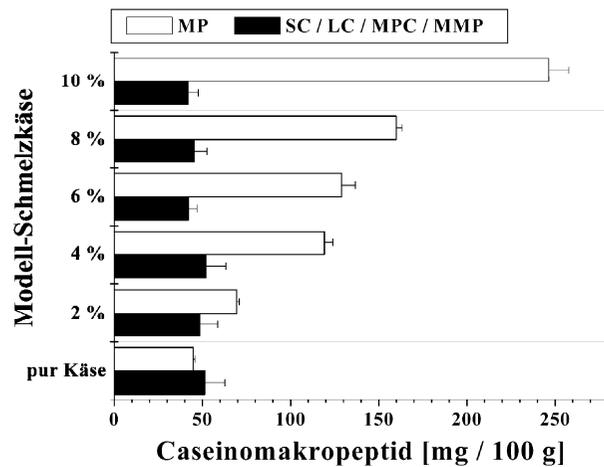
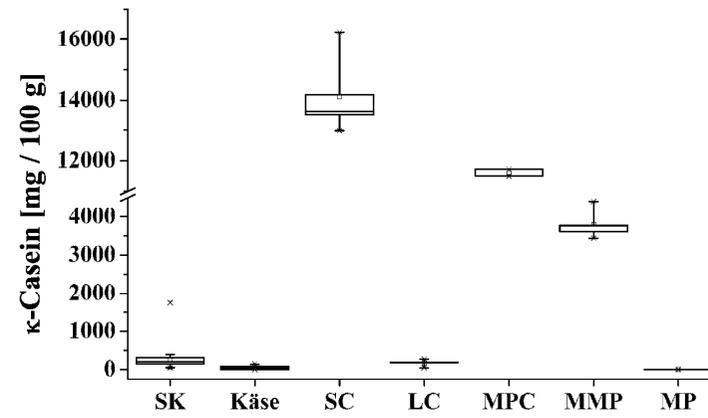
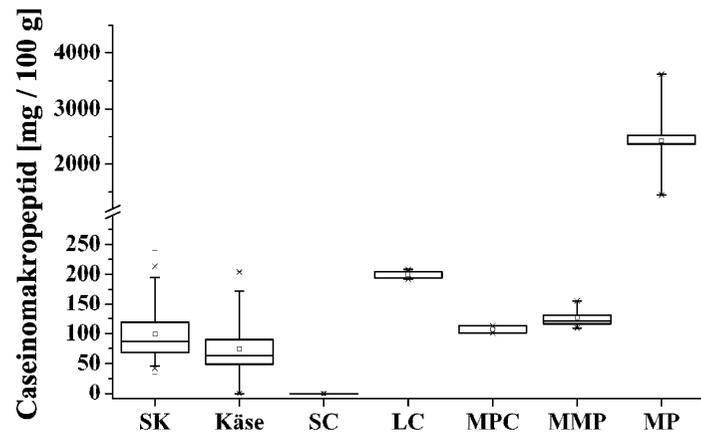
Innerhalb des gewählten Analysebereiches von 0 % bis 10 % Zusatz an Säurecasein führt ein Eintrag dieser Komponente zu einer stetigen Erhöhung der analytisch erfassten Konzentration an  $\kappa$ -Casein bzw. para- $\kappa$ -Casein nach enzymatischer Hydrolyse mit Labferment (**Abb. 4. 31**). Nach linearer Regression konnte ein im Vergleich zur RP-HPLC gering niedrigeres Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,93$  bzw.  $0,95$  für die ermittelten Funktionen erhalten werden. Dies kann u.a durch die geringere Sensitivität der verwendeten Färbetechnik hervorgerufen werden, welche in einer geringeren Auflösung und damit verbunden einer schwierigeren Auswertung resultiert. In Folge dessen wurden die anschließend untersuchten handelsüblichen Proben nur noch mittels RP-HPLC auf die Gehalte an CMP vor und nach enzymatischer Methode untersucht.



**Abb. 4. 31** Darstellung des prozentualen Anteiles an  $\kappa$ -Casein und para- $\kappa$ -Casein ermittelt nach densitometrischer Auswertung der in **Abb. 4. 30** dargestellten Schmelzkäse mit variierenden Gehalten an Säurecasein. Nach linearer Regression wurden die abgebildeten Ausgleichsgeraden erhalten.

#### 4.2.3 Caseinomakropeptid und $\kappa$ -Casein – Analytische Messgrößen zur Ermittlung der Rezeptur von Schmelzkäsen

Im folgenden Kapitel werden die ermittelten  $\kappa$ -Casein- und CMP-Gehalte der untersuchten Schmelzkäse dargelegt und hinsichtlich deren Anwendbarkeit zur Abgrenzung von Käseprotein zu Nicht-Käseprotein diskutiert. Grafisch dargestellt ist dies in **Abb. 4. 32** (links oben). Die untersuchten Schmelzkäse weisen dabei stark schwankende Gehalte an CMP von 32,1 bis 240,2 mg / 100 g Probe auf. Zum Teil geringere Gehalte an CMP sind in den analysierten Käsen zu finden (n.b. bis 204 mg / 100 g Probe). Die CMP-Gehalte der anderen Rohwaren (MPC, MMP und LC) liegen mit 101 bis 208 mg / 100 g Probe im gleichen Konzentrationsbereich wie die Käse. Ein Austausch an Käserohware durch MPC, MMP oder LC kann demnach anhand des CMP-Levels nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu sollte ein Austausch der Käserohware durch Säurecasein, welches kein CMP enthält, zu absinkenden Gehalten an diesem führen (**Abb. 4. 32**, links unten). Ein Zusatz an MP, welche durch sehr hohe Gehalte an CMP gekennzeichnet sind (1,5 bis 3,6 g / 100 g Probe), führt hingegen zu stark ansteigenden Gehalten. Dies ist grafisch in **Abb. 4. 32** links unten für Schmelzkäse, denen definierte Anteile der Käserohware durch die Proteinpulver - SC, LC, MPC, MMP sowie MP – ersetzt wurden, gezeigt. Als CMP-eintragende Rohware kann eindeutig nur Molkenpulver festgestellt werden. Dabei steigt der anfänglich bei etwa 50 mg / 100 g liegende Wert um den Faktor 4,5 auf knapp 225 mg / 100 g Probe bei einem 10%igem Zusatz an Molkenpulver an.



**Abb. 4.32 links oben:** Caseinomakropeptid in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)

**links unten:** Gemittelte Caseinomakropeptidgehalte in Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Proteinzusätzen (0 % pur Käse bis 10 %, n = 3)

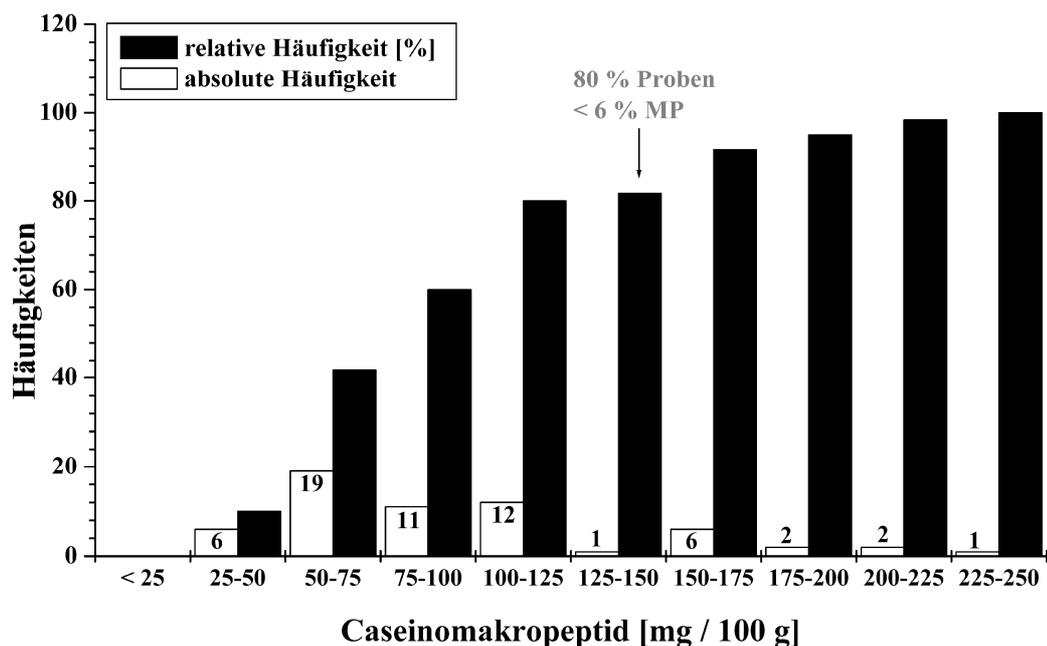
[SK – Schmelzkäse, MMP - Magermilchpulver, MP - Molkenpulver, MPC - Milchproteinkonzentrat, SC - Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** Gehalte an κ-Casein in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile :25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)

**rechts unten:** Gemittelte κ-Casein-Gehalte von Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %,

In Folge der großen Streuung innerhalb der Käserohware ist die Abgrenzung dieser Zutat zu weiteren zur Herstellung von Schmelzkäse eingesetzten, proteinhaltigen Rohwaren (SC, LC, MPC und MMP) jedoch nicht möglich. Ein Austausch der Käserohware durch diese Proteinpulver führt in Folge dessen zu keiner nennenswerten Änderung des Basislevels von 50 mg / 100 g CMP der mit variierendem Anteil an Proteinzusatz hergestellten Schmelzkäse.

Betrachtet man die ermittelten CMP-Gehalte der analysierten handelsüblichen Schmelzkäse in Abhängigkeit zur aufgetretenen Häufigkeit (Abb. 4. 33), so stellt man fest, dass nur knapp jede fünfte Probe CMP-Gehalte über 150 mg / 100 g aufweist. Dies entspricht einem Anteil an etwa 6 % Molkenpulver im Schmelzkäse. In den meisten Schmelzkäsen wurden Gehalte an CMP von > 50 bis <125 mg / 100 g gefunden, was einem Zusatz von kleiner 4 % MP repräsentiert. Weit höhere Anteile an MP in Schmelzkäsen sind aber auch nicht zu erwarten. Neben einer veränderten Textur sind v.a. negative sensorische Beeinträchtigungen hierfür verantwortlich (Merkenich et al. 1996).



**Abb. 4. 33** Verteilung der absoluten und relativen Häufigkeit an Caseinomakropeptid innerhalb der untersuchten kommerziellen Schmelzkäse. [Markierung repräsentiert 80 % der Proben, wobei der CMP-Gehalt in diesen maximal 150 mg / 100 g erreicht. Dies entspricht einem Zusatz an maximal 6 % Molkenpulver (MP)]

Die zwischen den analysierten, handelsüblichen Schmelzkäseproben auftretenden Abweichungen an CMP weisen jedoch eindeutig auf eine bestehende Diversität der zugrundeliegenden Rezepturen hin. Inwieweit diese Unterschiede ausschließlich durch MP-Zusatz hervorgerufen wird, kann nur semiquantitativ ermittelt werden. Limitierend wirkt sich in diesem Zusammenhang v.a. die hohe Streuung innerhalb der Käserohware

aus, da infolgedessen nur schwierig ein Basislevel an CMP in dieser Komponente bestimmt werden kann. Die Ursachen dieser Schwankungen sind zumeist herstellungsbedingt. So beeinflusst beispielsweise die Bruchbearbeitung und das Abpressen maßgeblich den im Käsebruch verbleibenden Anteil an Molke und damit an CMP.

$\kappa$ -Casein, aus welchem CMP und para- $\kappa$ -Casein nach enzymatischer Behandlung mit Labferment während des Käseherstellungsprozesses gebildet werden, ist in Käsen nicht oder nur in geringsten Mengen enthalten. Im Rahmen der in der Arbeit untersuchten Käsesorten konnte dies bestätigt werden. Die ermittelten Gehalte an  $\kappa$ -Casein schwanken in den untersuchten Käseproben zwischen n.b. bis 150 mg / 100 g Probe. Der daraus resultierende Mittelwert konnte zu 48 mg / 100 g Probe bestimmt werden. Im Vergleich dazu liegt der für die untersuchten Schmelzkäse ermittelte Wert (270 mg / 100 g Probe) um den Faktor 5 bis 6 höher. Die Einzelwerte reichen dabei von Schmelzkäsen mit äußerst geringen Anteilen (21 mg / 100 g Probe) an  $\kappa$ -Casein bis hin zu deutlich erhöhten (1785 mg / 100 g Probe). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein großer Teil der analysierten, handelsüblichen Schmelzkäse neben Käserohware, welche keine bis nur geringe Gehalte an  $\kappa$ -Casein einträgt, weitere Rohwaren mit deutlich größeren  $\kappa$ -Casein-Anteilen enthalten muss.

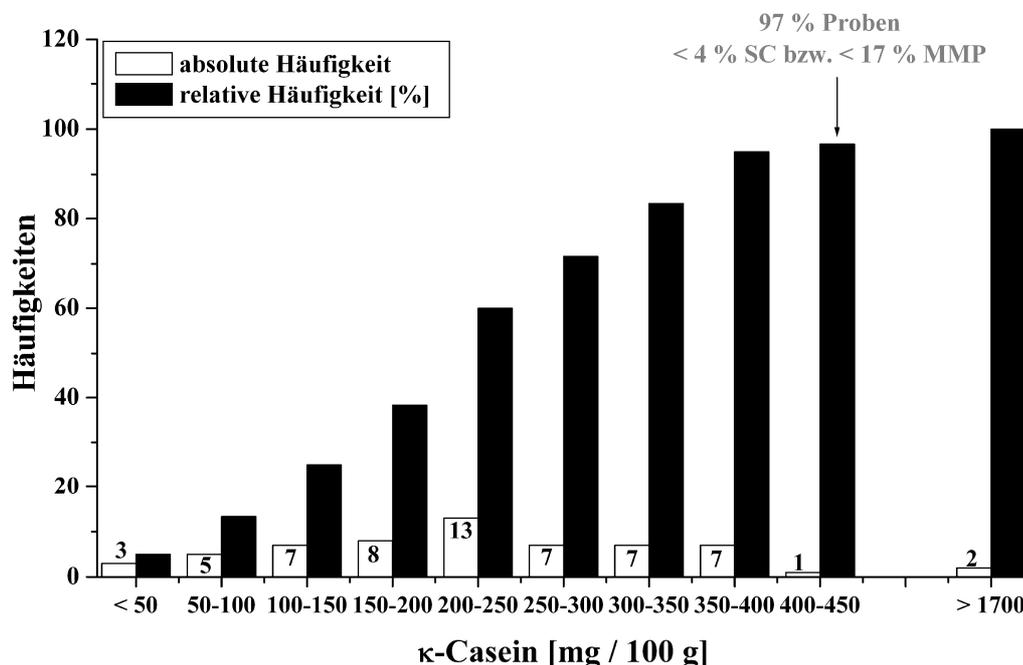
In der Abbildung **Abb. 4. 32** (rechts oben) sind die ermittelten  $\kappa$ -Casein-Gehalte der untersuchten Schmelzkäse und Rohwaren gezeigt. Die gewählten Box-Plot-Diagramme ermöglichen in diesem Zusammenhang eine sehr anschauliche Darstellung der Mittelwerte sowie der Spannweite und Streuung innerhalb der untersuchten Warengruppen. Ersichtlich wird, dass als  $\kappa$ -Casein-eintragende Rohwaren von Schmelzkäsen neben Säurecasein auch Milchpulverkonzentrat sowie Magermilchpulver in Frage kommen, in welchen  $\kappa$ -Casein in Konzentrationen von 3,4 bis 16,4 g / 100 g vorliegen kann. Im Gegensatz dazu ist durch Labcasein (Mittelwert von 173 mg / 100 g), welches vergleichbare Anteile an  $\kappa$ -Casein enthält wie Käse, kein erhöhter Eintrag an diesem zu Schmelzkäsen zu erwarten. Ebenso konnte in keinem der untersuchten Molkenpulver intaktes  $\kappa$ -Casein nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass bei Austausch von Käse durch Molkenpulver in Schmelzkäsen eine Absenkung des enthaltenen  $\kappa$ -Casein-Gehalts zu erwarten ist.

Anhand speziell hergestellter Modell-Schmelzkäse, in denen definierte Mengen an Käse durch Proteinzusätze ausgetauscht wurden, sollen die bislang theoretisch gewonnenen Erkenntnisse überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abb. 4. 32** (rechts unten) dargestellt.

Eindeutig nachweisbar ist eine stetige Erhöhung der  $\kappa$ -Casein-Gehalte in Schmelzkäsen, in denen definierte Mengen der Rohware Käse durch SC, MPC und MMP ersetzt wurden. Am stärksten ausgeprägt ist diese Erhöhung bei Zusatz von SC,

gefolgt von MPC und MMP. Bei einem Zusatz von 10 % SC zu Schmelzkäsen steigt das enthaltene  $\kappa$ -Casein beispielsweise von anfänglich etwa 80 mg / 100 g auf knapp 1000 mg / 100 g an. Ein SC- bzw. MPC-Zusatz zur Schmelzkäsematrix sollte bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (<1 %) anhand eines gestiegenen  $\kappa$ -Casein-Anteils nachweisbar sein. Die Empfindlichkeit gegenüber einem Zusatz an MMP ist hingegen deutlich geringer ausgeprägt. Ein eindeutiger Nachweis dieses ist erst ab Konzentrationen größer 4 % möglich. Im Gegensatz dazu ist ein Austausch von Käse durch LC mittels dieses chemischen Parameters nicht nachweisbar. Durch den Ersatz von Käse durch MP können die enthaltenen Anteile an  $\kappa$ -Casein sogar gesenkt werden.

Analysiert man die ermittelten  $\kappa$ -Casein-Gehalte der untersuchten Handelsproben in Abhängigkeit zur aufgetretenen Häufigkeit (Abb. 4. 34), so stellt man fest, dass in 97 % dieser Proben  $\kappa$ -Casein-Level kleiner 450 mg / 100 g vorliegen. Anteilig entspricht dies einem Zusatz von max. 4 % SC bzw. 17 % MMP. Innerhalb des Messbereiches von <50 bis 450 mg / 100 g kann eine Normalverteilung der  $\kappa$ -Casein-Gehalte der Schmelzkäse beobachtet werden. Ob diesen Schmelzkäsen nun SC, MPC oder MMP zugesetzt wurde, ist anhand dieser chemischen Messgröße nicht unterscheidbar. Den beiden Schmelzkäsen, welche 1700 mg / 100 g  $\kappa$ -Casein enthalten, wurde jedoch sehr wahrscheinlich nur Säurecasein anstelle von Käse zugesetzt.



**Abb. 4. 34** Verteilung der absoluten und relativen Häufigkeit an  $\kappa$ -Casein innerhalb der untersuchten kommerziellen Schmelzkäse. [Markierung repräsentiert 97 % der Proben, wobei der  $\kappa$ -Casein-Gehalt in diesen bis maximal 450 mg / 100 g reicht. Dies entspricht einem Zusatz von maximal 4 % Säurecasein (SC) bzw. 17 % Magermilchpulver (MMP)]

Anhand der dargelegten Messgröße CMP kann ein Zusatz von Molkenpulver zu Schmelzkäse in Modell- als auch Handelsproben eindeutig nachgewiesen werden.

Infolge von Käsesorten-abhängigen Schwankungen ist eine quantitative Bestimmung jedoch nur mit Einschränkungen möglich. Eine Beimischung von mehr als 1 % MP sollte jedoch fehlerfrei nachweisbar sein. Im Gegensatz dazu kann anhand des analysierten  $\kappa$ -Casein-Anteils nicht eindeutig auf einen Zusatz geschlossen werden, da dieses sowohl in SC, MPC und MMP enthalten ist. Der Nachweis von SC und MPC in Schmelzkäsen mit bekannter Rezeptur ist bereits bei Konzentrationen größer gleich 1 % möglich. MMP kann hingegen erst signifikant ab einer Beimischung von mehr als 4 % nachgewiesen werden.

### 4.3 Amadori-Produkte in Milcherzeugnissen

Im vorliegenden Kapitel wird auf ausgewählte Amadori-Produkte in Milch und Milcherzeugnissen eingegangen, welche in der frühen Phase der Maillard-Reaktion aus reduzierenden Aldosen und Aminokomponenten von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren gebildet werden (Finot et al. 1972). Je nachdem ob diese Reaktion an Lysinseitenketten oder N-terminalen Positionen der Proteinfraction abläuft, unterscheidet man  $\epsilon$ - oder  $\alpha$ -Amadori-Produkte. Die Quantifizierung dieser Produkte erfolgt indirekt nach definierter Salzsäurehydrolyse und anschließender chromatographischer Bestimmung der gebildeten Furosin ( $\epsilon$ -FMAS) und  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren ( $\alpha$ -FMAS) (Resmini et al. 1990, Penndorf et al. 2007). Mittels experimentell ermittelter Überföhrungsfaktoren kann nachfolgend auf die Ausgangsgehalte an Amadori-Produkten zurückgerechnet werden (Krause 2005, Maurer 2005). Ziel dieser durchgeföhrten Untersuchungen ist dabei die direkte Beantwortung der Frage: Inwieweit können Amadori-Produkte zur Beurteilung und Bestimmung der Rezeptur von Schmelzkäsen herangezogen werden? Dabei werden der reifungs- und sortenabhängige Eintrag dieser Produkte aus Käsen sowie die Beeinflussung deren Gehalte in Schmelzkäsen während der Schmelzprozessführung gesondert analysiert. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Amadori-Produkte bzw. der daraus nach saurer Hydrolyse gebildeten FMAS in Milchprodukten war zunächst eine vorherige Synthese von geeignetem Standardmaterial notwendig, welche nachfolgend kurz dargelegt ist.

#### 4.3.1 Synthese und Charakterisierung der Referenzsubstanzen

Die Synthese ausgewählter  $\alpha$ -FMAS wurde basierend auf Arbeiten von Krause (2005) durchgeföhrte. Die Auswahl der zu synthetisierenden  $\alpha$ -FMAS erfolgte dabei in Anlehnung an Arbeiten von Penndorf et al. (2007), welche zeigen konnte, dass in peptidhaltigen Milchprodukten – speziell hypoallergener Kindernahrung – neben Furosin, einer  $\epsilon$ -FMAS und dem klassischen Indikator für Erhitzungsprozesse in Milch und Milchprodukten (Erbersdobler et al. 2007), auch  $\alpha$ -FMAS des Lysins ( $\alpha$ -FM-Lys), Valins ( $\alpha$ -FM-Val), Isoleucins ( $\alpha$ -FM-Ile) und Leucins ( $\alpha$ -FM-Leu) nachgewiesen

werden konnten. Die genauen experimentellen Bedingungen zur Synthese der vier  $\alpha$ -FMAS sind Abschnitt 3.6.1 zu entnehmen. Die Charakterisierung der Syntheseprodukte erfolgte dabei mittels RP-HPLC-UV / DAD sowie LC-ESI-TOF-MS (siehe dazu Abschnitte 3.5.7 und 3.5.15.1). Exemplarisch sind in Abbildung 4.35 RP-HPLC Chromatogramme der synthetisierten Standards  $\alpha$ -FM-Lys,  $\alpha$ -FM-Val,  $\alpha$ -FM-Ile sowie  $\alpha$ -FM-Leu dargestellt. Die dazugehörigen Massen- sowie UV-Spektren, welche zur eindeutigen Identifizierung der Standardsubstanzen herangezogen wurden, sind den Abbildungen Abb. 4.36 bis 4.39 zu entnehmen.

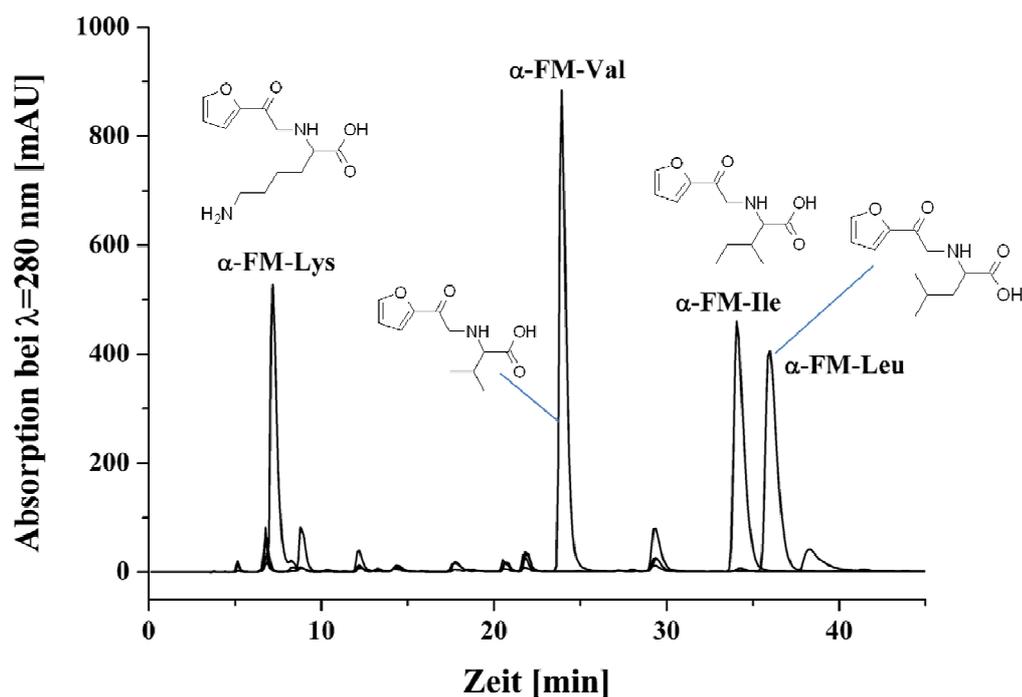


Abb. 4. 35 LC-MS Chromatogramme mit UV-Detektion bei 280 nm zur Charakterisierung der synthetisierten Standards  $\alpha$ -FM-Lys,  $\alpha$ -FM-Val,  $\alpha$ -FM-Ile und  $\alpha$ -FM-Leu [RP-18 Säule, 3.5.15.1].

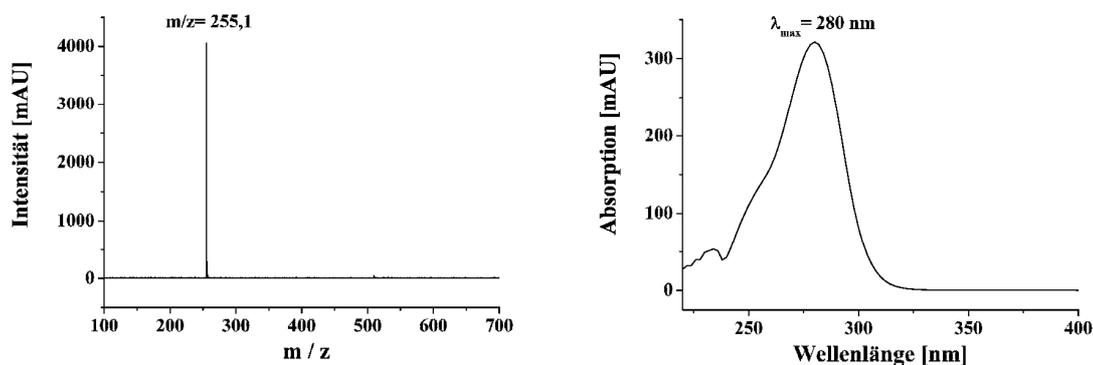


Abb. 4. 36 Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von  $\alpha$ -FM-Lysin ermittelt mittels LC-MS. [RP-18 Säule, 3.5.15.1]

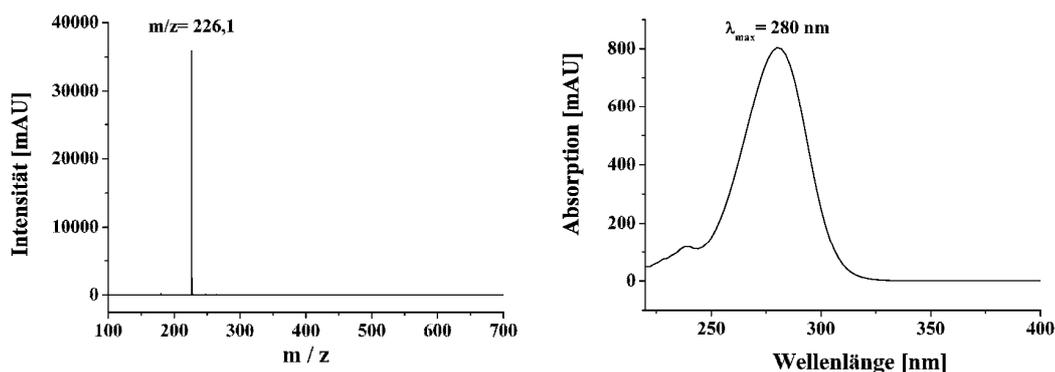


Abb. 4. 37 Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von  $\alpha$ -FM-Valin ermittelt mittels LC-MS. [RP-18 Säule, 3.5.15.1]

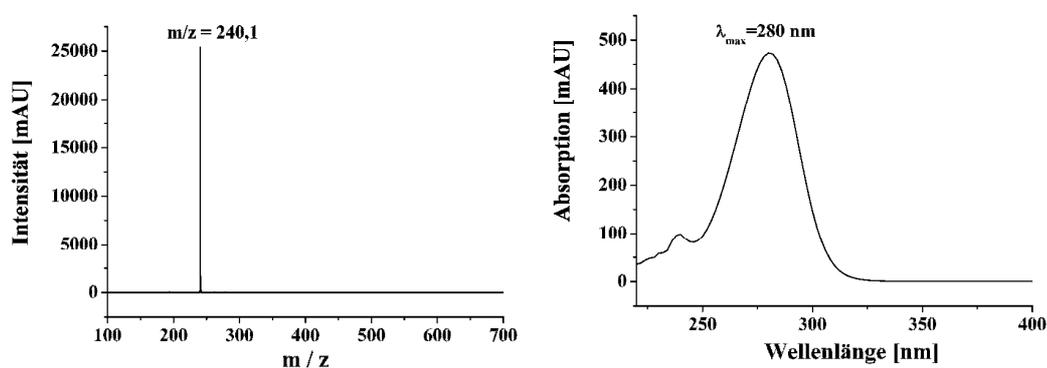


Abb. 4. 38 Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von  $\alpha$ -FM-Isoleucin ermittelt mittels LC-MS. [RP-18 Säule, 3.5.15.1]

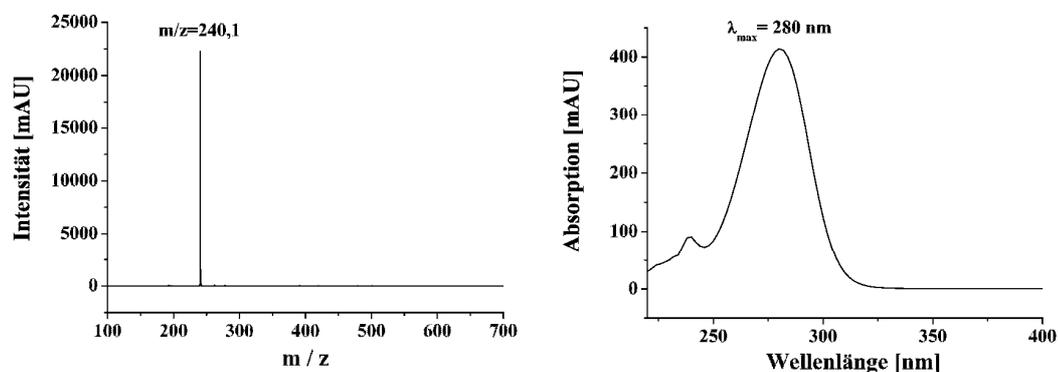


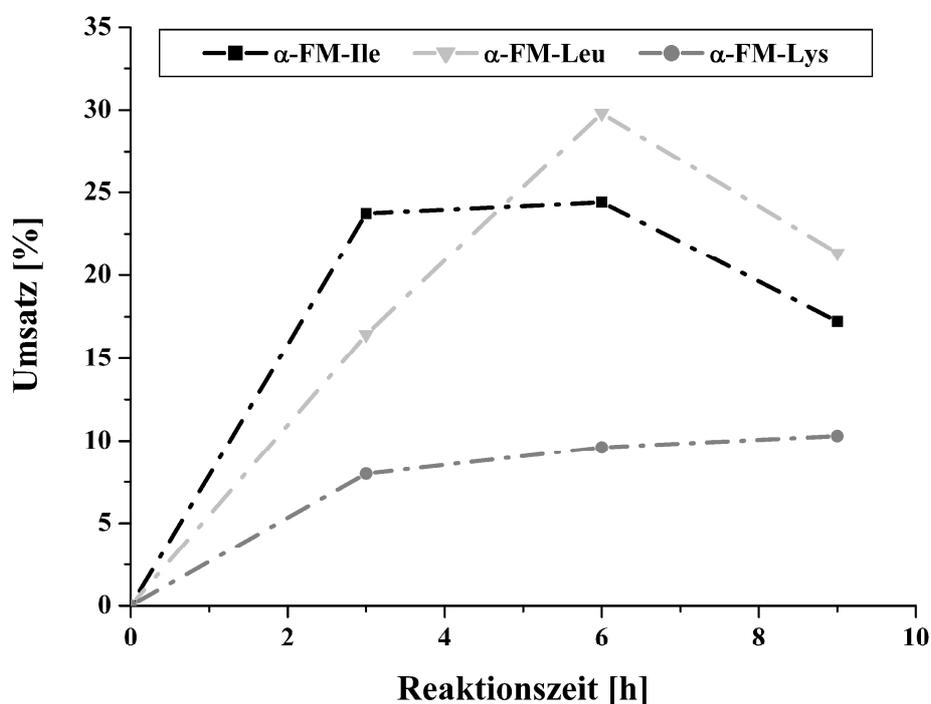
Abb. 4. 39 Massenspektrum (links) und UV-Spektrum (rechts) von  $\alpha$ -FM-Leucin ermittelt mittels LC-MS. [RP-18 Säule, 3.5.15.1]

Anhand der dargelegten Abbildungen kann eine erfolgreiche Synthese aller vier  $\alpha$ -FMAS nachgewiesen werden, wobei in Folge geringer Nebenprodukte auf eine hohe Reinheit der Standards geschlossen werden kann. Die analytisch mittels LC-ESI-TOF-MS ermittelten Molekulargewichte entsprechen dabei sehr gut den theoretisch berechneten Werten. Zusammengefasst dargestellt ist dies in **Tab. 4. 3**. Alle synthetisierten  $\alpha$ -FMAS weisen zudem das für Furane typische Wellenlängenmaximum bei 280 nm auf (Krause 2005).

**Tab. 4.3** Analytisch ermittelte Kenngrößen (Retentionszeit,  $\lambda_{\max}$ , m/z) der synthetisierten vier FMAS Standards ( $\alpha$ -FM-Lysin,  $\alpha$ -FM-Valin,  $\alpha$ -FM-Isoleucin,  $\alpha$ -FM-Leucin).

	Retentionszeit LC-MS System [min] RP-18	Retentionszeit HPLC System [min] RP-18	$\lambda_{\max}$ [nm]	m/z theoretisch	m/z analytisch ermittelt [MH <sup>+</sup> ]
$\alpha$ -FM-Lysin	7,2	8,1		254,1	255,1
$\alpha$ -FM-Valin	23,9	28		225,1	226,1
$\alpha$ -FM- Isoleucin	34,1	40,5	280	239,1	240,1
$\alpha$ -FM-Leucin	36,0	42,5		239,1	240,1

Um eine optimale Ausbeute an Standardsubstanz zu erzielen, wurden die Umsatzraten in Abhängigkeit der Reaktionszeit und unter Variation der reduzierenden Zuckerkomponente (Glucose, Lactose) für die entsprechenden Aminosäuren ermittelt. Exemplarisch sind in **Abb. 4.40** die analytisch ermittelten Ausbeuten der Synthese von  $\alpha$ -FM-Ile,  $\alpha$ -FM-Leu und  $\alpha$ -FM-Lys mit Glucose nach 3 bis 9 Stunden Reaktionszeit dargestellt.

**Abb. 4.40** Umsatzraten von  $\alpha$ -FM-Ile,  $\alpha$ -FM-Leu und  $\alpha$ -FM-Lys in Abhängigkeit der Reaktionszeit [Umsetzung mit Glucose bei 90°C unter Rückfluss in Methanol, Berechnung der Umsätze nach Säurehydrolyse (3.6.1) und RP-HPLC (3.5.7)].

Anhand der Kurven kann für die Reaktivität der Aminosäuren gegenüber Glucose folgende Reihenfolge festgelegt werden: Ile > Leu > Lys. Im Falle von  $\alpha$ -FM-Leu und

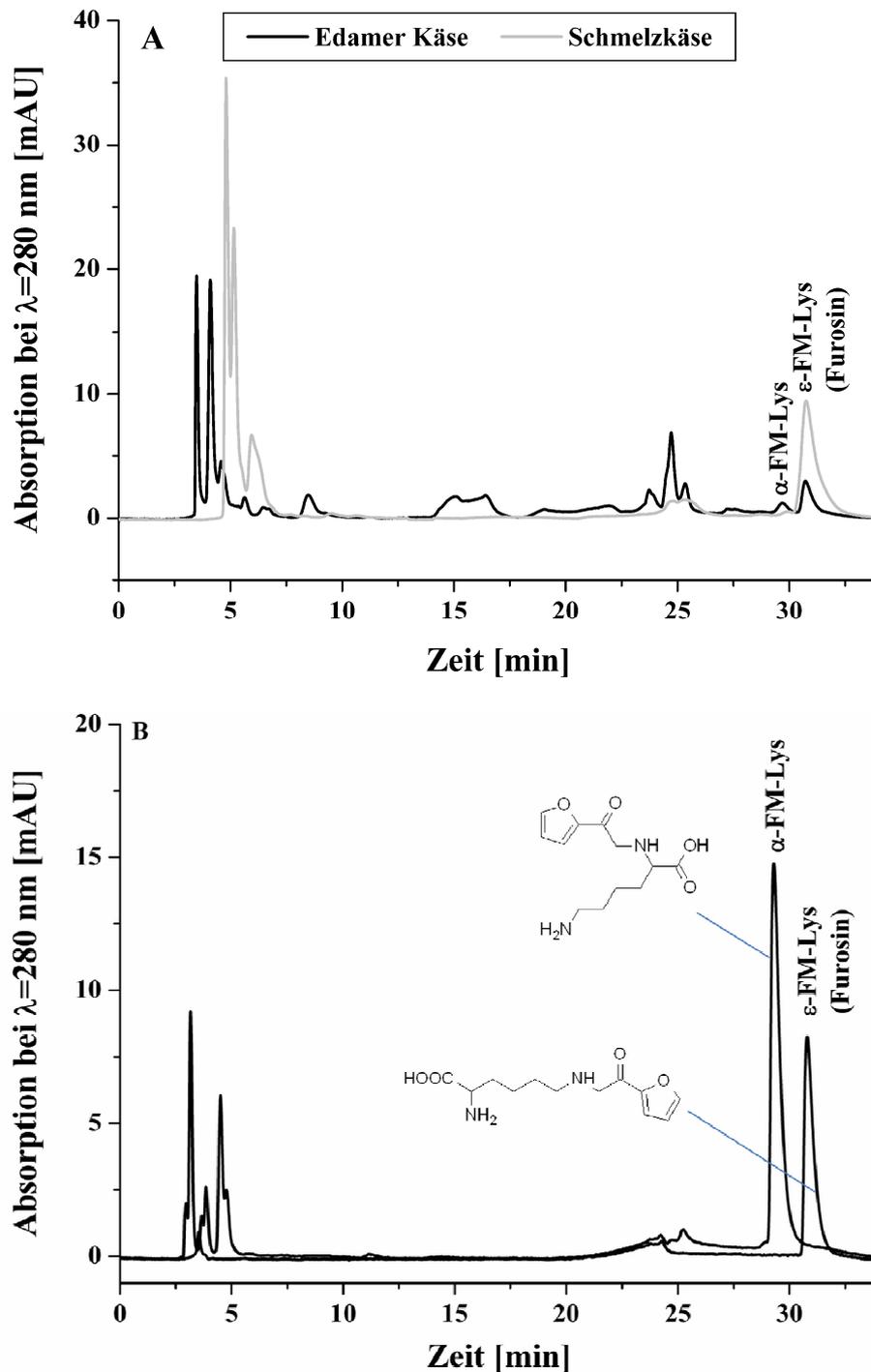
$\alpha$ -FM-Ile kann nach 6 Stunden Inkubation bereits eine Weiterreaktion bzw. ein Abbau der Amadori-Produkte im Reaktionsansatz zu fortgeschrittenen Produkten oder Endprodukten der Maillard-Reaktion vermutet werden. Dies geht auch mit einer Intensivierung der Braunfärbung der Reaktionsansätze mit steigender Inkubationsdauer einher. Vergleichbare Ergebnisse sind auch für  $\alpha$ -FM-Val zu verzeichnen. Die maximal erzielten Ausbeuten an FMAS bezogen zur eingesetzten Menge an Aminosäuren konnten für  $\alpha$ -FM-Val,  $\alpha$ -FM-Ile und  $\alpha$ -FM-Leu zu 24,4 % bis 43 % ermittelt werden. Im Gegensatz dazu ist auch nach 9-stündiger Inkubation kein Maximum an gebildeter Menge an  $\alpha$ -FM-Lys zu verzeichnen, wobei die maximal umgesetzte Menge mit nur 10 % deutlich unter denen der anderen  $\alpha$ -FMAS liegt.

### 4.3.2 Amadori-Produkte in Schmelzkäsen und Schmelzrohwaren

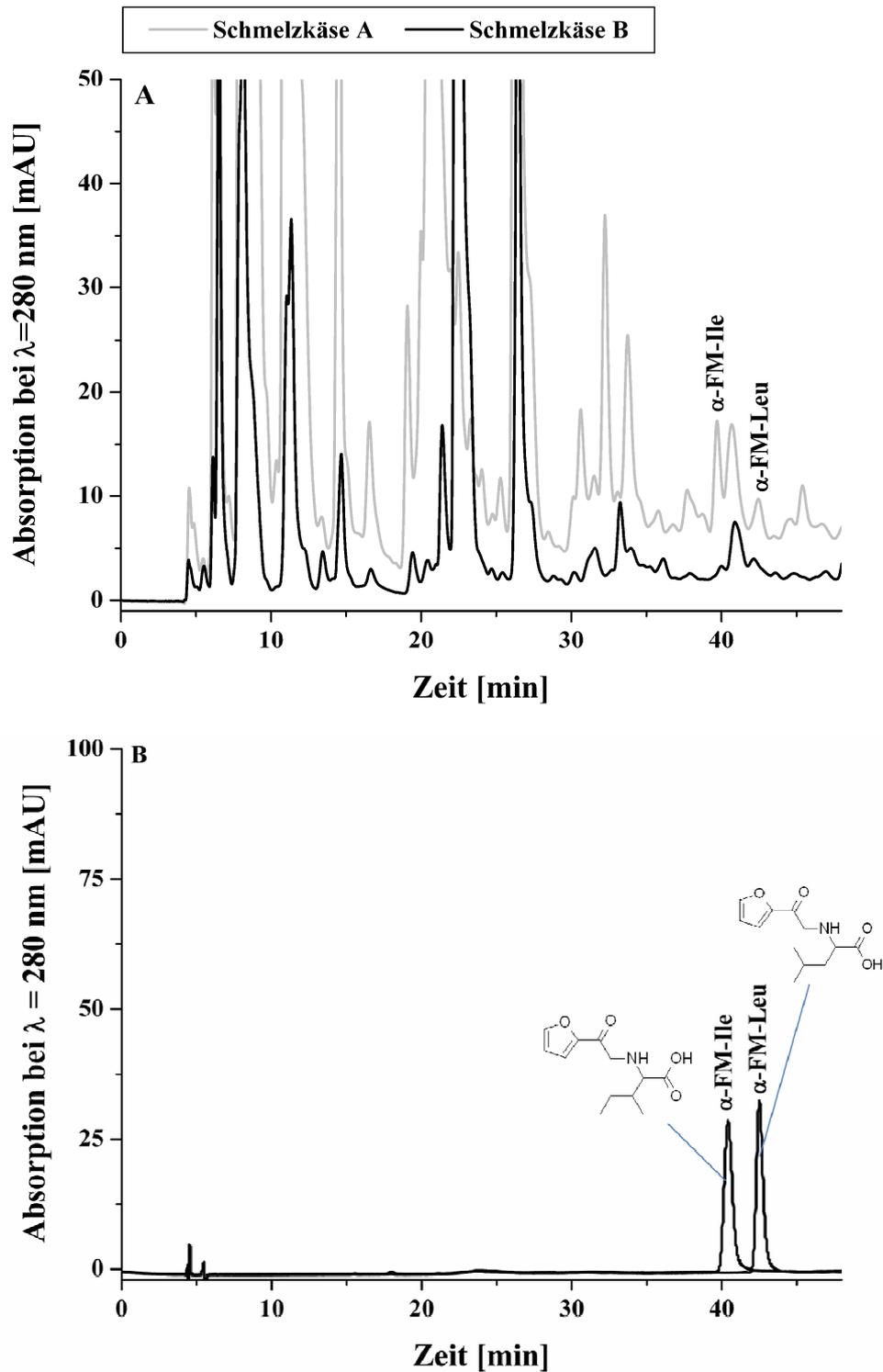
Zur Untersuchung der Amadori-Produkte in Schmelzkäsen und Rohwaren wurden zwei unterschiedliche chromatographische Trennsysteme eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte indirekt nach definierter Salzsäurehydrolyse und anschließender chromatographischer Bestimmung der gebildeten Furosin ( $\epsilon$ -FMAS) und  $\alpha$ -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren ( $\alpha$ -FMAS) (Resmini et al. 1990, Penndorf et al. 2007). Exemplarisch sind für beide Trennsysteme ausgewählte Chromatogramme einer Käse- und Schmelzkäseprobe in den **Abb. 4. 41** und **Abb. 4. 42** gezeigt.

Anhand Abbildung 4.41 (RP-8-Säule) kann in den untersuchten Milchprodukten eindeutig bei einer Retentionszeit von 31 min Furosin ( $\epsilon$ -FM-Lys) identifiziert werden, welches als klassischer Marker von Erhitzungsprozessen in prozessierten Lebensmitteln gilt (Erbersdobler et al. 2007). Die Identifizierung erfolgte dabei anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des UV-Spektrums sowie Massenspektrums mit denen eines kommerziell erhältlichen Standards. Unmittelbar zuvor kann im Chromatogramm ein weiterer Peak detektiert werden. Dieser konnte anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des UV- und Massenspektrums mit einer synthetisierten Standardsubstanz eindeutig als  $\alpha$ -FM-Lys (m/z 254,1) identifiziert werden. Bisher war es nur gelungen diese Verbindung in Hydrolysaten hypoallergener Säuglingsnahrung nachzuweisen (Penndorf et al. 2007). Beide Substanzen konnten sowohl in allen untersuchten Schmelzkäseprodukten als auch in allen analysierten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4.42 das Chromatogramm zweier Schmelzkäseproben, welche mittels einer RP-18 Säule analysiert wurden. Im Abschnitt des Chromatogrammes von etwa 39 bis 42 min konnten die zwei, in oben dargestellter Abbildung (**Abb. 4. 42 A**), markierten Peaks als  $\alpha$ -FM-Ile (m/z 240,3) und als  $\alpha$ -FM-Leu (m/z 240,3) identifiziert werden. Die eindeutige Identifizierung dieser Substanzen konnte vergleichbar zum  $\alpha$ -FM-Lys

anhand des Vergleichs von Retentionszeit, UV-Spektrum und Massenspektrum mit denen eines synthetisierten Standards durchgeführt werden. Beide FMAS wurden sowohl in den untersuchten Schmelzkäseprodukten als auch in den analysierten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung nachgewiesen und quantifiziert.



**Abb. 4. 41** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von  $\alpha$ -FM-Lysin und  $\epsilon$ -FM-Lysin (Furosine) in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung mittels einer RP-8 Phase. [Darstellung übereinandergelagerter Chromatogramme eines Schmelzkäse sowie einer Käseprobe (A) / (B) Darstellung eines kommerziell erhältlichen Furosinstandards sowie eines nach Inkubation von Lactose und  $\epsilon$ -N-Acetyllysin isolierten  $\alpha$ -FM-Lysinstandards.]



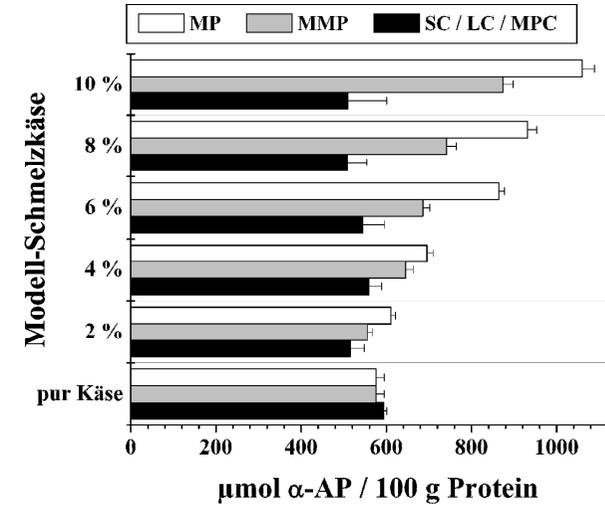
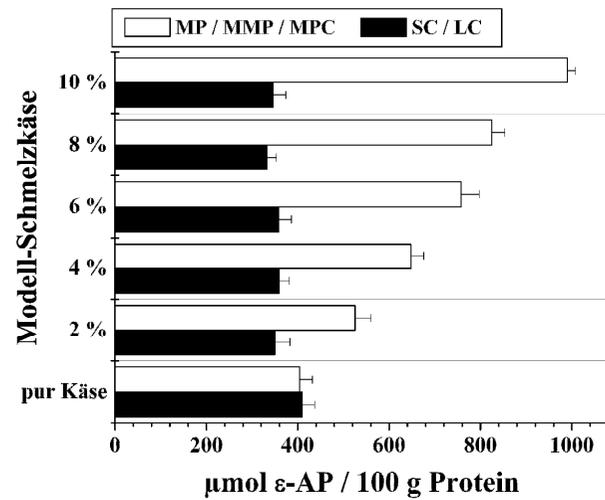
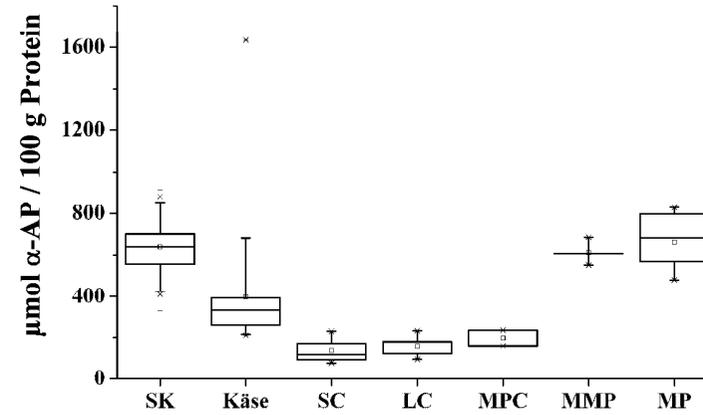
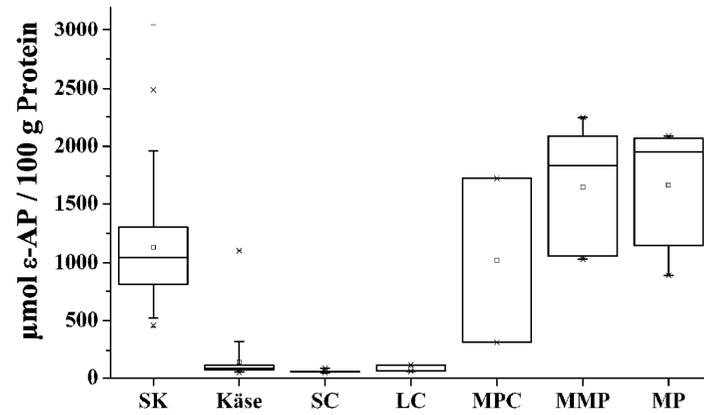
**Abb. 4.42** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von  $\alpha$ -FM-Isoleucin und  $\alpha$ -FM-Leucin in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung mittels einer RP-18 Phase. [Darstellung des Chromatogrammes zweier Schmelzkäseproben (A) / (B) Darstellung der nach Inkubation von Lactose mit Isoleucin und Leucin isolierter  $\alpha$ -FM-Referenzsubstanzen.]

Der Nachweis der  $\alpha$ -FMAS des Lysins, Isoleucins und Leucins steht im Einklang mit bereits publizierten Daten zu gefundenen Aminosäurederivaten in Hydrolysaten von hypoallergener Säuglingsnahrung (Penndorf et al. 2007). Die von Penndorf et al. (2007)

ebenso beschriebenen Derivate des Valins und Alanins konnten in den untersuchten Schmelzkäseproben jedoch nicht nachgewiesen werden. In Folge der sehr komplexen Analytik und der vielen im Chromatogramm ersichtlichen, störenden Substanzen ist der Nachweis dieser Aminosäurederivate analytisch schwierig. Das Vorhandensein weiterer  $\alpha$ -FMAS in Hydrolysaten von peptidhaltigen Milchprodukten ist dennoch denkbar. Nachfolgende Analysen beschränken sich jedoch nur auf den Nachweis und die Quantifizierung von Furosin und der  $\alpha$ -FMAS des Lysins, Isoleucins und Leucins in Schmelzkäsen und den untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung. Zur Quantifizierung dieser Aminosäurederivate in den Hydrolysaten dieser Produkte wurde aufbauend auf Arbeiten von Sanz et al. (2000, 2001) ein externer kommerziell erhältlicher Standard von Furosin eingesetzt. Anhand dieser Arbeiten konnte der Einsatz von Furosin zur Quantifizierung von aliphatischen  $\alpha$ -FMAS bereits etabliert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse der Analyse von Schmelzkäsen und Rohwaren zu deren Herstellung sind, berechnet als  $\epsilon$ -Amadori-Produkt ( $\epsilon$ -AP) und als Summenparameter der  $\alpha$ -Amadori-Produkte ( $\alpha$ -AP), Abbildung 4.43 zu entnehmen. Als Berechnungsgrundlage wurden hierbei experimentell ermittelte Überführungsfaktoren angewendet, wobei diese auf der reproduzierbaren Umsetzung einer bestimmten Menge an AP zur korrespondierenden FMAS unter konstanten Bedingungen der Hydrolyse beruhen (Krause et al. 2003, Finot et al. 1972). Als Überführungsfaktoren zur Berechnung als Lactulosylderivate wurden 2 und 9,4 für  $\epsilon$ - bzw.  $\alpha$ -FM-Lys, 9,7 für  $\alpha$ -FM-Ile sowie 8,2 für  $\alpha$ -FM-Leu eingesetzt (Tab. 8. 3) (Penndorf et al. 2007).

In den untersuchten handelsüblichen Schmelzkäsen wurden  $\epsilon$ -Amadori-Produktgehalte ( $\epsilon$ -AP) von durchschnittlich 1100  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein ermittelt (Abb. 4. 43 links oben). Betrachtet man die Minimum- (445  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein) und Maximumwerte (2490  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein) dieses Datensatzes so ist erkennbar, dass anhand dieser Messgröße eine Einteilung der Schmelzkäse in homogene Untergruppen mit abweichenden Gehalten an  $\epsilon$ -AP prinzipiell vorgenommen werden kann. Im Vergleich zu bereits publizierten Ergebnissen von 20 bis 600 mg Furosin / 100 g Protein konnten anhand der eigens analysierten handelsüblichen Schmelzkäseproben mit 57 bis 388 mg / 100 g Protein vergleichbare Gehalte an Furosin gefunden werden (Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2006, Acquistucci et al. 1996). Im Vergleich dazu fallen mit nur 639  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein die in denselben Proben enthaltenen mittleren Mengen an  $\alpha$ -AP, welche sich aus den Aminosäurederivaten des  $\alpha$ -Lysins, Leucins und Isoleucins zusammensetzen, deutlich geringer aus. Die ermittelten Werte an  $\alpha$ -AP schwanken zudem zwischen 331 bis 915  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein.



**Abb. 4. 43 links oben:**  $\epsilon$ -AP vom Lysin in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %)

**links unten:** Gemittelte  $\epsilon$ -AP-Gehalte vom Lysin in Modell-Schmelzkäsen mit variierenden Gehalten an den Proteinzusätzen (0 % - pur Käse bis 10 %, n=3)

[SK – Schmelzkäse, MMP – Magermilchpulver, MP – Molkenpulver, MPC – Milchproteinkonzentrat, SC - Säurecasein, LC – Labcasein]

**rechts oben:** Summenparameter der  $\alpha$ -AP von Isoleucin und Leucin in Schmelzkäsen und Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung (Quantile: 25 % / 75 %, Whisker: 5 % / 95 %)

**rechts unten:** Gemittelte  $\alpha$ -AP – Gehalte (Ile / Leu) von Modell-Schmelzkäsen)

Zur Beurteilung, welche der eingesetzten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung die im Endprodukt gefundenen Gehalte an  $\epsilon$ - sowie  $\alpha$ -AP beeinflussen, wurden handelsübliche Käse, Säurecaseine, Labcaseine, Molkenpulver sowie Milchpulverkonzentrate und Magermilchpulver mittels der im Kapitel 3.5.7 dargelegten Analysenvorschrift untersucht. Die für SC, LC und Käse erhaltenen durchschnittlichen  $\epsilon$ -AP-Gehalte liegen mit 61, 79 bzw. 98  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  (16 bis 35 mg  $\epsilon$ -AP / 100 g Protein) deutlich unter dem für handelsübliche Schmelzkäse bestimmten Mittelwert an  $\epsilon$ -AP. Die für Milcheiweißerzeugnisse ermittelten Werte sind dabei mit bereits publizierten Gehalten von n.d. bis 250 mg / 100 g Protein sehr gut vergleichbar (Resmini et al. 1990, Ennis et al. 1999, Tirelli et al. 1995). Käse weisen zudem eine ausgeprägte Tendenz zu schwankenden Werten an dieser Messgröße auf (50 bis 323  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ), wobei dies in Abhängigkeit der Käsesorte aufzutreten scheint. Ein abweichend hoher Wert von etwa 1100  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ , welcher im Box Plot Diagramm (Abb. 4. 43, oben links) als Ausreißer gekennzeichnet ist, wurde in einem enzymatisch und mikrobiell schnell gereiften Käse (EMC, K9 siehe Tab. 3. 9) gefunden. In diesem bilden sich im Zuge der Herstellung besonders schnell Peptide und freie Aminosäuren, wobei speziell in dieser Sorte mit 5,75 g Lactose / 100 g TM zudem auch sehr hohe Gehalte an reduzierendem Zucker vorliegen. Die im Zuge der Maillard-Reaktion benötigten Ausgangsstoffe – freie Aminogruppen und reduzierende Zucker – sind somit in ausreichend großer Menge enthalten um die Bildung von  $\epsilon$ -AP (1100  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) als auch  $\alpha$ -AP (1634  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) zu gewährleisten. Für detaillierte Ausführungen hierzu sei auf die folgenden Kapitel 4.3.3.1 sowie 4.3.3.2 verwiesen, welche sich ausführlich mit der Thematik von Amadori-Produkten in Käsen auseinandersetzen. Ein Ersatz von Käserohware in Schmelzkäsen durch Säurecasein und / oder Labcasein sollte, in Folge der geringen  $\epsilon$ -AP-Gehalte in diesen Proteinpulvern keinen allzu großen Einfluss auf die im Schmelzkäseerzeugnis verbleibende Menge an AP haben. Die sehr niedrigen Gehalte an  $\epsilon$ -AP in diesen Milcheiweißerzeugnissen sind dabei bedingt durch die während der Herstellung nahezu vollständige Abtrennung der reduzierenden Zucker.

Im Gegensatz dazu werden anteilig im Schmelzkäse enthaltene Beimischungen von MP, MMP und MPC zur Erhöhung des Levels an  $\epsilon$ -AP führen, da der durchschnittlich in diesen Proben enthaltene Wert mit 1023  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  für MPC (260 mg / 100 g Protein) sowie mit über 1600  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  für MMP und MP (418 mg / 100 g Protein) deutlich über denen durch Käse, SC und LC eintragbaren Mengen an  $\epsilon$ -AP liegt. Durch die Temperaturbelastung während der Trocknungsprozesse unter Anwesenheit reduzierender Zucker tritt die Maillard-Reaktion im Vergleich zu SC und LC in diesen Proteinzusätzen in verstärktem Maße auf. Mit 124 bis zu 1872 mg / 100 g wurden in ausgewählten MP zum Teil sogar noch deutlich höhere Gehalte an  $\epsilon$ -AP nachgewiesen (Nicoletti et al. 2000, Cattaneo et al. 2009).

Mittels speziell hergestellter Modell-Schmelzkäserezepturen, in denen definiert Käse durch die Proteinpulver SC, LC, MPC, MMP sowie MP ersetzt wurde, sollten die anhand der Handelsproben aufgestellten Thesen überprüft werden. Die Ergebnisse hierzu zeigt **Abb. 4. 43** unten links (Seite 157). Hohe Anteile an Milcheiweißerzeugnissen (SC, LC) ziehen dabei eine Senkung des  $\epsilon$ -AP-Gehaltes in diesen Proben nach sich. Dies kann jedoch nur als Trend betrachtet werden, da die in den Modell-Schmelzkäsen mit Milcheiweißzusatz ermittelten Werte an  $\epsilon$ -AP als nicht signifikant verschieden zum Referenz-Schmelzkäse (nur Käse) angesehen werden können. Im Gegensatz dazu führen MMP, MPC und MP Zusätze in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen bereits ab Konzentrationen von 1 bis 2 % zu deutlich erhöhten  $\epsilon$ -AP-Gehalten. Steigert man diese Beimischung auf bis zu 10 %, so können beispielsweise mit einem MP-Zusatz  $\epsilon$ -AP-Gehalte von bis zu 1000  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein nachgewiesen werden, was einer Steigerung um 250 % entspricht. Damit erlangt man jedoch nur knapp die durchschnittlich in den untersuchten handelsüblichen Schmelzkäseproben gefundenen  $\epsilon$ -AP-Level. Würde man versuchen diese teilweise deutlich höheren Gehalte mit einem Zusatz an MMP, MPC oder MP zu erreichen, so bräuchte man bis zu 25 g dieser Zusätze pro 100 g Schmelzkäseerzeugnis. Technologisch ist dies sicher realisierbar. Die Einhaltung einer definierten Qualität und Textur dieser Produkte wird durch die hohen Anteile an Lactose und Molkenproteinen jedoch zunehmend erschwert (Merkenich et al. 1996). Eine direkte Beeinflussung der in diesen Produkten gefundenen AP-Gehalte wird somit vermutlich nicht nur durch die eingesetzte Schmelzrohware, sondern auch durch die während des Schmelzprozesses angewandten, hohen Temperaturen hervorgerufen (Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2004). Inwieweit die AP dabei direkt über die Rohware eingetragen werden bzw. in welchen Mengen diese während des Schmelzvorganges durch lactosehaltige Rohwaren neu gebildet werden, ist dabei bislang noch wenig erforscht worden. Beide Szenarien sind für Schmelzkäse mit Milch- und Molkenpulver-Zusatz jedoch wahrscheinlich. Ausführlicher diskutiert wird dieser Sachverhalt nochmals im Kapitel 4.3.2.1.

Anhand der in den untersuchten Schmelzkäsen und Rohwaren ermittelten Mengen an  $\alpha$ -AP können größtenteils übereinstimmende Beobachtungen im Vergleich zu  $\epsilon$ -AP-Gehalten gemacht werden (siehe dazu **Abb. 4. 43** links und rechts oben). Neben der Käserohware, welche einen  $\alpha$ -AP-Gehalt von 211 bis 681  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein enthalten kann, sind auch in MMP und MP mittlere bis sehr hohe Anteile an N-terminal modifizierten Aminosäurederivaten zu finden. Die in diesen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung enthaltenen Mengen an  $\alpha$ -AP reichen dabei, abhängig von der im Produkt enthaltenen Menge an freien Aminogruppen und reduzierenden Zuckern, von 481 bis 830  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein. Im Gegensatz dazu weisen SC und LC mit 47 bis 113  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein weitaus geringere Mengen an  $\alpha$ -AP auf. Mit Ausnahme von

MPC, welche durchschnittlich nur 200  $\mu\text{mol}$   $\alpha\text{-AP}$  / 100 g Protein enthalten, sind alle weiteren Ergebnisse der  $\alpha\text{-AP}$  vom Trend her vergleichbar mit denen der  $\varepsilon\text{-AP}$ .

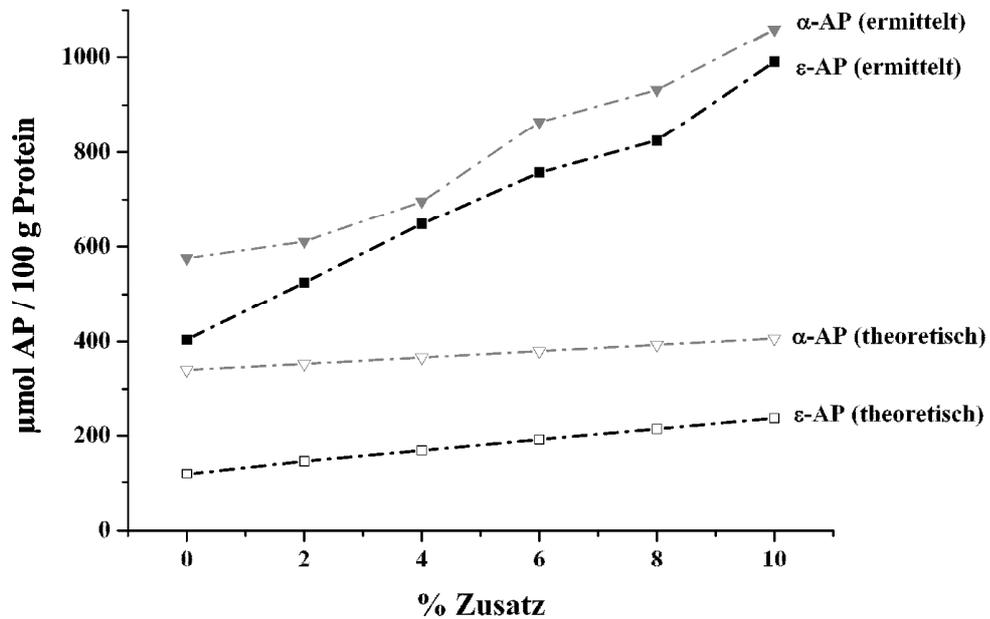
Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Anschluss Modell-Schmelzkäse mit ansteigenden Gehalten an den oben genannten Proteinzusätzen (0 bis 10 %) hergestellt (Abb. 4. 43 unten rechts). Im Falle eines SC- oder LC-Zusatzes sinken die prozentualen Gehalte an  $\alpha\text{-AP}$ , vergleichbar zu den  $\varepsilon\text{-AP}$ , dabei nur gering bis nicht ab. MPC, welche geringere Modifizierungsgrade der N-terminalen Aminosäuren aufweisen, führen ebenso zu keinen signifikanten Veränderungen der Level an  $\alpha\text{-AP}$  im Vergleich zur Referenzprobe ohne Proteinzusatz. Im Gegensatz dazu wurden sowohl für MMP- als auch MP-haltige Modell-Schmelzkäse ansteigende  $\alpha\text{-AP}$ -Gehalte im Vergleich zur jeweiligen Referenz-Schmelzkäseprobe, welche nur Käserohware enthält, beobachtet. Der  $\alpha\text{-AP}$ -Gehalt steigt dabei um 150 bzw. 180 % bei einem Zusatz an 10 % molkenproteinhaltigen Zusätzen (MMP, MP) an. Eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Referenzprobe ist dabei jedoch erst ab einer Zumischung von 3 bis 4 % molkenproteinhaltiger Rohwaren ersichtlich. Inwieweit  $\alpha\text{-AP}$  während der Herstellung von Schmelzkäse dabei „neu“ entstehen oder nur durch die Rohware eingetragen werden, ist ebenso zu beachten. Zur Klärung dieser Frage sei auf Abschnitt 4.3.2.1 verwiesen.

Eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen kann anhand der analysierten  $\varepsilon\text{-AP}$  und  $\alpha\text{-AP}$  durchgeführt werden. Ein erhöhter  $\varepsilon\text{-AP}$ - als auch  $\alpha\text{-AP}$ -Gehalt in Schmelzkäseerzeugnissen weist dabei auf den vermehrten Ersatz von Käserohware durch molkenproteinhaltige Zusätze (MMP, MP) hin. Sehr niedrige Level an  $\varepsilon\text{-AP}$  als auch  $\alpha\text{-AP}$  deuten hingegen vielmehr auf den Zusatz an Milcheiweißerzeugnissen in Schmelzkäsematrices hin. Vergleichbar zu den meisten bislang diskutierten Messgrößen ist auch anhand der Amadori-Produkte keine eindeutige Abgrenzung der Rohwaren Käse, SC, LC, MPC, MMP sowie MP in Schmelzkäsematrices möglich. Die Modifizierung der Seitenketten ( $\varepsilon\text{-AP}$ ) von Peptiden und Proteinen läuft dabei im Vergleich zur N-terminalen Modifizierung ( $\alpha\text{-AP}$ ) in Schmelzkäsen und den zur Herstellung eingesetzten Proteinpulvern (MMP, MPC, MP) bevorzugt ab. In Käsen und Milcheiweißerzeugnissen dominieren hingegen eher  $\alpha\text{-AP}$ . Ernährungsphysiologisch betrachtet ist die in Schmelzkäsen ermittelte Blockierung der essentiellen Aminosäuren mit nur 0,05 bis maximal 4,2 % im Vergleich zu stärker thermisch behandelten Milchpulvern, welche Modifizierungsgrade von bis zu 30 % erreichen können (Henle et al. 1995), zu vernachlässigen.

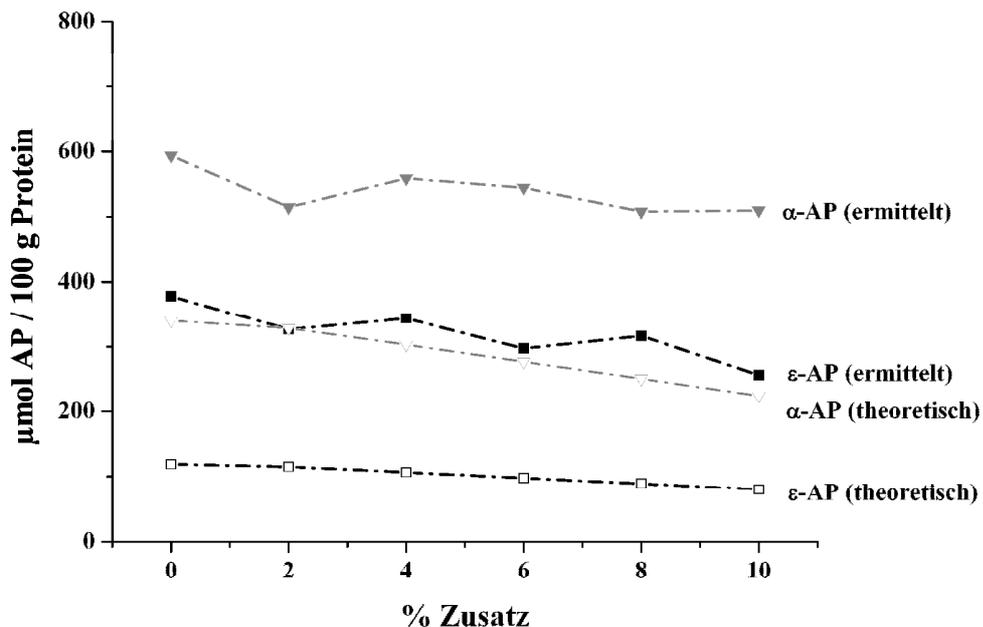
#### 4.3.2.1 Einflüsse auf den Amadori-Produktgehalt in Schmelzkäsen

Zur Klärung der Problematik inwieweit  $\varepsilon\text{-AP}$  und  $\alpha\text{-AP}$  während der Herstellung von Schmelzkäse „neu“ gebildet werden können oder aber allein nur durch die

Rohwaren ins Produkt eingetragen werden, wurden abschließend für molkenproteinhaltige und molkenproteinfreie Zusätze die theoretischen berechneten (Berechnungsgrundlage hierfür ist der mittlere, ermittelte Gehalt an AP in der jeweiligen Rohware) mit den analytisch ermittelten Gehalten an  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -AP verglichen (Abb. 4.44, Abb. 4.45).



**Abb. 4.44** Vergleich der analytisch ermittelten und theoretisch berechneten  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -AP-Gehalte (Summenparameter der  $\alpha$ -AP aus Lysin, Isoleucin und Leucin) in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen mit Zusatz an Molkenpulver (MP).



**Abb. 4.45** Vergleich der analytisch ermittelten und theoretisch berechneten  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -AP-Gehalte (Summenparameter der  $\alpha$ -AP aus Lysin, Isoleucin und Leucin) in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen mit Zusatz an Säurecasein (SC).

Klassische Faktoren, welche den Ablauf der Maillard-Reaktion in Schmelzkäsen beeinflussen, sind dabei der pH-Wert, der  $a_w$ -Wert, die Herstellungs- und Lagerungsprozesse sowie die Konzentration an Lactose und Protein (Bley et al. 1985).

In beiden untersuchten Modell-Schmelzkäsereihen können zwischen den theoretisch errechneten und den analytisch bestimmten Werten an  $\alpha$ - als auch  $\epsilon$ -AP deutliche Unterschiede wahrgenommen werden. Die theoretisch berechneten AP, welche den durch die Rohware absolut eingetragenen Anteil an AP darstellen, erklären sowohl für die Modell-Schmelzkäse mit MP (Abb. 4.44) als auch SC (Abb. 4.45) nur jeweils etwa 30 % der analytisch ermittelten Gehalte. Die restlichen 70 % werden demzufolge in beiden Produktgruppen erst während der Herstellung in Folge einer hohen Temperaturbelastung gebildet. Im Falle der  $\alpha$ -AP ist die Diskrepanz zwischen theoretisch eingetragener Menge und analytisch ermittelter Menge an N-terminalen Aminosäurederivaten etwas geringer ausgeprägt. Die Anteile an neu gebildeten  $\alpha$ -AP betragen in diesen Proben nur 40 bis 62 % für MP-haltige bzw. 43 bis 56 % für SC-haltige Modell-Schmelzkäse. Deutlich verschieden sind die beiden Modell-Schmelzkäsereihen hingegen in den Anstiegen der dargestellten Graphen. Im Falle eines MP-Zusatzes sind steigende  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -AP Gehalte, in Abhängigkeit der zugesetzten Menge an MP, zu verzeichnen (Abb. 4.44). Im Gegensatz dazu sinken die in SC-haltigen Proben nachgewiesenen Mengen an  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -AP bei steigendem Anteil an Proteinzusatz kontinuierlich (Abb. 4.45). Ursächlich hierfür sind zum Einen die in den Produkten enthaltenen Ausgangsmengen an AP, wobei MP mit durchschnittlich 660  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -AP (Summe berechnet aus Derivaten des Lysins, Leucins und Isoleucins) und 1600  $\mu\text{mol}$   $\epsilon$ -AP pro 100 g Protein um den Faktor 5 bis 27 höhere Gehalte als SC aufweist (61  $\mu\text{mol}$   $\epsilon$ -AP / 100 g Protein bzw. 138  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -AP / 100 g Protein). Zum Anderen sinkt durch Zusatz an SC der Gehalt an Lactose im Schmelzkäse kontinuierlich von anfänglich 3,1 auf 1,8 g / 100 g TM ab (Tab. 4.4). Im Gegensatz dazu steigt der Lactosegehalt von Schmelzkäsen mit MP-Zusatz im Vergleich zur Referenzprobe ohne MP-Zusatz auf bis zu 15,5 g / 100 g TM bei einem 10%igem Zusatz an diesem Proteinpulver an. Der reduzierende Zucker stellt dabei neben freien Aminogruppen von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren einen der Ausgangsstoffe der Maillard-Reaktion dar, wobei diese in Folge der hohen Temperaturen während der Schmelzkäseproduktion vermehrt abläuft.

**Tab. 4.4** Lactosegehalte der untersuchten Modell-Schmelzkäse mit Molkenpulver- und Säurecasein-Zusatz [g / 100 g TM].

	pur Käse	2 %	4 %	6 %	8 %	10 %
<b>Molkenpulver</b>	3,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1	5,5 ± 0,1	8,0 ± 0,1	11,4 ± 0,1	15,5 ± 0,1
<b>Säurecasein</b>	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1

Als limitierender Parameter zur Bildung von  $\alpha$ -AP kann in den untersuchten Modell-Schmelzkäsen neben dem Gehalt an reduzierenden Zuckern außerdem der Gehalt an vorhandenen reaktiven N-terminalen Aminogruppen, welche in Folge proteolytischer Prozesse vor allem in der Käserohware auftreten, genannt werden. Ein Zusatz an MP als auch an SC führt in den Modell-Schmelzkäsen zu einer Abnahme dieser Reaktionspartner. Anhand der Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson soll nachfolgend der Einfluss der Ausgangsstoffe Lactose und reaktiver Aminogruppen auf die Bildung von  $\epsilon$ -AP als auch  $\alpha$ -AP untersucht werden. Die Korrelationsanalyse stellt hierbei ein vielseitiges und flexibles Verfahren zur Beschreibung und Erklärung von Abhängigkeiten und Zusammenhängen zwischen verschiedenen Merkmalen eines Datensatzes dar. Ein vollständig linearer Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird bei  $|r| = 1$  beschrieben. Graphisch gesehen bilden die x, y-Koordinaten der Variablen in diesem Fall eine Gerade. Ein Wert von  $r = 0$  besagt, dass keine lineare Korrelation zwischen den Variablen besteht. Die berechneten Korrelationskoeffizienten dazu sind **Tab. 4.5** zu entnehmen.

**Tab. 4.5** Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der  $\alpha$ -AP (Summenparameter aus Lysin, Leucin und Isoleucin) sowie  $\epsilon$ -AP der untersuchten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Gehalten (0 bis 10 %) an Proteinzusätzen im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freier Aminosäuren. [\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; bivariat, Korrelationskriterien: PKK > 0,6 – 0,8 – gute und PKK > 0,8 sehr hohe Korrelation, PKK < -0,8 sehr hohe und PKK < -0,6 gute indirekte Korrelation, Werte zwischen 0,6 und -0,6 geringe bis keine ausgeprägte Korrelation]

	Lactose	NPN	WLN	freie AS
$\epsilon$ -AP von Lysin	0,600**	-0,498**	0,278	-0,046
Summenparameter der $\alpha$ -AP	0,940**	-0,185	0,384*	0,586**

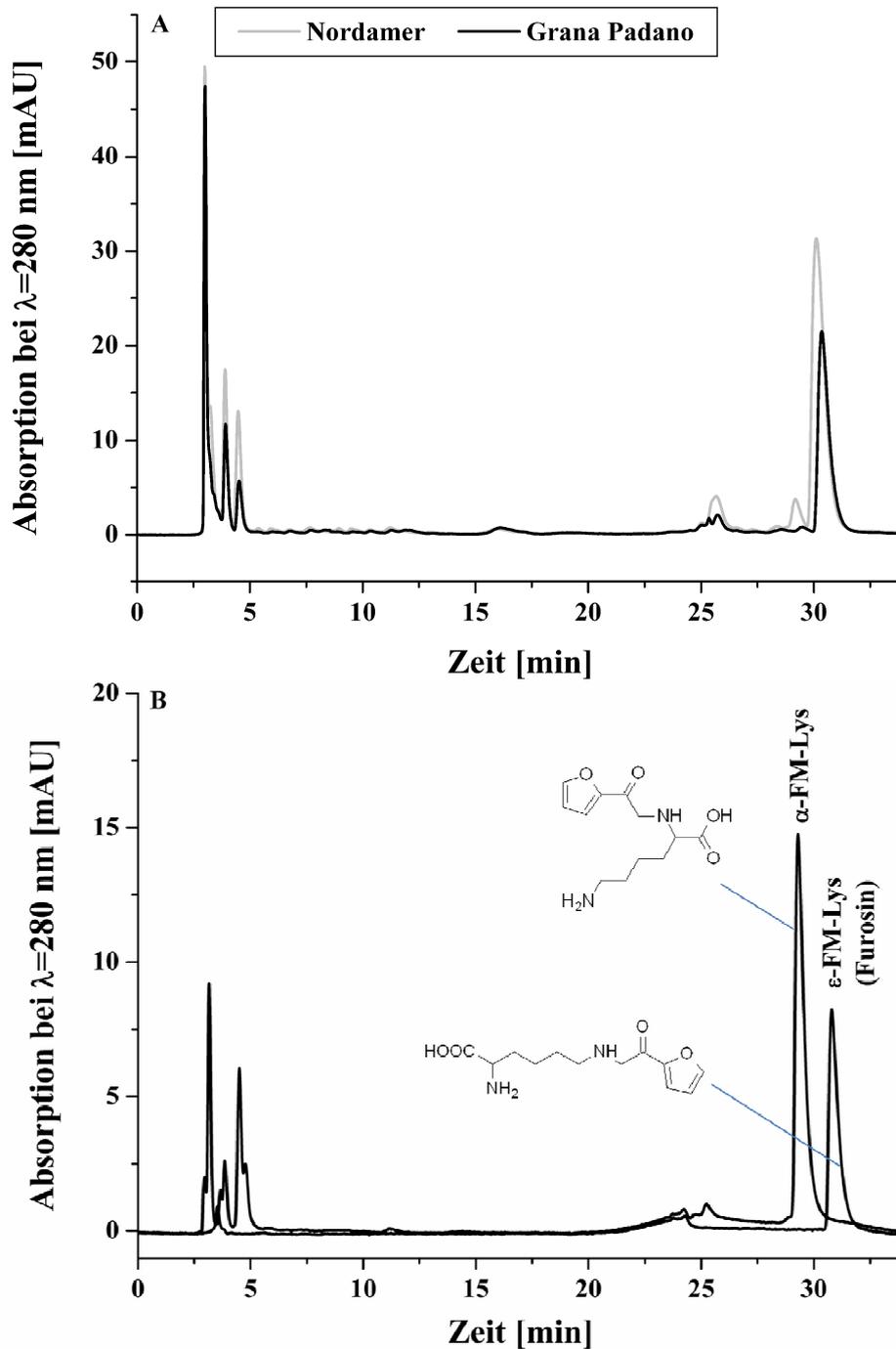
Anhand der Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson kann die vorhandene Menge an reaktiven Aminogruppen in Form der NPN, WLN und freier Aminosäuregehalte nicht als limitierend zur Bildung von  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -AP bestimmt werden. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten sind alle kleiner als 0,6. Lactose hingegen wirkt im Falle der Bildung von  $\alpha$ -AP als stark limitierender Parameter (Korrelationskoeffizient 0,94). Mit einem Korrelationskoeffizienten von nur 0,6 scheint die Bildung von  $\epsilon$ -AP in den untersuchten Modell-Schmelzkäserezepturen nur wenig beeinflussbar zu sein. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Piergiovanni et al. (1989) für  $\epsilon$ -AP erhalten, welche standardisiert hergestellte Modell-Schmelzkäse untersuchten. Sie fanden ebenso keine direkte Beeinflussung der ablaufenden Maillard-Reaktion in Abhängigkeit der Konzentration an reduzierenden Zuckern und Aminokomponenten. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe ableiten, dass durch hohe Prozesstemperaturen vermehrt Maillard-Reaktionsprodukte gebildet werden, wobei dies aber auch unter normalen Lagerungsbedingungen weiter abläuft (Piergiovanni et al. 1989). Für  $\alpha$ -AP

konnte eine temperatur- und zeitabhängige Zunahme anhand eigener Untersuchungen von Modell-Schmelzkäsen mit konstanter Zusammensetzung bestätigt werden (siehe Abschnitt 8, Abb. 8. 1, Abb. 8. 2).

Zusammenfassend kann für die AP-Gehalte in Schmelzkäsen festgestellt werden, dass diese zu etwa 50 % während der Herstellung von Schmelzkäse, in Abhängigkeit der vorhandenen Menge an Lactose und den gewählten Prozessbedingungen (Temperatur) gebildet werden. Die anderen 50 % werden hingegen durch die Rohwaren ins Endprodukt eingetragen. Zu den Rohwaren mit besonders hohen Gehalten an  $\epsilon$ -AP zählen dabei MPC, MMP und MP, wobei dies sicherlich in Folge der hohen Lactose-Gehalte hervorgerufen wird.  $\alpha$ -AP werden neben MMP und MP ebenso v.a. durch die Käserohware in Schmelzkäseprodukte eingebracht. Inwieweit die Reifung und die Käsesorte einen Einfluss auf die in der Käserohware enthaltene Menge an  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -AP haben, wird im folgenden Abschnitt dargelegt.

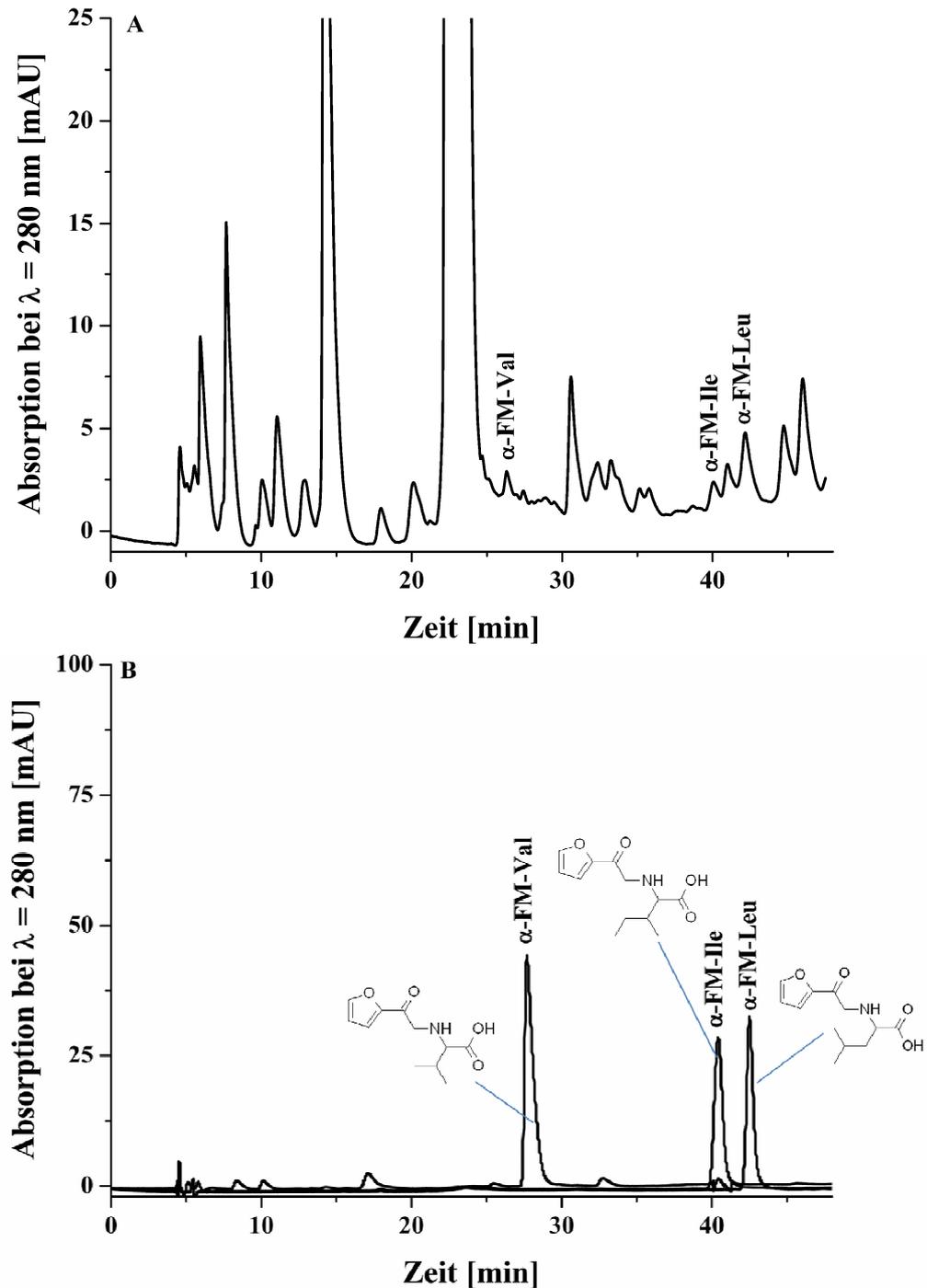
#### 4.3.3 Amadori-Produkte in Käsen – Einfluss von Reifung und Käsesorte

Die Abbildungen 4.46 und 4.47 zeigen repräsentativ RP-HPLC Chromatogramme ausgewählter Käseproben. Die bereits in Abschnitt 4.3.2 in Schmelzkäsen und Rohwaren identifizierten und quantifizierten FMAS des  $\alpha$ -Lysins,  $\epsilon$ -Lysins,  $\alpha$ -Isoleucins und  $\alpha$ -Leucins konnten ebenso in weiteren handelsüblichen Käseproben verschiedener Reifegrade mittels RP-HPLC nachgewiesen werden. Das in Abb. 4. 46 dargestellte Chromatogramm einer RP-8 Säule zeigt dabei zwei typische Käsehydrolysate, in welchen eindeutig durch Vergleich der Retentionszeit, des UV- und Massenspektrums mit Standardmaterialien bei etwa 30 min  $\alpha$ -FM-Lysin und knapp dahinter  $\epsilon$ -FM-Lysin (31 min) identifiziert werden konnten. Beim Vergleich der unterschiedlichen Käsesorten sowie Reifegrade treten dabei zum Teil erhebliche Unterschiede in den Peakintensitäten auf, welche hier anhand eines Schnittkäses (Noordamer, K6, max. 3 Monate gereift) und eines Hartkäses (Grana Padano, HK 9, 14 Monate gereift) verdeutlicht sind. Länger gereifte Käse scheinen dabei geringere Gehalte an  $\alpha$ - als auch  $\epsilon$ -FM-Lysin aufzuweisen. Für weitere mittels einer RP-18 Säule trennbaren  $\alpha$ -FMAS können anhand der Chromatogramme keine so eindeutigen Aussagen zum möglichen Einfluss der Käsesorte und des Reifegrades getroffen werden. Im Gegensatz zu Schmelzkäsen gelang es in den untersuchten Käsen nicht nur den Nachweis und die Quantifizierung von  $\alpha$ -FM-Isoleucin (40,5 min) und  $\alpha$ -FM-Leucin (42,5 min) sondern auch von  $\alpha$ -FM-Valin (28 min) zu führen. Die Identifizierung erfolgte dabei anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des UV-Spektrums sowie Massenspektrums mit denen synthetisierter Standardmaterialien.



**Abb. 4.46** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von  $\alpha$ -FM-Lysin und  $\epsilon$ -FM-Lysin (Furosine) in Käsen mittels einer RP-8 Phase [(A) Darstellung übereinandergelagerter Chromatogramme zweier Käseproben (Noordamer / Grana Padano) / (B) Darstellung eines kommerziell erhältlichen Furosinstandards sowie eines  $\alpha$ -FM-Lysinstandards].

Die in den unterschiedlichen, handelsüblichen Käsesorten ermittelten Gehalte an Amadori-Produkten, welche nach Umrechnung der korrespondierenden FMAS mit Überföhrungsfaktoren erhalten werden, sind dem nachfolgendem Kapitel 4.3.3.1 zu entnehmen.



**Abb. 4.47** RP-HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm zur Bestimmung von  $\alpha\text{-FM-Valin}$ ,  $\alpha\text{-FM-Isoleucin}$  und  $\alpha\text{-FM-Leucin}$  Käsen mittels einer RP-18 Phase. [(A) Darstellung des Chromatogrammes einer Käseprobe (Edamer) / (B) Darstellung der synthetisierten  $\alpha\text{-FM-Referenzsubstanzen}$ .]

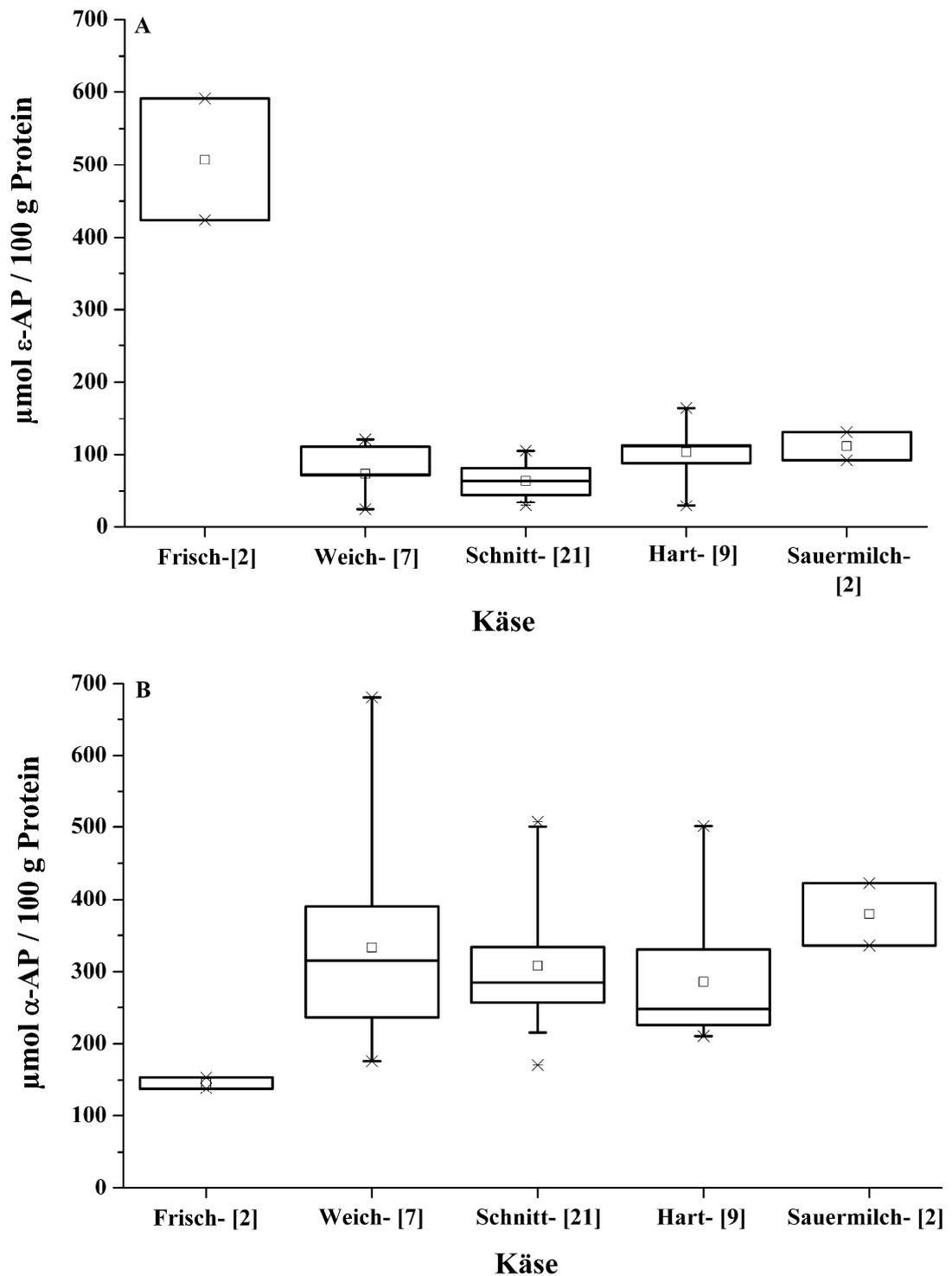
#### 4.3.3.1 Marktanalyse

In der vorliegenden Studie wurden die Gehalte an FMAS-Derivaten des Lysins, Leucins, Valins und Isoleucins in Säurehydrolysaten ausgewählter, handelsüblicher Käsesorten ( $n = 41$ ) analysiert. Die Auswahl der Proben beinhaltet dabei neben Frischkäsen ( $n = 2$ ), Schnittkäsen ( $n = 21$ ) und Hartkäsen ( $n = 9$ ) auch Vertreter der Sauermilch- ( $n = 2$ ) und Weichkäse ( $n = 7$ ). Genauere Angaben zu den analysierten

Proben und deren Reifegraden sind den in Abschnitt 3.3.1 gezeigten Tabellen 3.1 und 3.2 zu entnehmen.

Die Gehalte der 4 ausgewählten  $\alpha$ -FMAS wurden zu 0,5 bis 56  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  (0,05 bis 14  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$ ) ermittelt. Im Vergleich dazu konnte Furosin ( $\epsilon$ -FMAS) in weit höheren Gehalten von 12 bis 295  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  (3 bis 75  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$ ) in den Säurehydrolysaten der untersuchten, handelsüblichen Käse nachgewiesen werden. Die für Furosin erhaltenen Daten stehen dabei in Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen unterschiedlicher industriell hergestellter Weich-, Schnitt- und Hartkäse (Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2006, Acquistucci et al. 1996, Corzo et al. 2000, Tirelli 1998, Schwietzke et al. 2009, Pellegrino et al. 2010, Schwietzke et al. 2011). Diese enthalten Furosin durchschnittlich in Mengen von etwa 6 bis 123  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$ . Im Gegensatz dazu sind bisher noch keine Daten zu Gehalten an  $\alpha$ -FMAS in Käsen publiziert worden. Allein in hypoallergener Säuglingsnahrung, einem peptidhaltigen, trockenen Lebensmittel auf Milchbasis, konnten  $\alpha$ -FMAS-Derivate des Alanins, Lysins, Leucins, Valins und Isoleucins in Gehalten von 9 bis 95  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$  nachgewiesen werden (Penndorf et al. 2007). Weitere thermisch stark behandelte Lebensmittel in denen  $\alpha$ -FMAS untersucht wurden, sind Fruchtsäfte, Trockenfrüchte und -gemüse (Tomaten, Karotten) (del Castillo et al. 2000, Sanz et al. 2000, Sanz et al. 2001, Wellner et al. 2009). Diese enthalten  $\alpha$ -FMAS-Derivate durchschnittlich in Mengen von etwa 14 bis 1201  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$ . In Honigen, welche gering oder gar nicht thermisch behandelt werden, wurden sogar  $\alpha$ -FMAS Gehalte von bis zu 1372  $\text{mg} / 100 \text{ g Protein}$  nachgewiesen (Sanz et al. 2003). Für detaillierte Informationen zu den darin speziell analysierten  $\alpha$ -FMAS sei auf die im Abschnitt 2.3.4.2 abgebildete Tab. 2. 5 verwiesen.

Da eine direkte Vergleichbarkeit der Gehalte der einzelnen FMAS untereinander infolge der abweichenden Umsetzungsraten während der Säurehydrolyse nicht möglich ist, werden nachfolgend die Gehalte an Amadori-Produkten dargestellt. Als Berechnungsgrundlage wurden hierbei experimentell ermittelte Überföhrungsfaktoren angewendet, wobei diese auf der reproduzierbaren Umsetzung einer bestimmten Menge an AP zur korrespondierenden FMAS unter konstanten Bedingungen der Hydrolyse beruhen (Krause et al. 2003, Finot et al. 1972). Als Überföhrungsfaktoren zur Berechnung als Lactulosylderivate wurden 2 und 9,4 für  $\epsilon$ - bzw.  $\alpha$ -FM-Lys, 9,7 für  $\alpha$ -FM-Ile, 8,2 für  $\alpha$ -FM-Leu sowie 10,1 für  $\alpha$ -FM-Val eingesetzt (Tab. 8. 3) (Penndorf et al. 2007). Die durchschnittlichen Gehalte unterschiedlicher, handelsüblicher Käsesorten von  $\epsilon$ -AP (24 bis 591  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) als auch einem Summenparameter der  $\alpha$ -AP (138 bis 681  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ), welcher sich aus Derivaten des Valins, Leucins, Isoleucins sowie Lysins zusammensetzt, sind Abbildung 4.48 zu entnehmen.



**Abb. 4.48** Amadori-Produkte in verschiedenen Käsesorten. A)  $\epsilon$ -AP von Lysin in Käsen klassiert in 5 Gruppen basierend auf den Herstellungsverfahren. B) Summenparameter von vier  $\alpha$ -AP (Lysin, Valin, Isoleucin und Leucin) in Käsesorten klassiert in 5 Gruppen basierend auf den Herstellungsverfahren. [eingeklammerte Nummern repräsentieren die pro Gruppe analysierten Käse, Quantile: 25 % / 75 % / , Whisker: 5 % / 95 %]

Die dazugehörigen Daten bzw. detaillierte Angaben zur Konzentration der einzelnen  $\alpha$ -AP und  $\epsilon$ -AP in Käsen sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Ebenso ist in dieser Tabelle die kalkulierte Blockierung der jeweiligen essentiellen Aminosäure erfasst, welche infolge

der Modifizierung durch die ablaufende Maillard-Reaktion eintritt. Die Größenordnung der Lysinmodifizierung liegt dabei bei etwa 0,04 bis 1 %. Thermisch weitaus stärker belastete Milchprodukte (Trockenmilcherzeugnisse) können im Vergleich dazu eine Lysinblockierung von bis zu 30 % erreichen (Henle et al. 1995). Die Blockierung einzelner Aminosäuren am N-Terminus erreicht in Käsen hingegen nur max. 0,6 % (kalkuliert für Valin, Leucin, Isoleucin und  $\alpha$ -Lysin). Ernährungsphysiologisch gesehen ist die Blockierung essentieller Aminosäuren infolge der Maillard-Reaktion in Käsen somit vernachlässigbar.

**Tab. 4.6** Spannweiten der Amadori-Produkte der 42 untersuchten Käse (Mittelwerte aus  $n=2$ ,  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ). Abgeschätzte Spannweiten der Aminosäure-Blockierung im Vergleich zum Gesamtgehalt an AS in Caseinen (Belitz et al. 2001) sind in den eckigen Klammern angegeben (%).

Käsesorte	$\epsilon$ -AP von Lysin	$\alpha$ -AP von Lysin	$\alpha$ -AP von Valin	$\alpha$ -AP von Isoleucin	$\alpha$ -AP von Leucin
Frisch-	424 – 591 [0,8 -1,0]	17 – 67 [0,03 – 0,1]	36 – 96 [0,06 – 0,2]	29 – 51 [0,07 – 0,1]	n.b.
Weich-	24 – 121 [0,04 – 0,2]	18 – 174 [0,03 – 0,3]	n.n. – 57 [max. 0,1]	39 – 96 [0,08 – 0,2]	32 – 461 [0,04 – 0,6]
Schnitt-	30 – 105 [0,05 – 0,2]	17 – 112 [0,03 – 0,2]	n.n. – 19 [max. 0,3]	30 - 175 [0,07 – 0,4]	80 – 251 [0,1 – 0,3]
Hart-	30 - 165 [0,05 – 0,3]	3 – 95 [0,01 – 0,2]	n.n. – 27 [max. 0,05]	33 – 198 [0,08 – 0,5]	76 – 254 [0,1 – 0,3]
Sauermilch-	92 - 131 [0,2]	23 – 64 [0,04 – 0,1]	1 – 47 [max. 0,08]	51 – 64 [0,1]	215 – 294 [0,3 – 0,4]

Mit 424 bis 591  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  konnten die höchsten Gehalte an  $\epsilon$ -AP in Frischkäsen ermittelt werden (Abb. 4. 48). Im Vergleich zu anderen Käsespezialitäten sind Frischkäse zum Einen durch eine geringe proteolytische Aktivität gekennzeichnet, wobei sich diese in niedrigen Gehalten an kleinen, mittleren und großen Peptiden (NPN – 0,7 mg Glutaminsäure-Äquivalente / g Käseprobe, WLN – 5,4 mg Glutaminsäure-Äquivalente / g Käseprobe) sowie geringen Konzentrationen an freien Aminosäuren (57 mg / 100 g Protein) zeigt. Auf der anderen Seite charakterisiert diese Käse ein hoher Gehalt an Lactose (4,4 g / 100 g TM). Beide Aspekte sind verantwortlich für das erhöhte Level an Modifizierungen der Seitenketten des  $\epsilon$ -Lysins anstelle der N-Termini von Peptiden, Proteinen und Aminosäuren. In Übereinstimmung hierzu konnten in Frischkäsen niedrigere Gehalte an  $\alpha$ -AP (138 bis 154  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) im Vergleich zu deutlich höheren Gehalten an  $\epsilon$ -AP (424 bis 591  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) gefunden werden. Als dominierende  $\alpha$ -AP wurden in dieser Käsesorte Derivate des Valins und  $\alpha$ -Lysins bestimmt (Tab. 4.6). AP des Isoleucins und Leucins liegen im

Gegensatz dazu in niedrigeren Konzentrationen vor. Infolge der während der Frischkäse-Herstellung nur geringen Wärmebelastung sollten die Gehalte an  $\epsilon$ -AP als auch  $\alpha$ -AP eigentlich in vergleichbar niedriger Konzentration wie etwa in pasteurisierter Milch vorliegen (Resmini et al. 1991). Die in den untersuchten Frischkäsen gefundenen deutlich höheren Werte weisen dabei auf einen erheblichen Zusatz an Milch- oder Molkenpulver hin (Villamiel et al. 1999).

Im Vergleich zu den analysierten Frischkäsen weisen alle anderen Käsesorten mit nur 24 bis 164  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein deutlich geringere  $\epsilon$ -AP Gehalte auf (Tab. 4.6, Abb. 4. 48). Die hohe proteolytische Aktivität in diesen Käsen führt dabei zu ansteigenden Konzentrationen an Peptiden (NPN – 3 bis 125 mg Glutaminsäure-Äquivalente / g Käseprobe, WLN – 20 bis 159 mg Glutaminsäure-Äquivalente / g Käseprobe) und freien Aminosäuren (44 bis 3721 mg/ 100 g Protein). Infolge des Anstiegs an freien N-terminalen Aminogruppen resultieren viele neue Reaktionsstellen, welche im Zuge der Maillard-Reaktion mit reduzierenden Zuckern modifiziert werden können. Die Gehalte an reduzierenden Zuckern nehmen während der Reifung und Lagerung von Käsen allerdings kontinuierlich ab (Saintt-Gelais et al. 1991), was unweigerlich die Bildung von AP in langgereiften Käsen erschwert. In nicht oder nur kurz gereiften sowie sehr zuckerhaltigen Käsen sollte die Bildung von AP hingegen bevorzugt ablaufen.

In den analysierten Schnitt-, Hart-, Weich- als auch Sauermilchkäsen konnten reduzierende Zucker in Konzentrationen von weniger als 0,3 g Lactose / 100 g TM ermittelt werden. Im Vergleich dazu enthielten die analysierten Frischkäse über 4 g Lactose/ 100 g TM. In Folge dieser niedrigen und z.T. variierenden Zuckergehalte tritt eine große Schwankung der  $\alpha$ -AP-Gehalte in Käsesorten auf. Im Vergleich zu Frischkäse wurden z.T. deutlich höhere Konzentrationen an  $\alpha$ -AP in anderen Käsesorten von 170 bis 681  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein ermittelt (Abb. 4. 48). Als dominierende  $\alpha$ -AP wurden in diesen Käsen Derivate des Leucins und Isoleucins bestimmt (30 bis 461  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein, Tab. 4.6). AP des Valins und  $\alpha$ -Lysins liegen im Gegensatz dazu in niedrigeren Konzentrationen vor (max. 175  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  Protein). Erklärt werden können diese Beobachtungen durch die vermehrt ablaufenden proteolytischen Prozesse und dem infolge der eingesetzten Starterkulturen ablaufenden Zuckerabbau während der Reifung von Käse, wobei beide Reaktionen in Abhängigkeit der Käsesorte unterschiedlich schnell verlaufen können. Die ablaufende Maillard-Reaktion und folglich die Bildung von AP wird somit durch die Konzentration an Ausgangsstoffen beeinflusst. Auf der anderen Seite wird auch die Käseherstellung, welche in Abhängigkeit der Käsesorte variierende thermische Prozesse beinhalten kann, die Gehalte und das Verhältnis an  $\epsilon$ -AP und  $\alpha$ -AP beeinflussen.

Um abschließend zu klären, welche Ausgangsstoffe auf die Bildung von AP in Käsen einen Einfluss haben, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt. Die dazu erhaltenen Daten sind der nachfolgend gezeigten Tabelle zu entnehmen (Tab. 4. 7).

**Tab. 4. 7** Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der AP des Lysins, Valins, Leucins und Isoleucins von 42 kommerziell erworbenen Käsen im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freien Aminosäuren. [\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; bivariat, Korrelationskriterien: PKK > 0,6 – 0,8 – gute und PKK > 0,8 sehr hohe Korrelation, PKK < -0,8 sehr hohe und PKK < -0,6 gute indirekte Korrelation, Werte zwischen 0,6 und -0,6 geringe bis keine ausgeprägte Korrelation]

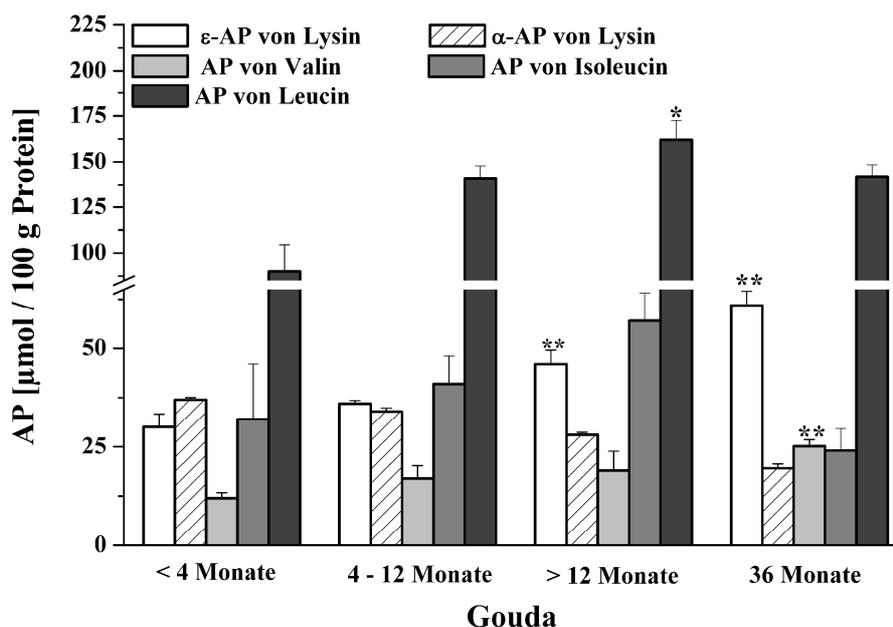
	Lactose	NPN	WLN	freie AS
$\epsilon$ -AP von Lysin	0,803**	-0,142	-0,261	-0,117
$\alpha$ -AP von Lysin	0,06	-0,075	0,009	-0,184
$\alpha$ -AP von Valin	0,451**	-0,172	-0,278	-0,071
$\alpha$ -AP von Isoleucin	-0,263	0,171	0,164	-0,117
$\alpha$ -AP von Leucin	-0,332	0,070	0,185	0,020

Anhand der rechnerisch ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson kann festgestellt werden, dass die Bildung von  $\epsilon$ -AP in Käsen direkt durch die Gehalte an reduzierenden Zuckern beeinflusst wird. Dies kann durch den hohen Koeffizienten von 0,803 für die Korrelation von  $\epsilon$ -AP mit Lactose abgeleitet werden. Der Proteolysegrad, welcher durch den NPN, den WLN und den Gehalt an freien Aminosäuren repräsentiert wird, scheint hingegen keinen Einfluss auf die Bildung der  $\epsilon$ -AP zu haben. Die Bildung von  $\alpha$ -AP in Käsen scheint ebenso weder durch den Proteolysegrad noch durch den Gehalt an reduzierenden Zuckern beeinflusst zu werden.

In Folge der stark variierenden Herstellungsverfahren und der deutlich abweichenden Reifegrade der untersuchten Käse, welche nicht genauer bekannt sind, kann kein generell gültiger Trend zur Bildung von AP in Käsen abgeleitet werden, weshalb anschließend die Gehalte an AP einer Käsesorte unterschiedlicher Reifegrade miteinander verglichen werden sollen. Exemplarisch ist dies in nachfolgend abgebildeter Grafik für einen Gouda (4 bis 36 Monate gereift) dargestellt (Abb. 4. 49). Diese Ergebnisse zeigen zunächst einen Anstieg der Konzentrationen an AP der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins sowie der  $\alpha$ -Aminogruppe von Valin, Leucin und Isoleucin während der Reifung dieses Käses an. Bei längerer Reifung nehmen die Gehalte an  $\alpha$ -AP als auch  $\epsilon$ -AP schließlich wieder ab. Eine Ausnahme hierzu stellen die Gehalte an  $\alpha$ -AP des Lysins dar, da diese kontinuierlich während der Reifung abnehmen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen kann in der fortschreitenden Reaktion der AP zu fortgeschrittenen Produkten und „Advanced Glycation Endproducts“ im Zuge der Maillard-Reaktion liegen. Aber auch ein enzymatischer Abbau dieser

Reaktionsprodukte, welcher durch die während der Herstellung von Käse zugesetzten Milchsäurebakterien katalysiert ist, ist denkbar.

Basierend auf den, anhand der 41 untersuchten handelsüblichen Käsen, erhaltenen Daten wurden anschließend fünf ausgewählte Käse einer simulierten Reifung bzw. Lagerung unterzogen und hinsichtlich deren Gehalte an AP sowie der weiter ablaufenden Reifung charakterisiert. Die hierzu erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend erläutert.



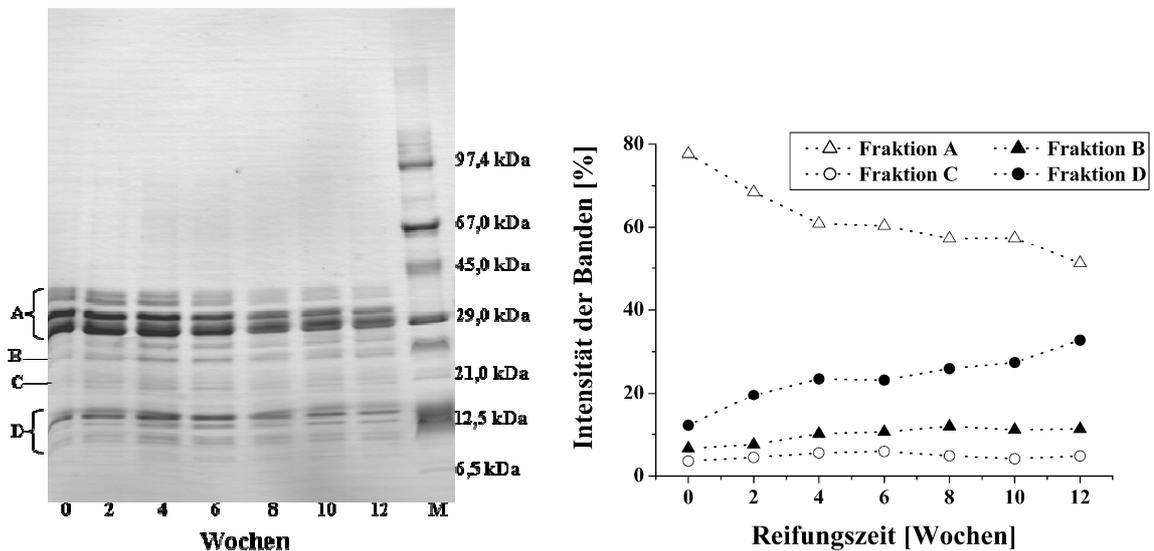
**Abb. 4. 49** Amadori-Produkte in vier unterschiedlich lang gereiften Gouda-Käsen (Mittelwert und Standardabweichung bei n=2). Signifikante Unterschiede zwischen den AP-Gehalten sind im Vergleich zum Gouda < 4 Monate angegebenen (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01).

#### 4.3.3.2 Reifungsexperimente

Analysiert wurden im Rahmen dieser Untersuchungen 4 Schnitt- bzw. Hartkäse (Cheddar, Maasdammer, Gouda, Edamer) sowie 1 Weichkäse (Camembert). Detaillierte Angaben zu diesen Käsen können der im Abschnitt 3.3.1.2 angegebenen Tabelle entnommen werden (Tab. 3. 3). Während des 12wöchigen Reifungsexperimentes wurde die fortschreitende Proteolyse der Käsesorten mittels elektrophoretischer (SDS-PAGE), spektroskopischer (NPN / WLN) und chromatographischer (ASA) Methoden verfolgt. Die genauen Versuchsbedingungen hierzu sind den Abschnitten 3.5.8 bis 3.5.10 zu entnehmen.

Anhand der durchgeführten, elektrophoretischen Untersuchungen kann eindeutig in allen Käsesorten ein signifikanter Abbau der intakten Caseine beobachtet werden. Exemplarisch dargestellt ist dies in nachfolgend abgebildeter Grafik für einen Cheddar-Käse, wobei links das Elektropherogramm und rechts die dazugehörigen, nach densitometrischer Auswertung erhaltenen, prozentualen Anteile der Banden gezeigt sind

(Abb. 4. 50). Der Anteil der intakten Caseine (Fraktion A) sinkt in diesem Käse dabei kontinuierlich von anfänglich 80 % auf 55 % vom Gesamtprotein ab, wobei  $\alpha_{S1}$ - und  $\alpha_{S2}$ -Caseine (33 bzw. 34 kDa) im Vergleich zu  $\beta$ -Caseinen (29 kDa) schneller proteolytisch angegriffen werden.

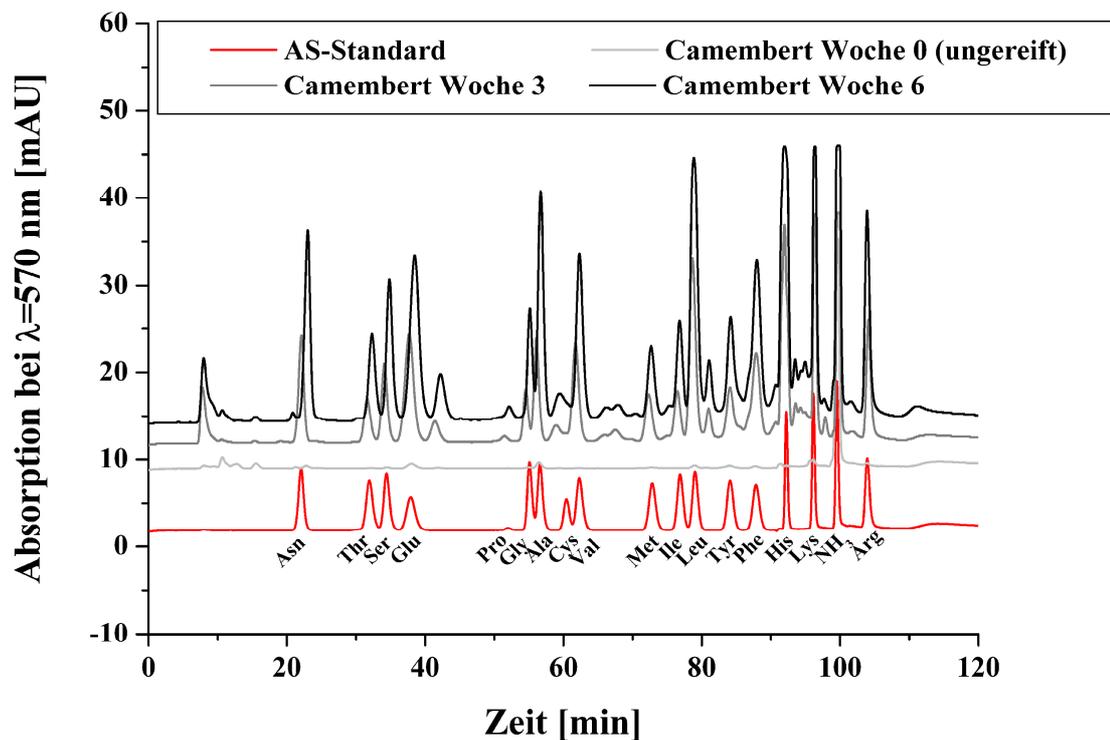


**Abb. 4. 50** Verfolgung des Reifungsverlaufes in Käsen mittels SDS-PAGE. Gezeigt ist exemplarisch ein Elektropherogramm eines Cheddar-Käses über den Zeitraum von 12 Wochen (links) und die dazugehörige densitometrische Auswertung (rechts) [M-Proteinmarker, Fraktion A (28-40 kDa), Fraktion B (25 kDa), Fraktion C (12 kDa bis 22 kDa), Fraktion D (unter 12 kDa)].

Ebenso ist die fortgeschrittene Proteolyse anhand des vermehrten Auftretens von Peptiden gekennzeichnet, welche im Bereich von 10 bis 24 kDa und teilweise auch darunter Banden verursachen. Als Hauptabbauprodukte der Caseine konnten kleine und mittlere Peptide (kleiner gleich 12 kDa, Fraktion D) ermittelt werden, wobei deren Anteil von anfänglich 2 % innerhalb des 12wöchigen Reifungsversuches auf etwa 35 % ansteigt. Der Abbau der Caseine erfolgt dabei zunächst zu großen Peptiden, welche anschließend weiter zu kleineren Peptiden und freien Aminosäuren gespalten werden (McSweeney 2004). Für alle anderen Käse (Gouda, Edamer, Maasdamer, Camembert) konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, wobei die absoluten Proteolysegrade dieser variieren können.

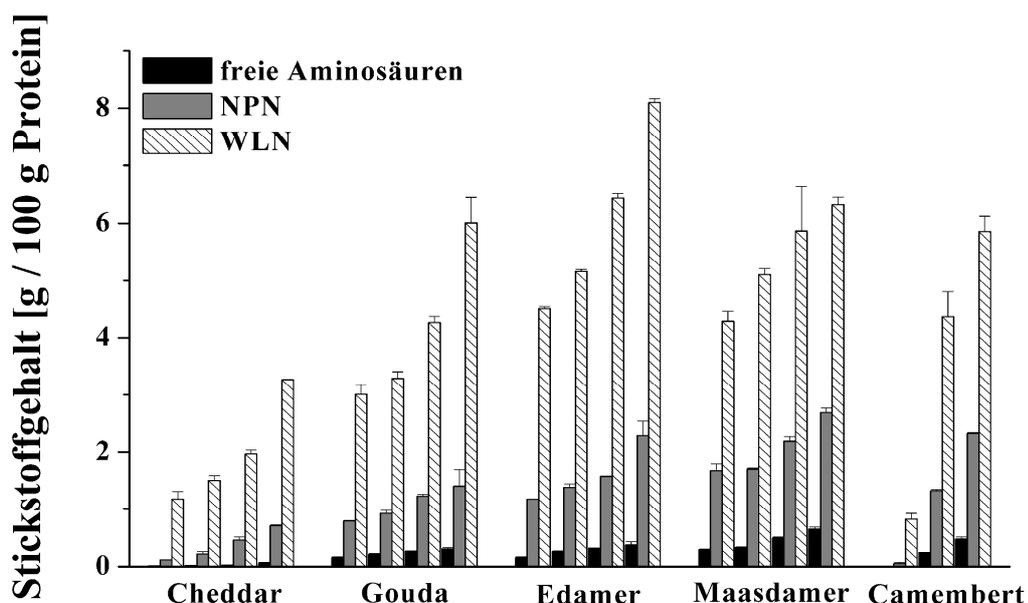
Die mittels SDS-PAGE erzielten Ergebnisse konnten anhand der analysierten NPN- und WLN-Fractionen sowie der Analyse der freien Aminosäuren der Käsesorten bestätigt werden. Exemplarisch sind hierzu in **Abb. 4. 51** die Aminosäurespektren des untersuchten Camemberts zu drei unterschiedlichen Zeiten des Reifungsexperimentes gezeigt. In Woche 0, welche bei dieser Käsesorte den Tag der Herstellung markiert, konnten keine nennenswerten Konzentrationen an freien Aminosäuren nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu steigen die Gehalte an freien Aminosäuren bis Woche 3 bzw. Woche 6 kontinuierlich an. Nachfolgend dargestellte **Abb. 4. 52** fasst die in den

untersuchten Käsen der Reifungsstudie ermittelten Gehalte an NPN, WLN und eines Summenparameters der freien Aminosäuren, berechnet als g Stickstoff [N] / 100 g Protein zusammen. Während des Reifungsexperimentes kann in allen untersuchten 5 Käsen ein kontinuierlicher Anstieg der freien Aminosäuren, des NPN und des WLN beobachtet werden, was der Erwartung entspricht, dass während des simulierten Lagerungsexperimentes die Reifung der Käse weiterhin abgelaufen ist.



**Abb. 4. 51** Verfolgung der Reifung in Käsen mittels Aminosäureanalyse mit UV-Detektion bei 570 nm zur Bestimmung der freien Aminosäuren. Gezeigt sind exemplarisch übereinandergelagerte Chromatogramme von drei unterschiedlich lang gereiften Camembert-Proben (Woche 0 -direkt nach der Herstellung, Woche 3 und Woche 6) sowie eines kommerziell erhältlichen Aminosäurestandards.

Die bestimmten Gehalte an diesen Parametern bewegen sich von 7 bis 652 mg N / 100 g Protein für freie Aminosäuren, 0,054 bis 2,9 g N / 100 g Protein für die NPN- sowie 0,8 bis 8,1 g N / 100 g Protein für die WLN-Gehalte. Charakteristisch für den Gouda, Edamer, Maasdamer und den Camembert Käse sind dabei vergleichbar hohe Anteile an freien Aminosäuren und Peptiden. Im Gegensatz dazu weist der analysierte Cheddar-Käse deutlich niedrigere Konzentrationen an diesen Fraktionen auf. Der v.a. zu Beginn der Reifung im Verhältnis stärker ausgeprägte Anstieg der WLN- im Vergleich zur NPN-Fraktion weist dabei auf die vermehrte Bildung freier Aminosäuren sowie mittlerer bis größerer Peptide hin. Im Verlauf der fortgeschritteneren Reifung verschiebt sich dieses Verhältnis in allen Käsen zugunsten der Bildung des NPN, wobei dies die vermehrte Bildung freier Aminosäuren sowie kleiner Peptide anzeigt (**Abb. 4. 52**).



**Abb. 4.52** Bildung von freien Aminosäuren, NPN (Nicht-Protein-Stickstoff) und WLN (wasserlöslicher Stickstoff) im Verlauf der Reifung von 5 kommerziell erhältlichen Käsesorten. Dargestellt sind die experimentellen Daten aus Woche 0 (Beginn des Reifungsexperimentes), 4, 8 und 12 (Camembert nur bis Woche 8). [Mittelwerte und Standardabweichungen bei n=3].

Infolge des Anstiegs an freien, reaktiven N-Termini resultieren während der Reifung neue Reaktionsstellen, welche im Zuge der Maillard-Reaktion mit reduzierenden Zuckern modifiziert werden können. Die Gehalte an reduzierenden Zuckern nehmen jedoch während der Reifung und Lagerung von Käsen kontinuierlich ab (Saint-Gelais et al. 1991), was unweigerlich eine Limitierung der AP-Bildung in langgereiften Käsen nach sich zieht. Zu Beginn des Reifungsexperimentes wurden in den untersuchten Gouda, Edamer und Maasdamer Käsen bereits nur noch geringe Konzentrationen an reduzierenden Zuckern (0,25 g / 100 g TM) gefunden, welche innerhalb der 12wöchigen Studie weiter absanken (0,18 g / 100 g TM). Im Gegensatz dazu können in dem untersuchten Camembert und Cheddar Käse weitaus höhere Konzentrationen zu Beginn der Reifung ermittelt werden. Im Laufe des 12wöchigen Experimentes sanken die Gehalte an reduzierenden Zuckern in diesen jedoch ebenso kontinuierlich ab (Cheddar - 1,2 zu 0,2 g / 100 g TM, Camembert - 6,2 zu 1,3 g / 100 g TM).

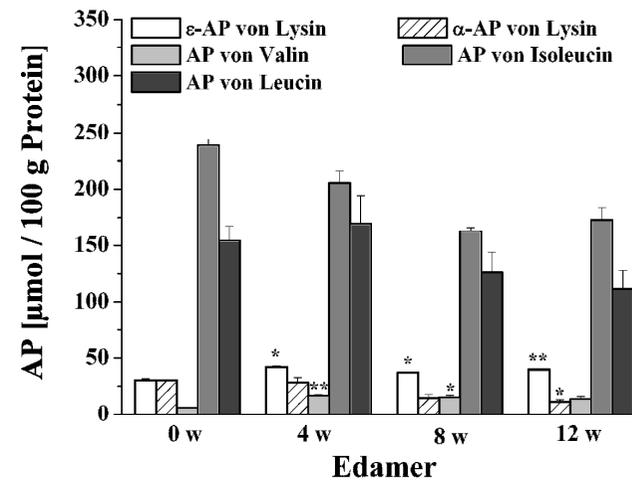
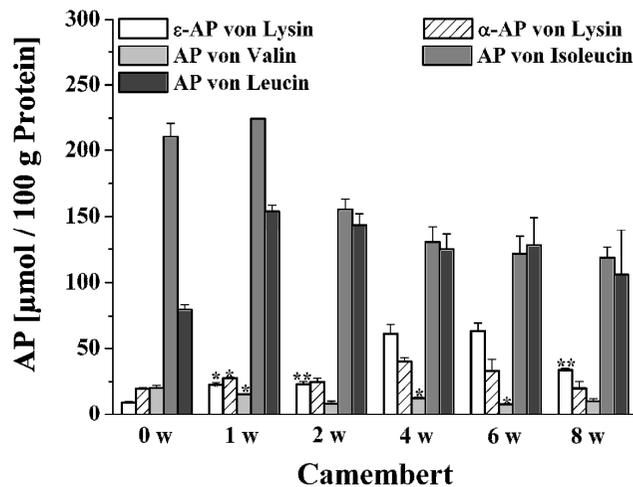
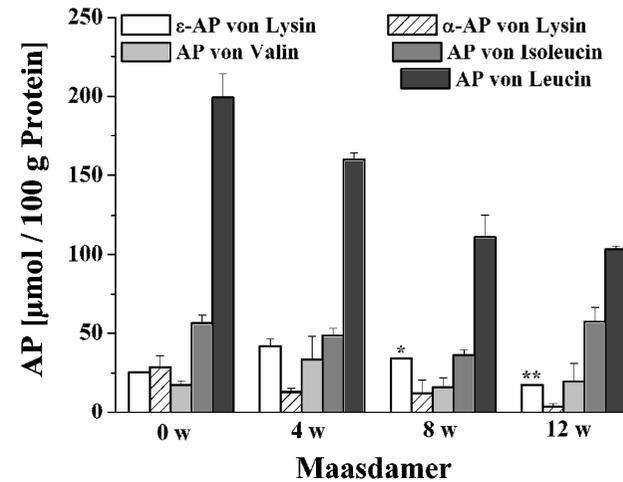
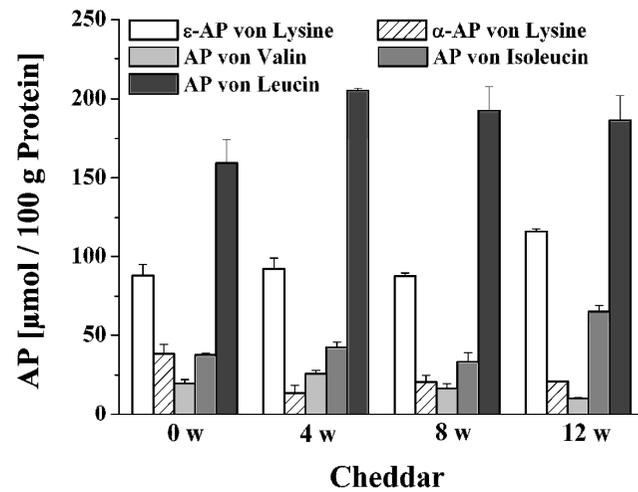
Parallel zu den charakteristischen Reifungsmarkern wurden ebenso die Gehalte an  $\epsilon$ - als auch  $\alpha$ -AP in den gelagerten Käsen analysiert. Die hierzu erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend für 4 der 5 untersuchten Käse gezeigt (Abb. 4.53). Die darin ermittelten Furosingehalte schwanken von 2,3 bis 29 mg / 100 g Protein. Berechnet als korrespondierendes  $\epsilon$ -AP der Lactulosylderivate ergeben sich Level von 9 bis 116  $\mu\text{mol}$  / 100 g Protein in diesen Käsesorten. Laut publizierter Daten weisen Weich-, Schnitt- und Hartkäse vergleichbare Konzentrationen an Furosin auf (Resmini et al. 1990, Villamiel et al. 2000, Tokusoglu et al. 2006, Tirelli 1998, Schwietzke et al. 2009 und 2011). Während der simulierten Reifung ist in allen Käsen eine Veränderung der Gehalte an  $\epsilon$ -AP zu verzeichnen, welche scheinbar in Abhängigkeit der Käsesorte und

des Reifegrades auftritt. Im untersuchten Cheddar und Edamer Käse wurden über die gesamte Dauer der Reifungsstudie ansteigende Gehalte an  $\epsilon$ -AP ermittelt, welche mit bis zu 116 bzw. 40  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  bestimmt werden konnten. Vergleichbare Ergebnisse erzielt auch Corzo et al. (2000) für die Reifung von spanischem Manchego Käse.

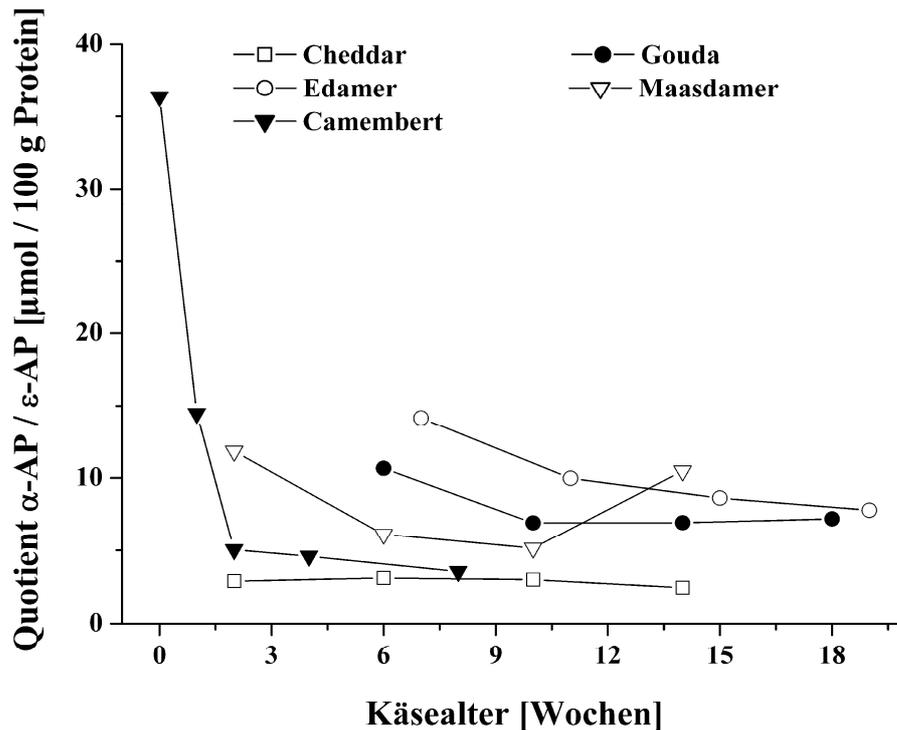
Im Gegensatz hierzu wurden in den 3 anderen analysierten Käsesorten (Gouda, Maasdamer und Camembert) bereits ab Woche 4 des simulierten Reifungsexperimentes wieder absinkende Level an  $\epsilon$ -AP beobachtet. Die absoluten Gehalte dieser Derivate sind dabei vergleichbar zu den in Edamer Käse gefundenen Konzentrationen. Cheddar Käse nimmt mit den besonders hohen Gehalten an  $\epsilon$ -AP innerhalb dieser Käse eine Sonderstellung ein. Ein typischerweise zur Cheddar Herstellung zusätzlich angewandter Erhitzungsschritt, welcher auch als Cheddaring bezeichnet wird, kann als mögliche Entstehungsquelle vermutet werden. Der zuvor von der Molke abgetrennte Käsebruch wird dabei nochmals mit dieser vermischt und bei  $37^\circ\text{C}$  temperiert (Spreer 1999, Fox et al. 2004).

Mit 130 bis 430  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  sind die in den analysierten Käsen ermittelten Gehalte der  $\alpha$ -AP des Lysins, Valins, Isoleucins und Leucins in der Summe im Vergleich zum  $\epsilon$ -AP in höheren Konzentrationen zu finden. Mit Ausnahme des Cheddar Käses, sinken diese Gehalte in den anderen Käsen kontinuierlich während des gesamten simulierten Reifungsexperimentes ab (Abb. 4. 53). Als dominierende  $\alpha$ -AP wurden in diesen Derivate des Leucins und Isoleucins bestimmt (33 bis 238  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ). AP des Valins und Lysins liegen im Gegensatz dazu in niedrigeren Konzentrationen vor (4 bis 40  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ).

Vergleicht man die ermittelten Gehalte an  $\epsilon$ -AP und  $\alpha$ -AP miteinander, so kann für die untersuchten Käsesorten ein schnellerer Abbau der  $\alpha$ -Aminosäurederivate beobachtet werden. Dieser Abbau scheint dabei in gewissem Maße von der Käsesorte und dem Reifestadium des Käses beeinflusst zu sein. Bildet man den Quotienten aus  $\alpha$ -AP zu  $\epsilon$ -AP, so ergeben sich für alle Käse degressive Zahlenwerte. Dargestellt ist dies in nachfolgend gezeigter Grafik (Abb. 4. 54).



**Abb. 4.53** Amadori-Produkte in 4 gelagerten Käsen verschiedener Sorten. [Reifungsdauer 0 – 12 (8) Wochen (w), Mittelwerte und Standardabweichungen bei n=2. Signifikante Unterschiede zwischen den AP-Gehalten sind im Vergleich zum Käse Woche 0 angegeben (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01).



**Abb. 4.54** Entwicklung der Quotienten aus  $\alpha$ - zu  $\epsilon$ -AP der untersuchten Käse während des Reifungsexperimentes in Abhängigkeit zum absoluten Käsealter.

Die ermittelten Quotienten aus  $\alpha/\epsilon$ -AP nehmen dabei während der Reifung der untersuchten Käse abhängig vom Reifungsgrad und der Käsesorte unterschiedlich schnell ab, erreichen anschließend jedoch vergleichbare Konzentrationslevel. Zur Beurteilung des Reifungsverlaufes von Käsen kann dieser Quotient demzufolge nur unter Berücksichtigung der Käsesorte und nicht universell herangezogen werden.

Anhand der Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson soll nachfolgend der Einfluss der Ausgangsstoffe Lactose und reaktiver Aminogruppen auf die Bildung von  $\epsilon$ -AP als auch  $\alpha$ -AP in den Käsen des simulierten Reifungsexperimentes untersucht werden (Tab. 4.8). Anhand der rechnerisch ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson kann festgestellt werden, dass die Bildung von  $\epsilon$ -AP als auch  $\alpha$ -AP in Käsen nicht generell durch die Gehalte an reduzierenden Zuckern oder durch ablaufende proteolytische Prozesse beeinflusst zu sein scheint. Vielmehr werden die Unterschiede in den Gehalten an AP zwischen den analysierten Käsen auch durch die unterschiedliche Herstellung und damit verbunden die Aktivität der enthaltenen Mikroorganismen sowie durch die fortschreitende Maillard-Reaktion bestimmt.

**Tab. 4.8** Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) der AP des Lysins, Valins, Leucins und Isoleucins der 5 untersuchten Käse der Reifungsstudie im Vergleich zu den Gehalten an Lactose, NPN, WLN und freier Aminosäuren [\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; bivariat; Korrelationskriterien: PKK > 0,6 – 0,8 – gute und PKK > 0,8 sehr hohe Korrelation / grün, PKK < -0,8 sehr hohe und PKK < -0,6 gute indirekte Korrelation / rot, Werte zwischen 0,6 und -0,6 geringe bis keine ausgeprägte Korrelation].

	Lactose	NPN	WLN	freie AS
<b>Cheddar</b>				
ε-AP von Lysin	-0,858	0,99**	0,916	0,942
α-AP von Lysin	0,093	-0,298	-0,354	-0,314
α-AP von Valin	0,960*	-0,763	-0,849	-0,843
α-AP von Isoleucin	-0,786	0,963*	0,854	0,889
α-AP von Leucin	0,016	0,179	0,245	0,200
<b>Maasdamer</b>				
ε-AP von Lysin	0,106	-0,647	-0,589	-0,587
α-AP von Lysin	0,984*	-0,804	-0,7	-0,847
α-AP von Valin	-0,060	-0,396	-0,586	-0,340
α-AP von Isoleucin	0,288	0,063	-0,155	0,018
α-AP von Leucin	0,962*	-0,840	-0,891	-0,910
<b>Camembert</b>				
ε-AP von Lysin	-0,646	0,387	0,532	0,273
α-AP von Lysin	-0,343	-0,158	-0,001	-0,313
α-AP von Valin	0,922*	-0,594	-0,688	-0,565
α-AP von Isoleucin	0,936*	-0,893*	-0,953*	-0,702
α-AP von Leucin	-0,675	-0,042	0,100	-0,98
<b>Edamer</b>				
ε-AP von Lysin	-0,818	0,487	0,467	0,702
α-AP von Lysin	0,805	-0,878	-0,955	-0,916
α-AP von Valin	-0,753	0,377	0,429	0,715
α-AP von Isoleucin	0,826	-0,709	-0,823	-0,929
α-AP von Leucin	0,607	-0,830	-0,894	-0,744
<b>Gouda</b>				
ε-AP von Lysin	-0,497	0,433	0,262	0,596
α-AP von Lysin	0,860	-0,615	-0,584	-0,729
α-AP von Valin	-0,493	0,643	0,436	0,740
α-AP von Isoleucin	0,150	-0,439	-0,166	-0,526
α-AP von Leucin	0,421	-0,818	-0,835	-0,713

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Untersuchungen von Amadori-Produkten in Milchprodukten

α-FMAS als Marker der Frühphase der Maillard-Reaktion wurden am N-Terminus von Peptiden und freien Aminosäuren erstmalig in verschiedenen Schmelzkäsen und Käsesorten sowie weiterer proteinhaltiger Rohwaren zur Herstellung von Schmelzkäseerzeugnissen charakterisiert. Eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen kann anhand der analysierten ε- als auch α-AP durchgeführt werden. Vergleichbar zu den meisten bislang diskutierten Messgrößen ist jedoch auch anhand

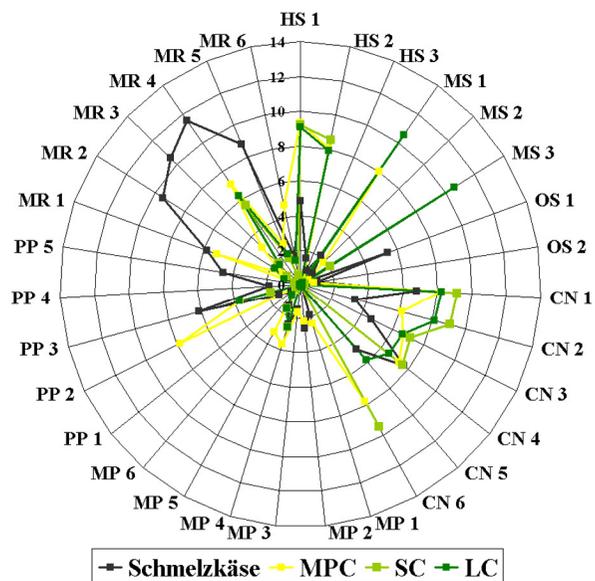
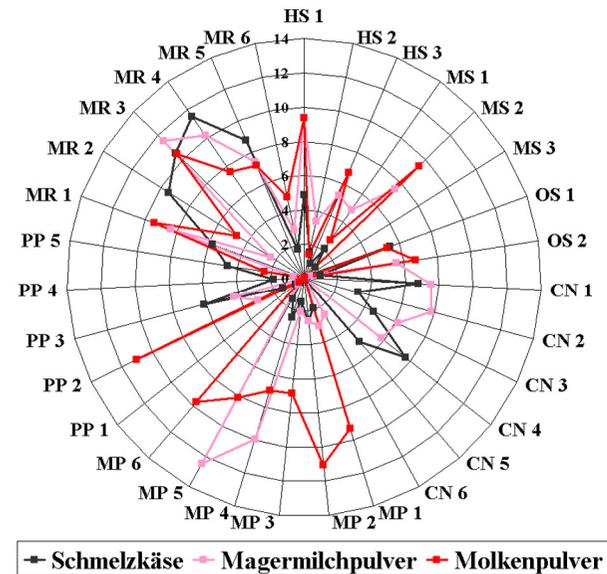
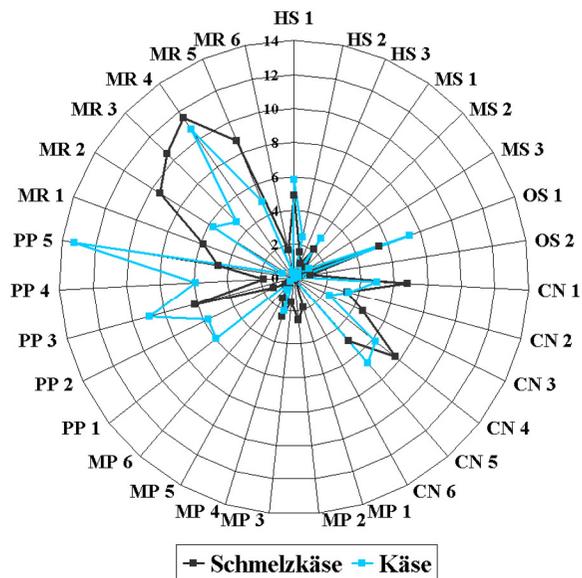
der Amadori-Produkte keine eindeutige Abgrenzung der Rohwaren Käse, SC, LC, MPC, MMP sowie MP in Schmelzkäsematrices möglich. Mit fortschreitender Reifung konnte in handelsüblichen Käsen ein vergleichbares, absinkendes Verhältnis von  $\alpha$ - zu  $\varepsilon$ -AP beobachtet werden. Dieses kann jedoch nur unter Berücksichtigung der Käsesorte zur Beurteilung des Reifungsverlaufes herangezogen werden. Als universeller Marker der Käsureifung sind  $\alpha$ -AP als auch  $\varepsilon$ -AP somit nur begrenzt geeignet. Im Vergleich zu thermisch stärker behandelten Lebensmitteln ist die Blockierung essentieller Aminosäuren durch die Bildung von Amadori-Produkten sowohl in Käsen als auch Schmelzkäsen vernachlässigbar gering.

#### 4.4 Zusammenfassung der univariaten Statistik – Möglichkeiten und Grenzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird anhand ausgewählter Parameter eine quantitative Abschätzung des Käseanteils in Schmelzkäsen vorgenommen. Dazu wurden 55 unterschiedliche chemische Messgrößen definiert und anschließend handelsübliche Schmelzkäse, Schmelzkäse mit bekannter Zusammensetzung sowie Rohwaren zu deren Herstellung untersucht. Abbildung 4.55 fasst die in den vorherigen Abschnitten dargelegten Ergebnisse als gemittelte Werte in Netzdiagrammen zusammen. Um all diese in einem einheitlichen Skalenbereich darzustellen, wurde mittels einfacher mathematischer Rechenoperationen eine Normierung des Datensatzes durchgeführt.

Anhand der dimensionslosen, aufgetragenen Zahlenwerte ist kein direkter Rückschluss mehr auf die analytisch erfassten Konzentrationen der Messgrößen in den Proben zu ziehen. Die Abstufungen innerhalb einer Messgröße repräsentieren jedoch noch immer die exakt ermittelten Unterschiede zwischen den analysierten Schmelzkäsen, Käsen und Proteinpulvern.

Die analysierten Rohwaren Käse (Abb. 4. 55, links, oben), Trockenmilch- und Molkeerzeugnisse (MMP, MP; Abb. 4. 55, rechts oben) sowie Milcheiweißerzeugnisse (MPC; SC LC; Abb. 4. 55, links unten) wurden jeweils im Vergleich zu Schmelzkäse abgebildet. Bei der Gegenüberstellung der Rohwaren zu Schmelzkäse sowie zueinander wird ersichtlich, dass einige Messgrößen eindeutig für nur eine oder zwei Rohwaren charakteristisch sind. Weiterhin können Messgrößen identifiziert werden, deren spezifische Aussage im Sinne der Zielstellung wenig ausgeprägt ist. Die nachfolgend dargestellte Tabelle (Tab. 4. 9) basiert auf den bisher dargelegten Ergebnissen sowie der Abb. 4. 55 und fasst deren Erkenntnisse zusammen. Die jeweils angegebenen Kreuze stellen ein Maß für die Wertigkeit der verschiedenen Messgrößen zur Unterscheidung von Schmelzkäse und dessen Rohwaren dar.



**Abb. 4.55** Mittelwerte ausgewählter analytischer Messgrößen der Schmelzkäse-Rohwaren, Käse (24), Magermilchpulver (5), Molkenpulver (6), Milchproteinkonzentrat (MPC, 2), Säurecasein (SC, 5) und Labcasein (LC, 4) im Vergleich zu Schmelzkäse (60). [Darstellung der auf ein Skalenniveau von 0 bis 14 normierten Messgrößen, wobei die Abstände der Messwerte innerhalb der einzelnen Messgrößen zueinander konstant gehalten wurden. Die in Klammern angegebenen Zahlenwerte repräsentieren, die jeweils untersuchte Probenanzahl.]  
 HS – Hauptinhaltsstoffe: 1 – Trockenmasse, 2 – Proteingehalt, 3 – Lactose  
 MS – Mineralstoffe: 1 – Calcium, 2 – Kalium, 3 – Quotient Calcium / Kalium  
 OS – organische Säuren: 1 – Milchsäure, 2 – Orotsäure, CN – Casein: 1 – intaktes Casein, 2 –  $\alpha_{S2}$ -CN, 3 –  $\alpha_{S1}$ -CN, 4 –  $\beta$ -CN, 5 – para- $\kappa$ -CN, 6 –  $\kappa$ -CN, MPr – Molkenprotein: 1 –  $\beta$ -LG, 2 –  $\alpha$ -LA, 3 – % MP (SDS-PAGE), 4 – Cystin, 5 – % MP (Cystin), 6 – Caseinomakropeptid, PP – Proteolyseprodukte: 1 – NPN, 2 – WLN, 3 – Peptide kleiner 24 kDa, 4 – Peptide kleiner 10 kDa, 5 – freie Aminosäuren (Summe), MR – Maillard-Reaktionsprodukte: 1 –  $\epsilon$ -AP (Lysin), 2 –  $\alpha$ -AP (Lysin), 3 –  $\alpha$ -AP (Isoleucin), 4 –  $\alpha$ -AP (Leucin), 5 – Summe  $\alpha$ -AP, 6 – Quotient  $\epsilon$ -AP /  $\alpha$ -AP

**Tab. 4.9** Zuordnung der gewählten Messgrößen zu den jeweils charakterisierenden Schmelzkäse-Rohwaren Käse, Magermilchpulver, Molkenpulver und Milcheiweißerzeugnisse (Säurecasein, Labcasein; Milchproteinkonzentrat). [Die Anzahl an Kreuzen repräsentiert die Wichtung der jeweiligen Messgröße].

Analytische Messgröße	Käse	Magermilchpulver	Molkenpulver	Milcheiweiß-Erzeugnisse
<b>Hauptinhaltsstoffe</b>				
Trockenmasse	x			xxx
Gesamtprotein				xxx
Lactose	x	xx	xxx	
<b>Mineralstoffe</b>				
Calcium	x	x		xxx (Labcasein) xx (MPC)
Kalium		xx	xxx	
<b>Organische Säuren</b>				
Milchsäure	xx		x	
Orotsäure		x	xxx	
<b>Casein</b>				
intaktes Casein	x	xx		Xxx
$\alpha_{S2}$ -CN		xx		xxx
$\alpha_{S1}$ -CN		xx		xxx
$\beta$ -CN	x	xx		xxx
para- $\kappa$ -CN	xx			xx (SC)
$\kappa$ -CN		x		xxx (SC) xx (MPC)
<b>Molkenprotein</b>				
$\alpha$ -LA / $\beta$ -LG		x	xxx	
Cystinwert (% Gesamtmolkenprotein)		xxx	xx	
Caseinomakropeptid			xxx	
<b>Proteolyseparameter</b>				
NPN	xx			
WLN	x		xxx	x (MPC)
Peptide kleiner 24 kDa	xx	x		
Peptide kleiner 10 kDa	x			
freie Aminosäuren	xxx			
<b>Maillard-Reaktionsprodukte</b>				
$\epsilon$ -AP (Lysin)	x	xxx	xxx	x (MPC)
$\alpha$ -AP (Lysin)	x	x	x	
$\alpha$ -AP (Leucin)	x	xxx	xxx	
$\alpha$ -AP (Isoleucin)	xxx	xxx	xx	xx
$\alpha$ -AP (Summe)	x	xx	xx	
Quotient $\alpha$ -AP / $\epsilon$ -AP		x	x	x (MPC)

Für Käse als wertgebende Rohware in Schmelzkäsen können anhand der bisherigen Untersuchungen vor allem Marker der abgelaufenen Proteolyse als Charakteristikum festgestellt werden. Dazu zählen der NPN, die per SDS-PAGE bestimmte Verteilung

der Peptide in die unterschiedlichen Größenbereiche sowie das Spektrum und die Einzelgehalte der freien Aminosäuren. Ersichtlich wird dies durch die ausgeprägten Werte von Käse im Bereich der Proteolyseparameter PP 1 bis 5 im Vergleich zu Schmelzkäse, Milcheiweißerzeugnissen sowie Molke- und Trockenmilcherzeugnissen. Die einzige Ausnahme bildet in diesem Kontext der WLN (PP 2), welcher sowohl in MPC als auch MMP und MP in hohen Konzentrationen vorkommt. Ursächlich hierfür ist nicht etwa eine fortgeschrittene Proteolyse sondern vielmehr das Vorhandensein von Molkenproteinen, welche im Gegensatz zu den Caseinen unter den gegebenen Bedingungen (wasserlöslicher Stickstoff bei pH 4,6 ermittelt) weiterhin löslich bleiben. Im Schmelzkäse kann ein erhöhtes Vorkommen größerer Peptide, wie es beispielsweise für kurz gereifte Käsematrices üblich ist, durch Zusatz dieser Proteinpulver somit vorgetäuscht werden. Als weitere vielversprechende Messgröße zur Bestimmung des Käseanteils konnte Milchsäure ermittelt werden. Viele andere untersuchte Messgrößen sind in geringen bis mittleren Gehalten in Käsen zu finden. Dazu zählen neben den Maillard-Reaktionsprodukten vor allem die untersuchten Hauptinhaltsstoffe (Trockenmasse sowie Lactose). Charakteristisch sind letztere für Käse jedoch nicht. Ursächlich hierfür ist zum Einen die große Streuung, welche zwischen den verschiedenen Käsesorten auftritt. Zum Anderen weisen diese Messgrößen zum Teil deutlich höhere Gehalte in anderen Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung auf und können somit eher als Charakteristikum für diese herangezogen werden.

Für die molkenproteinhaltigen Rohwaren Magermilchpulver sowie Molkenpulver wurden im Gegensatz zum Käse die mittels SDS-PAGE bestimmten Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin sowie der Cystinwert ermittelt. Neben diesen klassischen proteinchemischen Parametern (Abb. 4. 55 rechts oben, MPr 1 bis 6) konnten als charakteristische Messgrößen ebenso Kalium, Orotsäure und Lactose ermittelt werden. Alle diese Messgrößen sind weder in Käsen noch Milcheiweißerzeugnissen nachweisbar. Anhand des Nachweises dieser in Schmelzkäsen kann somit eindeutig auf einen Zusatz an Magermilchpulver und Molkenpulver geschlossen werden. Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Proteinpulvern kann schließlich basierend auf den unterschiedlichen Konzentrationen der Messgrößen gezogen werden, da Molkenpulver in all diesen analytischen Parametern deutlich höhere Anteile als Magermilchpulver aufweist. Weiterhin kann Caseinomakropeptid eindeutig zur Bestimmung des Molkepulver-Anteils angewendet werden, da dieses nur darin nachweisbar ist. Magermilchpulver enthält im Vergleich dazu noch geringe Mengen an intaktem  $\kappa$ -Casein.

Im Gegensatz zu Käse und Molkenprotein-haltigen Zusätzen sind die Milcheiweißerzeugnisse Säurecasein, Labcasein sowie Milchpulverkonzentrat durch hohe Gehalte an intaktem Casein, der einzeln mittels SDS-PAGE bestimmten Caseinfraktionen, des Gesamtproteingehaltes sowie der Trockenmasse gekennzeichnet.

Dargestellt ist dies durch charakteristische Peaks im Bereich der analysierten Messgrößen CN 1 bis 6 sowie HS 1 und 2 in **Abb. 4. 55** links unten. Eine weitere Unterscheidung zwischen diesen Milcheiweißerzeugnissen kann mittels intaktem  $\kappa$ -Casein sowie hohen Calciumgehalten vorgenommen werden. Ersteres spricht dabei für einen Zusatz an Säurecasein oder Milchpulverkonzentrat. Hohe Calciumgehalte in Schmelzkäsen deuten hingegen auf den Zusatz von Labcasein bzw. Milchpulverkonzentrat hin. Labcasein ist außerdem durch einen hohen Eintrag von para- $\kappa$ -Casein gekennzeichnet.

Die dargelegten Messgrößen sind größtenteils zur signifikanten Unterscheidung der untersuchten Schmelzkäse untereinander geeignet. Eine genaue Zuordnung der Messgrößen zu den jeweils charakterisierenden Schmelzrohwaren ergibt mit Ausnahme von Caseinomakropeptid, welches allein nur in Molkeerzeugnissen zu finden ist, jedoch häufig Überschneidungen. Dabei sind einzelne Messgrößen nicht nur für eine Rohware spezifisch, was zur Folge hat, dass eine Abgrenzung der Rohwaren in Schmelzkäse sowie deren Quantifizierung allein durch die Analyse einzelner Messgrößen nicht möglich ist. Der gleiche Ausgangsrohstoff Milch, aus welchem alle interessierenden Schmelzrohwaren hergestellt werden, sowie die große Diversität des Rohstoffes Käse begrenzen die Möglichkeiten der Auswertung dieser Messgrößen zusätzlich. Weiterhin werden aus technologischer und ökonomischer Sicht heutzutage nicht nur einzelne Zusätze sondern zumeist Mischungen dieser zur Herstellung von Schmelzkäsen eingesetzt. Infolgedessen können Überlagerungen und Aufhebungen charakteristischer Messgrößen eintreten, welche einzeln betrachtet einen großen Spielraum für Über- sowie Unterschätzungen bieten und damit zu Fehlinterpretationen führen können. Um diese Limitierungen auszuräumen, sollen im Anschluss multivariate Analyseverfahren, welche alle einzelnen Messgrößen mathematisch miteinander kombinieren, angewendet werden. Die Aussagekraft einzelner Messgrößen kann so deutlich gesteigert werden. Die zur multivariaten Datenanalyse erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargelegt.

#### **4.5 Analyse der Messparameter mittels multivariater Analyseverfahren**

Aufbauend auf den im vorherigen Abschnitt zusammengefassten, bislang erzielten Ergebnissen werden ausgewählte Methoden der multivariaten Datenanalyse angewendet, um folgende Fragestellungen zu klären.

1) Sind die analysierten Schmelzkäse mittels der gewählten chemischen Messgrößen eindeutig voneinander unterscheidbar und ist anhand dieser eine Gruppierung der Schmelzkäse nach dem enthaltenen Käseanteil möglich?

2) Welche der untersuchten Messgrößen sind am aussagekräftigsten für die untersuchten Schmelzkäse? Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Klärung inwieweit weniger selektive Messgrößen aus dem Datensatz entfernt werden können.

3) Können, aufbauend auf den bisher dargelegten Ergebnissen, mittels multivariater Datenanalyse den Rohwaren charakteristische einzelne Messgrößen zugeordnet werden, anhand derer eine anteilige Quantifizierung in Schmelzkäsen möglich ist?

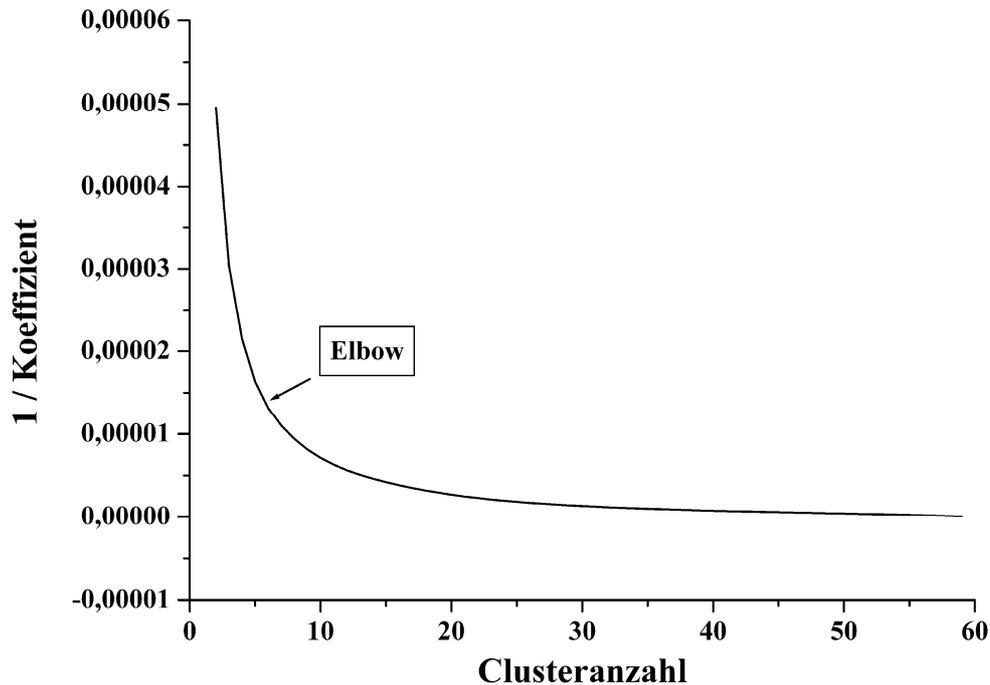
Dabei werden sowohl klassische Verfahren der unüberwachten (Clusteranalyse, Faktorenanalyse) als auch überwachten Datenanalyse (Korrelationsanalyse, Varianzanalyse, Diskriminanzanalyse) eingesetzt. Eine kurze Darstellung der theoretischen Hintergründe der einzelnen Methoden ist den Abschnitten 2.4.1 bis 2.4.5 zu entnehmen.

#### 4.5.1 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse als unüberwachtes Verfahren der multivariaten Analyseverfahren fasst schrittweise die Objekte des Datensatzes anhand von ähnlichen Eigenschaften (Messgrößen) zu Clustern zusammen. Ziel der Einteilung ist es dabei Objekte mit möglichst ähnlichen Eigenschaften innerhalb eines Clusters zusammenzufassen, wohingegen die Cluster untereinander möglichst inhomogen sein sollen.

Durchgeführt wurde diese multivariate Datenanalyse als hierarchische Variante mittels der Software SPSS 15.0. Dazu wurden zunächst alle 55 analysierten Messgrößen für die Schmelzkäse und parallel für die entsprechenden Rohwaren als Eingruppierungsmerkmale gewählt. Unabhängig von einer Wichtung einzelner Messgrößen ist das Ziel dieser Analyse, herauszufinden inwieweit die untersuchten Proben anhand der gewählten analytischen Messgrößen generell unterscheidbar sind oder nicht. Die für die 60 Schmelzkäseproben erhaltenen Ergebnisse der Clusteranalyse sind nachfolgend graphisch als Dendrogramm zusammengefasst (Abb. 4. 57). Als Fusionierungsalgorithmus wurde die Ward-Methode mit dem quadrierten Euklidischen Abstand als Proximitätsmaß gewählt. Anhand dieser Darstellung wird die Fusionierung der Schmelzkäse zu einzelnen Clustern sehr gut veranschaulicht, wobei die Hauptanzahl der Proben ( $n=58$ ) in etwa 5 gleich große Gruppen eingeteilt werden kann. Diese sind zueinander noch recht homogen, weisen jedoch auch Unterschiede auf. Die Ausnahme hierzu bilden die Proben SK25 und SK38. Beide stammen vom gleichen Hersteller und sind anhand der 55 untersuchten Messgrößen als deutlich abweichend zu den anderen analysierten Schmelzkäsen zu betrachten, weshalb diese einen eigenen Cluster bilden. Zur Bestimmung der optimalen Clusteranzahl werden die mittels des Ward-Verfahrens für die schrittweise Fusionierung erhaltenen Koeffizienten gegen die Clusteranzahl aufgetragen. Dargestellt ist dies in nachfolgend abgebildeter Grafik (Abb. 4. 56). Die

optimale Clusteranzahl ergibt sich schließlich aus der visuellen Bestimmung des „Elbow“ in der resultierenden Funktion (Backhaus et al. 2006).

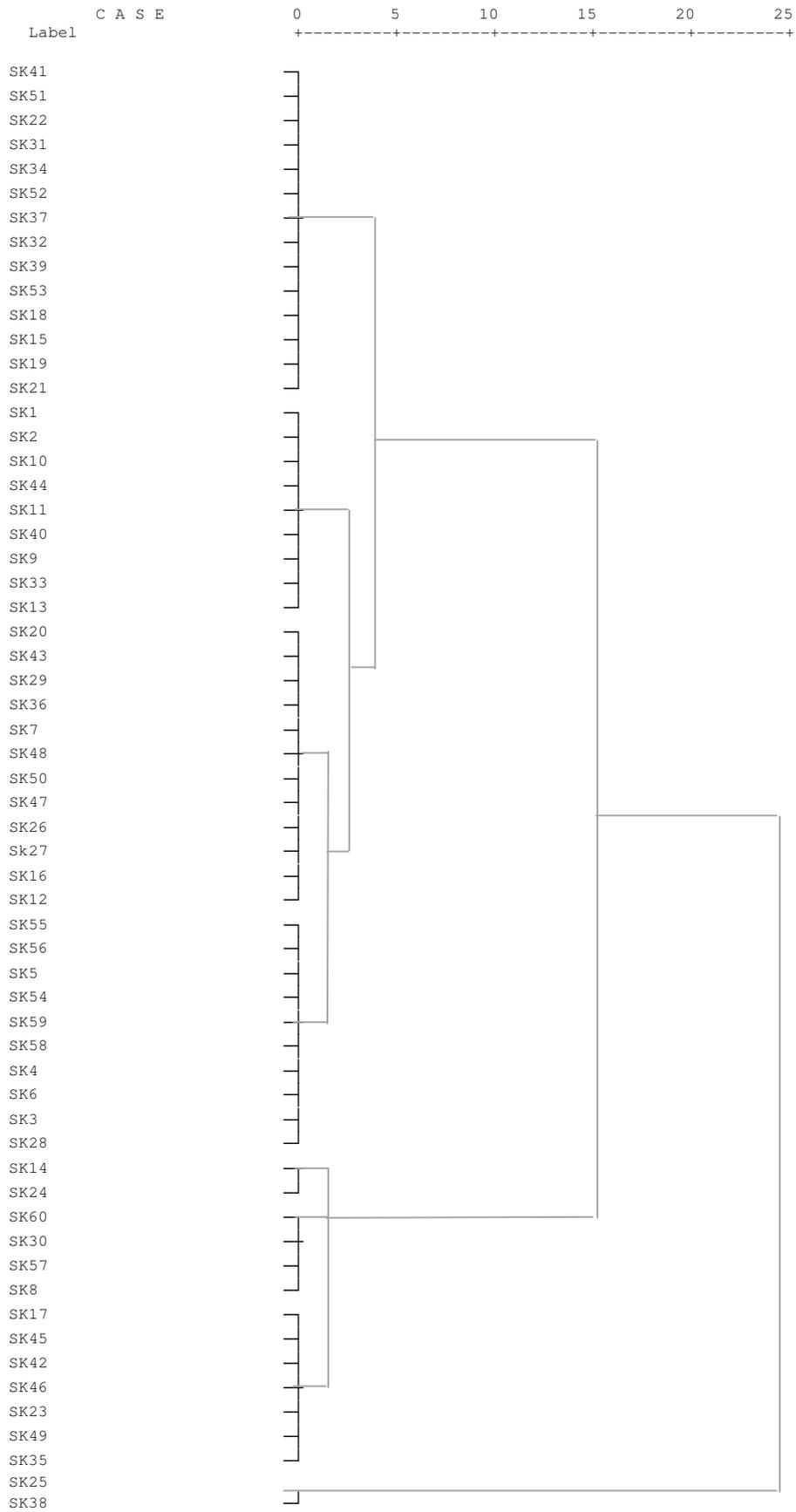


**Abb. 4.56** Ermittlung der optimalen Clusteranzahl für die hierarchische Clusteranalyse der handelsüblichen Schmelzkäse anhand des Elbow-Verfahrens.

Als optimale Anzahl werden in diesem Fall sechs Cluster ermittelt. Die jeweilige Zuordnung der untersuchten Proben zum jeweiligen Cluster ist der abgebildeten **Tab. 4.10** zu entnehmen.

**Tab. 4.10** Zuordnung der untersuchten handelsüblichen Schmelzkäse zu den ermittelten Clustern.

Cluster	1	2	3	4	5	6
SK-Proben	1-2, 9-11, 13, 33, 40, 44	3-6, 28, 54-56, 58- 59	8, 14, 17, 23-24, 30, 35, 42, 45- 46, 49, 57, 60	7, 12, 16, 20, 26-27, 29, 36, 43, 47-48, 50	15, 18-19, 21-22, 31- 32, 34, 37, 39, 41, 51- 53	25, 38
Anzahl	9	10	13	12	14	2



**Abb. 4.57** Dendrogramm erhalten nach Anwendung des Ward-Verfahrens zur Verdeutlichung der Fusionierung der handelsüblichen Schmelzkäseproben.

Zur Bewertung der Homogenität der gefundenen Cluster wird anschließend der F-Wert berechnet. Dieser wird für jede Variable einer Gruppe ermittelt und kann als Maß für die Streuung dieser Variable im Cluster im Vergleich zur Erhebungsgesamtheit herangezogen werden. F-Werte kleiner 1 zeigen dabei Homogenität an. Als weiteren Parameter zur Interpretation der Cluster wird der t-Wert ermittelt. Dieser ist im Vergleich zum F-Wert kein Maß für die Güte des Clusterungsprozesses, sondern charakterisiert vielmehr den jeweiligen Cluster hinsichtlich der Repräsentanz der einzelnen Variablen im Vergleich zur Erhebungsgesamtheit. Positive t-Werte zeigen dabei an, dass eine Variable im Vergleich zum gesamten Datensatz überrepräsentiert ist. Unterrepräsentierte Variablen sind hingegen durch negative t-Werte charakterisiert. Die Berechnung des F- und t-Wertes erfolgt nach den im Abschnitt 3.7.2 angegebenen Formeln. (Backhaus et al. 2006). Die Ergebnisse der F- und t-Wertberechnung des Clusterungsverfahrens der Schmelzkäse sind in Tab. 4. 11 aufgelistet.

**Tab. 4. 11** Charakterisierung der Homogenität der Cluster und Interpretation der Cluster anhand der F- und t-Werte. Als F-Werte der jeweiligen Cluster wurden die relativen prozentualen Anteile an Messgrößen, welche homogen sind, angegeben.

Cluster	F-Wert [%]	Messgrößen mit positivem t-Wert	Bemerkung
1	73	CMP, Cystin, Quotient AP, $\epsilon$ -AP, intaktes CN, CN-Fraktionen $\alpha_{S1}$ , $\alpha_{S2}$ und $\beta$ , Lactose, Orotsäure, Milchsäure	Messgrößen weisen auf MMP und MP hin
2	80	freie Aminosäuren, $\alpha$ -AP, $\gamma$ -CN, Peptide, WLN, Proteingehalt, TM	Messgrößen deuten auf Käse und LC hin
3	81	Calcium, freie Aminosäuren, WLN, NPN, Proteingehalt, TM	Messgrößen deuten auf Käse und LC hin
4	85	CMP, Molkenprotein, $\alpha$ -LA, $\beta$ -LG, Cystin	Messgrößen weisen auf MP hin
5	81	Kalium, $\beta$ -LG, Quotient NPN / WLN	Messgrößen weisen auf MMP und MP hin
6	83	Calcium, $\kappa$ -CN	Messgrößen weisen auf SC bzw. Ca-Caseinat hin

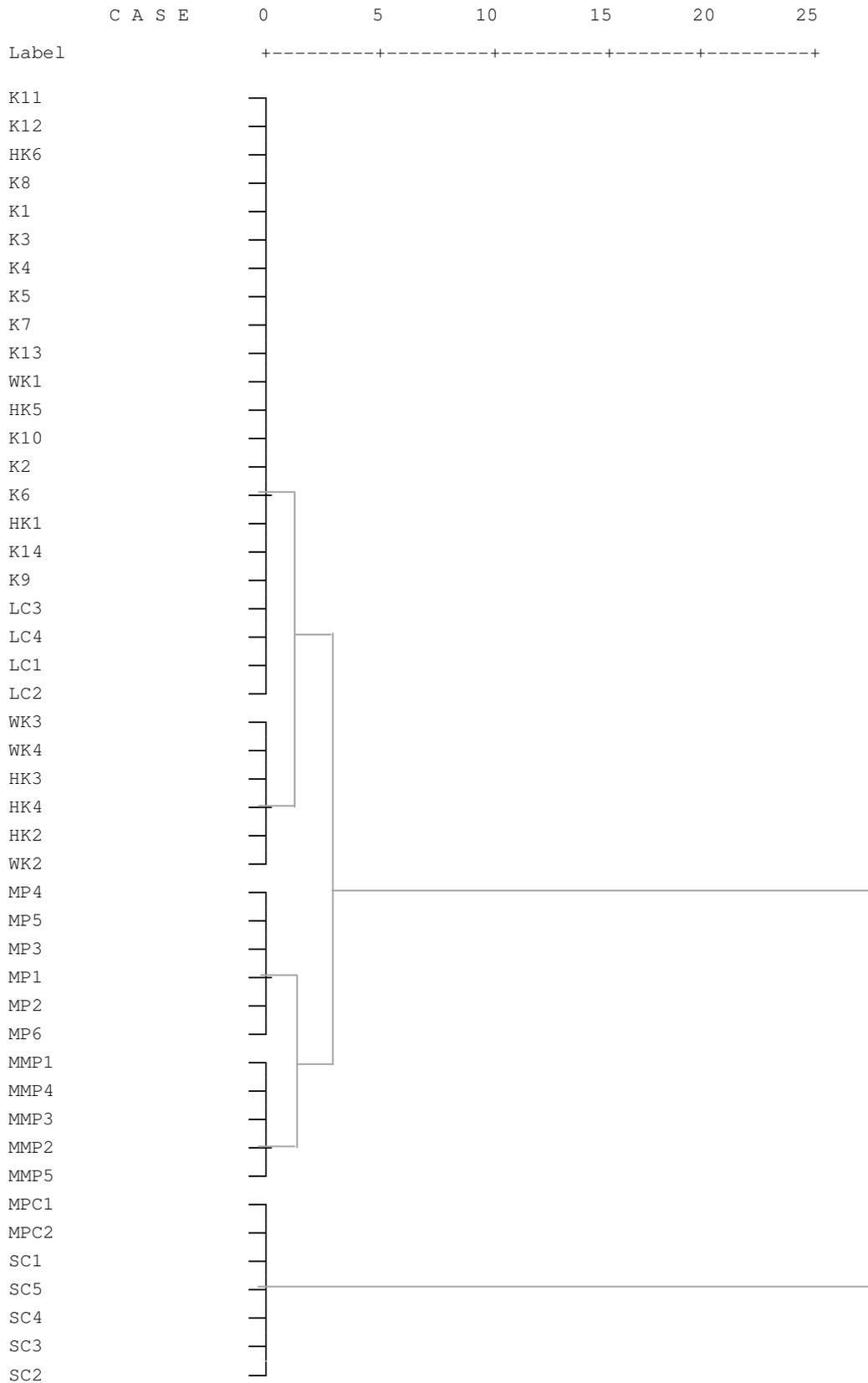
Anhand der ermittelten F-Werte kann die Homogenität der einzelnen Cluster als sehr gut bezeichnet werden. Im Durchschnitt weisen 80 % der Messgrößen in den Clustern Homogenität im Bezug zum Gesamtdatensatz auf. Die restlichen 20 % der Messgrößen, welche nicht homogen sind, tragen zur Güte des Clusterungsprozesses somit nicht bei und können gegebenenfalls nach weiterer Prüfung vom Datensatz eliminiert werden.

Zur Interpretation der Cluster werden die in der jeweiligen Gruppe positiven t-Werte analysiert. Diese fallen in den 6 verschiedenen Clustern z.T. deutlich

abweichend aus. Basierend darauf können für den Cluster 1, 4 und 5 Messgrößen, welche eindeutig einen Zusatz an MMP und MP charakterisieren, als überrepräsentiert gefunden werden. Im Gegensatz dazu sind die Cluster 2 und 3 eher durch Messgrößen gekennzeichnet, welche einen Käse- oder LC-Anteil im Schmelzkäse andeuten. Die in den Cluster 6 eingruppierten 2 Proben (SK25, SK38) weisen sehr hohe t-Werte nur für die Messgrößen Calcium und  $\kappa$ -Casein auf. Dies lässt vermuten, dass zur Herstellung dieser Schmelzkäse v.a. SC bzw. Ca-Caseinat eingesetzt wurde.

Parallel zum Schmelzkäsedatensatz wurde ebenso der Datensatz der Rohwaren (Käse, MMP, MP, LC sowie SC) mit allen 55 Messgrößen anhand einer Clusteranalyse untersucht. Die dazu erhaltenen Daten sind nachfolgend als Dendrogramm (Abb. 4. 58) dargestellt. Anhand dieses können visuell sehr anschaulich 5 Cluster identifiziert werden. Zur Bestimmung der optimalen Clusteranzahl werden die, mittels des Ward-Verfahrens für die schrittweise Fusionierung erhaltenen, Koeffizienten gegen die Clusteranzahl aufgetragen. Anhand dieser Auswertung wurde die bereits visuell bestimmte Anzahl an Cluster für diese Fusionierung bestätigt. Die nachfolgend dargestellte Tabelle (Tab. 4. 12) fasst die jeweilige Zuordnung der untersuchten Proben zum jeweiligen Cluster sowie die Ergebnisse der F- und t-Wertberechnung des Clusterungsverfahrens für die untersuchten Rohwaren zur Herstellung von Schmelzkäsen zusammen.

Die untersuchten Rohwaren Käse, Milcheiweiß-, Trockenmilch- sowie die Trockenmolkeerzeugnisse können anhand der gewählten Messgrößen sehr gut mittels der Clusteranalyse in unterschiedliche Cluster eingeteilt werden. Die berechneten F-Werte wiesen mit 82 bis 98 % eine sehr gute Homogenität der Messgrößen innerhalb der Cluster im Vergleich zum Gesamtdatensatz auf. Die bereits anhand der univariaten Datenanalyse gewonnenen Erkenntnisse zu Rohwaren-typischen Messgrößen (Abschnitt 4.4, Tab. 4. 9) können anhand der Bestimmung der t-Werte dieser Cluster bestätigt werden. Alle untersuchten Käse und Labcaseine werden in Cluster 1 und 2 wiedergefunden. Durchschnittlich überrepräsentiert sind in Cluster 1 und 2 die Messgrößen Milchsäure, para- $\kappa$ -CN, Peptide (NPN, WLN), die freien Aminosäuren sowie die  $\alpha$ -AP. Charakteristisch für Cluster 1 sind weiterhin die Calciumgehalte sowie die Anteile an intaktem Casein. Letztere sind dabei v.a. für Labcasein kennzeichnend. Je nach Reifegrad sinken die Gehalte an intaktem Casein in Käsen dabei zugunsten der Bildung von Peptiden und freien Aminosäuren. Wenig bis mittel gereifte Käse sind in deren Eigenschaften LC noch immer sehr ähnlich. Hartkäse und Weichkäse zeigen hingegen größere Abweichungen, was zur Folge hat, dass diese zum größten Teil in einen eigenständigen Cluster (2) eingruppiert werden.



**Abb. 4. 58** Dendrogramm erhalten nach Anwendung des Ward-Verfahrens zur Verdeutlichung der Fusionierung der untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung.

**Tab. 4. 12** Zuordnung der untersuchten Rohwaren zur Schmelzkäseherstellung zu den ermittelten Clustern sowie die Charakterisierung der Homogenität der Cluster und deren Interpretation anhand der F- und t-Werte. Als F-Werte der jeweiligen Cluster wurden die relativen prozentualen Anteile an Messgrößen, welche homogen sind, angegeben.

Cluster	Proben	Anzahl	F-Wert	Messgrößen mit positivem t-Wert	Bemerkung
1	K1-K14, HK1, HK5-K6, WK1 LC1-LC4	22	86 %	Ca, $\alpha$ -AP, freie AS, Peptide, para- $\kappa$ -CN, intaktes CN, Milchsäure	Käse und LC charakt. Messgrößen
2	HK2-HK4 WK2-WK4	6	82 %	$\alpha$ -AP, freie AS, Peptide, NPN, WLN, para- $\kappa$ -CN, Milchsäure	gereifte Käse charakt. Messgrößen
3	MMP1 bis MMP5	5	96 %	TM, Lactose, Orotsäure, intaktes CN, Molkenproteine, Kalium, $\epsilon$ -AP, Cystin, $\kappa$ -CN	MMP charakt. Messgrößen
4	SC1-SC5 MPC1, MPC2	7	95 %	TM, Protein, intaktes CN, $\kappa$ -CN	SC / MPC charakt. Messgrößen
5	MP1-MP6	6	98 %	TM, Lactose, Orotsäure, Milchsäure, Molkenproteine, Kalium, $\epsilon$ -AP, Cystin, CMP	MP charakt. Messgrößen

Im Gegensatz dazu sind Cluster 3 und 5, welche nur MMP bzw. MP enthalten durch die Messgrößen TM, Lactose, Orotsäure, Molkenproteine, Kalium, den Cystinwert sowie die  $\epsilon$ -AP überrepräsentiert. Eine Unterscheidung beider Cluster kann nur anhand der Messgrößen intaktes CN,  $\kappa$ -CN, Milchsäure und CMP voneinander erfolgen. Für MMP sind dabei die Proteinparameter (intaktes CN,  $\kappa$ -CN) kennzeichnend. CMP und Milchsäure sind im Vergleich dazu als MP-charakterisierende Messgrößen zu nennen. Alle untersuchten SC und MPC konnten anhand der durchgeführten Clusteranalyse ebenso vom Rest des Datensatzes abgegrenzt werden. Diese finden sich in Cluster 4 wieder, welcher durch die Messgrößen TM, Protein, intaktes CN und  $\kappa$ -CN im Vergleich zum Gesamtdatensatz überrepräsentiert ist.

Mittels der durchgeführten Clusteranalyse ist es möglich den heterogenen Datensatz der handelsüblichen Schmelzkäse in 6 Cluster einzuteilen. Die Proben innerhalb der Cluster weisen geringere Unterschiede auf. Die Cluster zueinander unterscheiden sich jedoch deutlich. Dies gilt v.a. für Cluster 6, welcher nur 2 Proben enthält. Eine Abgrenzung der Schmelzkäse zueinander ist anhand der gewählten Messgrößen somit qualitativ möglich. Ebenso konnte für die jeweiligen Cluster eine grobe Zuordnung der eingesetzten Rohwaren getroffen werden, welche auf den Erkenntnissen der Clusteranalyse der Rohwaren basiert. Anhand der t-Werte ist es möglich den Rohwaren

Käse, LC, MMP, MP sowie SC charakteristische Messgrößen zu zuordnen. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen dabei die bereits nach Auswertung der univariaten Datenanalyse (Abschnitt 4.4) getroffenen Aussagen.

#### 4.5.2 Messvariablenreduktion mittels Korrelations- und Varianzanalyse

Mittels der beiden in diesem Abschnitt dargelegten Verfahren sollen weniger selektive Messgrößen, welche keinen oder nur einen geringen Beitrag zur Differenzierung zwischen den Schmelzkäseproben des Datensatzes aufweisen, eliminiert werden. Ziel ist es dabei, möglichst wenige Messgrößen mit einer hohen Aussagekraft bei gleichzeitig minimalem Verlust an Information zu erhalten. Vor Beginn der Analyse wurde der Datensatz zunächst auf Normalverteilung überprüft. Dazu wurde ein Test nach Kolmogorov-Smirnov sowie nach Shapiro-Wilk durchgeführt. Außerdem wurden von allen Messgrößen die Histogramme sowie die Q\*Q Plots visuell bewertet. Nach Auswertung beider Verfahren wurden 11 Messgrößen des Datensatzes als nicht normalverteilte ermittelt, welche nach Transformation (Logarithmierung) als normalverteilte Messvariablen für alle weiteren multivariaten Datenanalyseverfahren zur Verfügung standen.

##### 4.5.2.1 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse als Vertreter der überwachten Verfahren kann vielseitig und flexibel zur Beschreibung und Erklärung von Abhängigkeiten und Zusammenhängen zwischen verschiedenen Merkmalen angewendet werden. In der vorliegenden Studie wurde mittels des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) nach linearen Zusammenhängen zwischen Variablen gesucht, dabei war es zweckmäßig diese zunächst sinnvoll zu Gruppen (Tab. 4. 13) zusammenzufassen.

Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten nach Pearson können dabei wie folgt eingeteilt werden:  $|r| > 0,9$  sehr hohe Korrelation,  $|r| > 0,80$  hohe Korrelation,  $|r| > 0,7$  erhöhte Korrelation sowie  $|r| < 0,7$  nur eine geringe bis  $|r| = 0$  keine Korrelation zweier Messgrößen. Ob eine positive oder negative (indirekte) Korrelation vorliegt bestimmt das Vorzeichen. Ziel der Korrelationsanalyse in vorliegender Studie ist dabei die Reduzierung des gesamten Datensatzes auf nur noch miteinander nicht korrelierter Variablen ( $|r| < 0,7$ ), durch Eliminierung einer der miteinander signifikant linearen Variablen.

**Tab. 4.13** Unterteilung der Messgrößen nach thematischen Schwerpunkten. \*Messgrößen welche transformiert wurden

Kategorie	Messgrößen
<b>Caseine</b>	intaktes CN, $\alpha_{S2}$ -CN, $\alpha_{S1}$ -CN, $\beta$ -CN, para $\kappa$ -CN, $\kappa$ -CN*, % SC
<b>Molkenproteine</b>	$\alpha$ -LA, $\beta$ -G, % MPr (SDS-PAGE), Cystinwert, % MPr (ASA), Caseinomakropeptid (CMP), % MPr (HPLC)
<b>Proteolyseparameter</b>	NPN, WLN, Quotient (NPN/WLN), Peptide zw. 24-10 kDa, Peptide kleiner 10 kDa*, $\gamma$ -CN, Summenparameter freie AS, Einzelgehalte der jeweiligen freien AS* (20) (9 davon transformiert)
<b>Organische Säuren</b>	Milchsäure, Orotsäure, Quotient org. Säuren
<b>Maillard -Reaktionsprodukte</b>	$\epsilon$ -AP-Fur, $\alpha$ -AP des Lysins, Leucins und Isoleucins, Summe $\alpha$ -AP, Quotient $\epsilon$ -AP/ $\alpha$ -AP
<b>Mineralstoffe</b>	Kalium, Calcium, Quotient Mineralstoffe
<b>Hauptkomponenten</b>	Trockenmasse, Lactose, Gesamtprotein

Die anhand der durchgeführten Analyse erhaltenen erhöhten bis sehr hohen Korrelationen sind nachfolgend für die einzelnen Kategorien in **Tab. 4.14** aufgelistet. Besonders viele miteinander korrelierte Messgrößen sind in der Kategorie der Proteolyseparameter zu lokalisieren. Dabei sind alle einzelnen Aminosäuren sehr gut mit dem berechneten Summenparameter der freien AS, dem NPN sowie zum Teil auch untereinander korreliert. Infolgedessen konnten diese alle eliminiert und nur die Summe der freien AS sowie der NPN im Datensatz belassen werden. Weitere korrelierte Messgrößen wurden in der Gruppe der Caseine und Molkenproteine aber auch innerhalb der organischen Säuren und Maillard-Reaktionsprodukte gefunden. Keinerlei miteinander korrelierte Messgrößen weisen lediglich die Mineralstoff- und Hauptkomponenten-Kategorie auf. Basierend auf diesen Daten können 27 der 55 Messgrößen als miteinander korreliert betrachtet und somit potentiell zur Eliminierung vorgemerkt werden.

Für die Variablenreduktion im Vorfeld weiterer multivariater Datenanalysen werden neben den Ergebnissen der Korrelationsanalyse auch die Ergebnisse der nachfolgend dargelegten Varianzanalyse berücksichtigt.

**Tab. 4.14** Darstellung der erhöhten Korrelationen zwischen Messgrößen der untersuchten Schmelzkäse. \*Messgröße wurde trotz der Ergebnisse der Korrelationsanalyse nicht eliminiert [MPr - Molkenproteine].

Kategorie	Messgröße / Variable	Korrelationskoeffizient nach Pearson	eliminierte Messgrößen
<b>Caseine</b>	$\kappa$ -CN - % SC	0,998	% SC
<b>Molkenproteine</b>	$\beta$ -LG - % MPr (SDS)	0,87	% MPr (SDS)
	$\alpha$ -LA - % MPr (SDS)	0,83	% MPr (ASA)
	Cystin - % MPr (ASA)	0,998	% MPr (HPLC)
	CMP - % MPr (HPLC)	0,998	
<b>Proteolyseparameter</b>	NPN – freie AS (Summe)	0,9*	Summe freie AS*
	NPN und die freien AS (Summe) - 20 untersuchten Aminosäuren	alle > 0,8	20 einzelnen Aminosäuren
<b>Organische Säuren</b>	Orotsäure - Quotient	0,76	Quotient
<b>Maillard – Reaktionsprodukte</b>	$\epsilon$ -AP – Quotient $\epsilon$ -AP / $\alpha$ -AP	0,89	Quotient $\epsilon$ -AP / $\alpha$ -AP*
	$\alpha$ -AP Leucin – Summe $\alpha$ -AP	0,85	$\alpha$ -AP Leucin
<b>Mineralstoffe</b>	---	---	---
<b>Hauptkomponenten</b>	---	---	---

#### 4.5.2.2 Varianzanalyse

Mittels Varianzanalysen als Vertreter der überwachten Datenanalysemethoden wird der Beitrag einzelner Varianzquellen (Messgrößen) und deren Wechselwirkungen bezogen auf die Gesamtvarianz untersucht. Basierend darauf können Faktoren (F-Werte) berechnet werden, welche angeben ob und inwieweit die einzelne Varianzquelle (Variable) statistisch signifikant zur Gesamtvarianz beiträgt oder nicht. Ziel der vorliegenden Studien ist dabei die Reduzierung des gesamten Datensatzes auf nur noch signifikant latente Variablen durch Entfernung aller redundanten Daten. Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in der Tabelle 4.15 zu sehen. Die Signifikanz einer Variable wird dabei anhand des F-Wertes entsprechend der gleichnamigen Verteilung bewertet. Basierend auf den in der Tabelle illustrierten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass nur noch 10 der ursprünglich 55 Messgrößen signifikant zur Gesamtvarianz des Datensatzes beitragen. In besonders hohem Maße sind dabei die Kategorien der Mineralstoffe, Hauptkomponenten, Maillard-Reaktionsprodukte sowie organische Säuren vertreten. Im Vergleich hierzu sind die proteinchemischen Parameter (Caseine, Molkenproteine, Proteolyseparameter) deutlich unterrepräsentiert. Mittels der Clusteranalyse konnten die Messgrößen CMP, NPN und die Summe der freien

Aminosäuren jedoch als rohwarenspezifische Messgrößen für Käse bzw. MP identifiziert werden, weshalb diese entgegen der Ergebnisse der Varianzanalyse nicht aus dem Datensatz entfernt werden.

**Tab. 4. 15** Ergebnisse der Varianzanalyse und Variablenreduktion der untersuchten Schmelzkäseproben. Grau unterlegte Messgrößen werden weiter für die Faktoren- und Diskriminanzanalyse im Datensatz beibehalten. ( $F' \geq 2,6$ ,  $v_1 = 15$  – Zahl der erklärenden Variablen,  $v_2$  = Zahl der Freiheitsgrade des Nenners,  $p=0,01$ ; \*Messgröße wurde trotz der Ergebnisse nicht eliminiert)

Kategorie	Nr.	Messgröße	F-Wert	Nr.	Messgröße	F-Wert
Caseine		intaktes Casein	1,0		$\alpha_{S1}$ -Casein	1,4
		$\alpha_{S2}$ -Casein	1,2		$\beta$ -Casein	0,8
		para- $\kappa$ -Casein	1,0	<b>1</b>	$\kappa$ -Casein	2,61
Molkenproteine		$\alpha$ -LA	1,0		$\beta$ -LG	0,7
	<b>2</b>	Cystin	2,6	<b>3</b>	CMP	1,5*
Proteolyseparameter	<b>4</b>	NPN	1,6*		WLN	1,6
		Quotient NPN / WLN	1,6		Peptide (SDS) > 24 kDa	0,9
		Peptide (SDS) < 10 kDa	0,6		$\gamma$ -Casein	0,6
	<b>5</b>	Summe der freien Aminosäuren	1,5*			
organische Säuren		Milchsäure	0,8	<b>6</b>	Orotsäure	3,1
Maillard-Reaktionsprodukte	<b>7</b>	$\epsilon$ -AP	4,8		Summe $\alpha$ -AP	1,7
		$\alpha$ -AP Lysin	2,0		$\alpha$ -AP Isoleucin	1,5
		$\epsilon$ -AP / $\alpha$ -AP	5,3			
Mineralstoffe	<b>8</b>	Calcium	10,2	<b>9</b>	Kalium	7,9
	<b>10</b>	Quotient	10,4			
Hauptkomponenten	<b>11</b>	Trockenmasse	9,9	<b>12</b>	Lactose	12,7
	<b>13</b>	Gesamtprotein	5,5			

Insgesamt kann der Datensatz von ursprünglich 55 Analysenparametern auf 13 Variablen reduziert werden. Für die Auswertung mittels Faktoren- und Diskriminanzanalyse steht demzufolge ein Gesamtdatensatz von 60 Schmelzkäsen und 13 Parametern zur Verfügung.

### 4.5.3 Faktorenanalyse

Mittels der dargelegten Faktorenanalyse, welche zu den unüberwachten Verfahren der multivariaten Datenanalyse gezählt wird, soll anschließend versucht werden eine weitere Reduzierung und Bündelung des Datensatzes zu erreichen. Von besonderem Interesse ist dabei, ob sich die erhobenen, abhängigen Merkmale auf einige wenige übergeordnete, unabhängige, zentrale Faktoren zurückführen lassen. Bei einer Verdichtung des Datensatzes auf nur noch 2 oder 3 Faktoren ist schließlich die graphische Darstellung der Objekte im Raum dieser Dimensionen möglich, wobei zum Teil ein enormer Informationsverlust mit der Reduktion einhergehen kann. Dieser bestimmt maßgeblich die Repräsentationsgüte der Objektpositionierung zueinander. Auf der anderen Seite können anhand graphischer Darstellungen die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit einzelner Objekte zueinander visuell sehr anschaulich verdeutlicht werden.

Durchgeführt wurde diese multivariate Datenanalyse mittels der Software SPSS 15.0, wobei das zugrundeliegende mathematische Modell der Hauptkomponentenanalyse gewählt wurde. Die für die 60 Schmelzkäseproben erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4. 16 zusammengefasst. Dabei wird für jede der 13 einzelnen Komponenten die prozentuale Varianz, welche diese zur Gesamtvarianz des Datensatzes beiträgt, aufgelistet. Es ist ersichtlich, dass bereits die ersten 3 Faktoren mit 64 % zum Hauptanteil dieser beitragen. Je mehr Faktoren man zusätzlich wählt, desto größer wird die damit erklärbare kumulierte Gesamtvarianz. Würde man beispielsweise statt 3 Faktoren 6 auswählen, so ließe sich diese auf bis zu 85 % steigern. Ziel der durchgeführten Faktorenanalyse ist es jedoch möglichst wenig erklärende, unabhängige Faktoren (<4) bei gleichzeitig minimalem Informationsverlust (kumulierte Varianz) zu generieren. An diesem Punkt stellte sich nun die Frage ob mehr als 3 Faktoren ein sinnvolles und gut auswertbares Ergebnis liefern bzw. inwieweit 36 % nicht erklärbare Varianz des Datensatzes toleriert werden können. Laut Literatur können zur Festlegung der Anzahl an Faktorextraktionen verschiedenste Möglichkeiten gewählt werden (Backhaus et al. 2006). Zum einen ist es möglich bis zum Erreichen einer bestimmten erklärbaren prozentualen kumulierten Varianz zu extrahieren (i.d.R. 95 %). Dies würde im vorliegenden Beispiel zur Extraktion von 9 Faktoren führen, wäre jedoch in Folge der nur geringen Reduktion der Variablen (13) auf Faktoren (9) nicht sinnvoll.

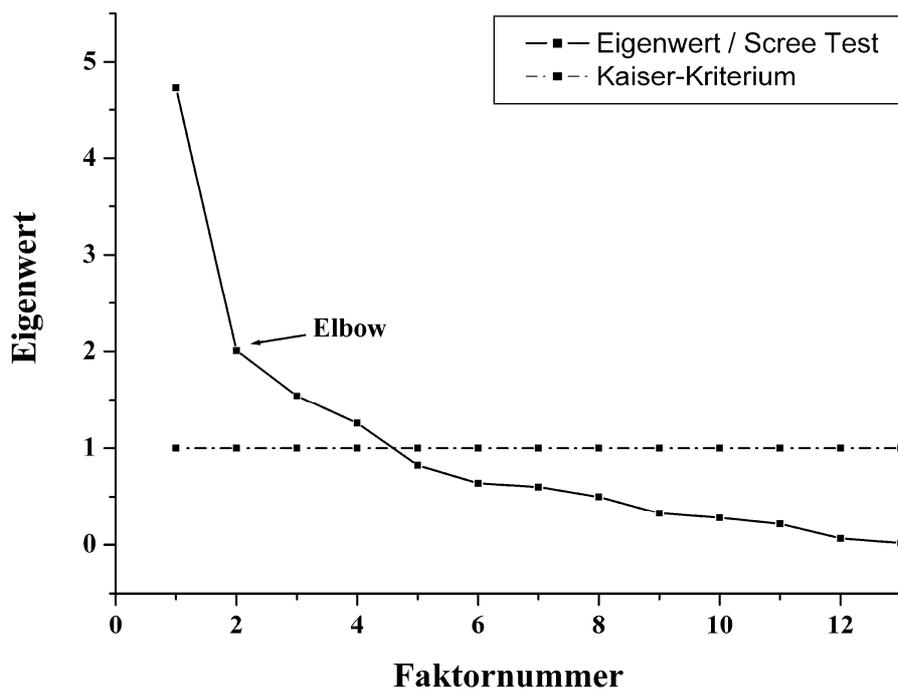
**Tab. 4. 16** Extrahierte Faktoren mit Eigenwerten und Varianzerklärungsanteil der Hauptkomponentenanalyse der Faktorenanalyse.

Komponente	Eigenwerte	% Varianz	% kumulierte Varianz
1	4,72	36,4	36,4
2	2,01	15,5	51,9
3	1,54	11,9	63,8
4	1,25	9,7	73,5
5	0,82	6,3	79,8
6	0,64	4,9	84,7
7	0,6	4,6	89,3
8	0,5	3,8	93,1
9	0,33	2,5	95,6
10	0,28	2,1	97,7
11	0,22	1,7	99,4
12	0,07	0,5	99,9
13	0,02	0,1	100

Als weitere Möglichkeiten wurden neben dieser noch der Scree Test sowie das Kaiser-Kriterium angewendet. Die Ergebnisse hierzu sind der nachfolgend dargestellten Grafik zu entnehmen (Abb. 4. 59). Beim Scree Test werden die Faktoren gegen die jeweiligen Eigenwerte aufgetragen. Die optimale Anzahl an Faktorextraktionen (2) ergibt sich aus der Bestimmung des „Elbow“ in der Funktion (Backhaus et al. 2006). Im Gegensatz dazu wird beim Kaiser-Kriterium jeder Faktor mit Eigenwerten >1 extrahiert. In diesem Falle würde sich als optimale Lösung 4 ergeben. Zur Durchführung der weiteren Extraktion wurde als Faktoranzahl 3 ausgewählt, da zum Einen damit noch eine graphische Darstellung der Objekte möglich ist und zum Anderen der Verlust an nicht erklärbarer Varianz im tolerierbaren Rahmen liegt.

Die Ergebnisse der mittels SPSS 15.0 durchgeführten Faktorenanalyse mit 3 extrahierten Faktoren sind der nachfolgend illustrierten Tabelle zu entnehmen (Tab. 4. 17). Die jeweils positiv bzw. negativ hochladenden Variablen der jeweiligen Faktoren sind farbig hervorgehoben.

Es wird ersichtlich, dass Faktor 1 besonders durch hohe positive Ladungen der Variablen Trockenmasse, Protein, NPN und freie Aminosäuren gekennzeichnet ist. Negative Ladungen auf diesen Faktor werden hingegen von den Variablen Lactose und  $\kappa$ -CN hervorgerufen. Versucht man zwischen diesen Variablen eine sinnvolle übergeordnete Gemeinsamkeit zu finden, so kann man basierend auf den bislang im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnissen diesen Faktor eindeutig der Käserohware zuordnen. Die diesen Faktor positiv bestimmenden Variablen wurden dabei bereits mehrfach als Käse-spezifische Messgrößen diskutiert.

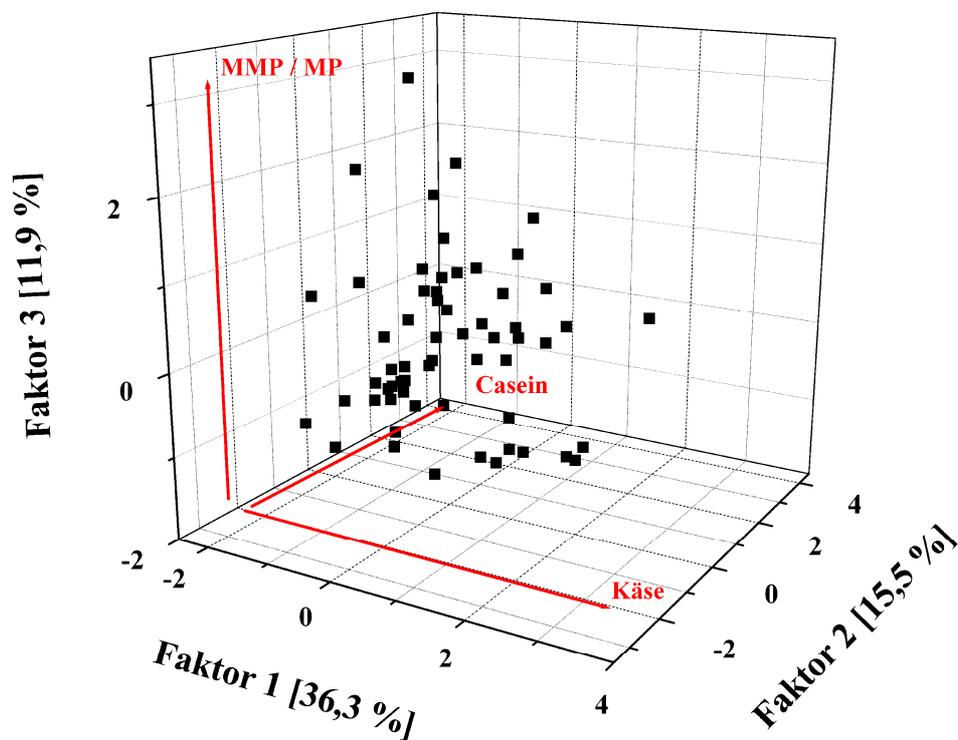


**Abb. 4. 59** Darstellung des Scree Tests und des Kaiser-Kriteriums zur Ermittlung der optimalen Anzahl an Faktorextraktionen.

Im Vergleich hierzu kann Faktor 2 eindeutig den Caseinen bzw. Milchproteinkonzentraten zugeordnet werden. Dieser ist durch Calcium, den Quotient Ca / K sowie  $\kappa$ -CN positiv hochgeladen. Negativ wird dieser Faktor durch Kalium bestimmt. Ein Schmelzkäse mit hohen Anteilen an MMP und MP wird im Vergleich zu Faktor 1 und 2 vor allem durch einen ausgeprägten Faktor 3 repräsentiert sein. Dieser wird durch die Variablen Lactose, Cystinwert, CMP, Orotsäure und  $\epsilon$ -AP positiv hochgeladen. Eine negative Beeinflussung erfährt dieser Faktor hingegen durch die Trockenmasse. Infolge der gewählten 3 Faktorextraktionen ist anschließend nach Berechnung der Faktorwerte eine graphische Darstellung der analysierten Schmelzkäseproben in den Dimensionen dieser Faktorwerte möglich. Dargestellt ist diese Positionierung der einzelnen Schmelzkäse zueinander in nachfolgend abgebildeter Grafik (**Abb. 4. 60**). Zusätzlich repräsentiert die Richtung der drei Vektoren die jeweils dominierende Rohware.

**Tab. 4.17** Ergebnisse der Varimax-rotierten Faktorenmatrix (Rotation in 5 Iterationen konvergiert) mit Kaiser-Normalisierung der Hauptkomponenten-Faktorenanalyse. Die positiv (grün) oder negativ (rot) hochladenden Variablen der jeweiligen Faktoren sind farbig markiert.

Komponente	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Trockenmasse	0,479	0,329	-0,547
Protein	0,686	0,398	-0,281
Lactose	-0,464	-0,037	0,693
NPN	0,923	0,118	-0,065
Cystinwert	-0,373	-0,359	0,485
freie Aminosäuren	0,900	0,017	0,015
Calcium	0,181	0,800	0,019
Kalium	-0,108	-0,713	0,199
Quotient Ca / K	0,177	0,886	-0,205
CMP	0,142	-0,040	0,690
$\kappa$ -CN	-0,426	0,544	-0,038
Orotsäure	-0,279	-0,086	0,625
$\epsilon$ -AP	0,093	-0,119	0,685
	<b>Käse</b>	<b>Caseine / MPC</b>	<b>MMP / MP</b>



**Abb. 4.60** Positionierung der analysierten Schmelzkäse anhand der graphischen Darstellung der Faktorwerte.

Anhand dieser Darstellung können die Schmelzkäse sehr gut im Raum der 3 Faktoren positioniert werden. Untereinander ist somit eine Abgrenzung von sehr unterschiedlichen Proben bzw. eine Bündelung von wenig abweichenden Proben möglich. Zudem kann den Proben qualitativ eine oder mehrere der eingesetzten Rohwaren (Käse, Caseine / MPC, MMP / MP) zugeordnet werden. Die Auflistung der ermittelten Faktorwerte ist in Tabelle 4.18 dargestellt. Der für die jeweilige Schmelzkäseprobe dominierende Faktor (positiv wie negativ) ist hervorgehoben.

**Tab. 4.18** Auflistung der Faktorwerte aller analysierten handelsüblichen Schmelzkäse (3 Faktorenlösung). Die positiv (grün) oder negativ (rot) hochladenden Faktorwerte der jeweiligen Probe sind farbig markiert. [SK-Schmelzkäse (detaillierte Informationen zur jeweiligen Probe sind Tab. 3.4 zu entnehmen), Fakt. - Faktor]

Probe	Fakt. 1	Fakt. 2	Fakt. 3	Probe	Fakt. 1	Fakt. 2	Fakt. 3
SK1	<b>-0,830</b>	<b>-1,157</b>	<b>2,178</b>	SK24	<b>1,878</b>	-0,135	<b>0,511</b>
SK2	-0,430	-0,330	<b>3,161</b>	SK25	<b>-2,054</b>	<b>3,821</b>	<b>0,516</b>
SK3	<b>-0,961</b>	<b>-0,906</b>	<b>0,810</b>	SK26	<b>-0,596</b>	-0,259	-0,289
SK4	<b>-0,636</b>	-0,051	0,239	SK27	0,160	<b>0,753</b>	0,149
SK5	-0,430	<b>0,627</b>	<b>0,682</b>	SK28	<b>-0,514</b>	<b>-0,518</b>	-0,408
SK6	<b>-0,914</b>	-0,086	-0,407	SK29	<b>-0,678</b>	-0,421	<b>-1,092</b>
SK54	<b>0,566</b>	0,396	<b>-1,465</b>	SK30	<b>1,571</b>	<b>0,655</b>	<b>-1,274</b>
SK55	<b>0,615</b>	<b>0,727</b>	<b>-0,952</b>	SK31	-0,456	<b>-0,853</b>	<b>-1,138</b>
SK56	<b>0,685</b>	<b>1,089</b>	<b>-1,472</b>	SK32	<b>-0,827</b>	<b>-2,417</b>	<b>0,918</b>
SK57	<b>1,791</b>	0,457	<b>-1,235</b>	SK33	-0,202	<b>-0,668</b>	<b>-0,623</b>
SK58	0,307	0,409	<b>-1,439</b>	SK34	-0,288	<b>-1,407</b>	0,334
SK59	<b>0,678</b>	<b>0,603</b>	<b>-1,322</b>	SK35	<b>1,683</b>	-0,374	0,341
SK60	<b>1,849</b>	<b>0,597</b>	<b>-1,094</b>	SK36	<b>-0,803</b>	-0,398	<b>-0,568</b>
SK7	-0,169	-0,070	0,091	SK37	<b>-0,681</b>	<b>-1,851</b>	-0,383
SK8	<b>0,502</b>	0,460	0,081	SK38	<b>-1,895</b>	<b>3,167</b>	<b>1,224</b>
SK9	<b>3,165</b>	-0,425	<b>0,827</b>	SK39	<b>-1,427</b>	<b>-0,917</b>	<b>-1,302</b>
SK10	0,095	0,064	<b>2,183</b>	SK40	-0,091	<b>-0,563</b>	<b>0,755</b>
SK11	0,128	-0,304	<b>0,505</b>	SK41	<b>-0,717</b>	-0,073	<b>-0,664</b>
SK12	<b>0,795</b>	<b>0,628</b>	<b>1,106</b>	SK42	<b>0,970</b>	-0,137	-0,006
SK13	<b>1,003</b>	<b>0,684</b>	<b>1,544</b>	SK43	-0,429	0,447	<b>0,535</b>
SK14	-0,235	0,107	<b>0,510</b>	SK44	<b>0,603</b>	-0,322	<b>1,073</b>
SK15	<b>-1,046</b>	0,109	<b>-0,843</b>	SK45	0,193	0,067	0,156
SK16	0,067	0,148	<b>0,883</b>	SK46	<b>0,678</b>	0,377	<b>0,664</b>
SK17	<b>1,008</b>	0,106	0,333	SK47	-0,050	<b>1,011</b>	-0,373
SK18	<b>-1,087</b>	<b>1,247</b>	<b>0,613</b>	SK48	-0,325	0,086	-0,246
SK19	<b>-0,664</b>	<b>-0,525</b>	-0,490	SK49	<b>1,257</b>	-0,339	0,330
SK20	-0,252	-0,146	-0,249	SK50	-0,042	-0,103	<b>-0,717</b>
SK21	<b>-0,613</b>	<b>0,681</b>	<b>-1,893</b>	SK51	<b>-0,986</b>	-0,485	<b>-0,716</b>
SK22	-0,337	<b>-0,724</b>	-0,329	SK52	<b>-0,823</b>	<b>-2,672</b>	-0,494
SK23	<b>1,413</b>	0,228	<b>0,839</b>	SK53	<b>-1,174</b>	-0,118	<b>-0,608</b>

Anhand dieser Werte sind einzelne Proben charakteristisch durch die 3 Faktoren beschreibbar. Eine qualitative Bewertung der jeweiligen Rezeptur hinsichtlich der eingesetzten Rohwaren ist basierend darauf möglich.

Mittels der durchgeführten Faktorenanalyse ist es gelungen, die noch verbleibenden 13 Variablen drei übergeordneten, unabhängigen Faktoren zu zuordnen. Basierend auf den erhaltenen 3 Faktorwerten je Probe können diese zusätzlich grafisch dargestellt werden. Anhand dieser Darstellung können die Schmelzkäse sehr gut zueinander positioniert werden. Eine Abgrenzung von sehr unterschiedlichen Proben bzw. eine Bündelung von wenig abweichenden Proben ist somit möglich.

#### 4.5.4 Diskriminanzanalyse

Diskriminanzanalysen, welche zur Gruppe der überwachten Methoden zählen, werden als Verfahren zur Analyse von Gruppenunterschieden und zur Klassifizierung von Objekten eingesetzt. Beim Klassifizieren von Objekten anhand dieser Methode werden zunächst für eine bekannte Objektmenge die Zusammenhänge zwischen der Gruppenzugehörigkeit und deren Merkmalen analysiert. Im zweiten Schritt können darauf aufbauend Prognosen zur Gruppenzugehörigkeit neuer Objekte getroffen werden. Im Gegensatz zur bereits im Abschnitt 4.5.1 dargelegten Clusteranalyse wird die Diskriminanzanalyse zur Untersuchung vorgegebener Gruppen eingesetzt. Vergleichbar zur Faktorenanalyse kann auch mittels der Diskriminanzanalyse eine graphische Darstellung der Objekte im Raum erfolgen. Die Objektpositionierung zueinander sowie zu den gefundenen Gruppen ist somit sehr anschaulich möglich.

Durchgeführt wurde diese multivariate Datenanalyse mittels der Software SPSS 15.0. Dazu wurden zunächst die handelsüblichen Schmelzkäse anhand des in der Zutatenliste angegebenen Anteiles an Käse gruppiert und anschließend mittels dieser Methode geprüft, ob sich die gefundenen Gruppen und in welchen Variablen sich diese unterscheiden. Basierend auf diesem Modell können nicht-eingruppierte, unbekannte Objekte nachträglich klassifiziert werden (letzte Zeile, Tab. 4. 19). Tabelle 4. 19 illustriert die anhand der deklarierten Käsegehalte festgelegten Gruppen und die jeweils enthaltenen Schmelzkäse. Die ausgewählten handelsüblichen Proben weisen dabei in etwa eine Normalverteilung bezüglich des enthaltenen Käseanteils auf. Die oberen und unteren Gehalte an Käserohware (20 bzw. 80 %) in Schmelzkäse treten demzufolge weniger häufig auf. Im Gegensatz dazu ist bei 60 % Käseanteil ein Maximum der untersuchten Schmelzkäse festzustellen. Zur nachfolgend dargestellten Klassifizierung des Datensatzes mittels Diskriminanzanalyse können 50 der 60 analysierten, handelsüblichen Schmelzkäse (83,3 %) angewendet werden. Die verbleibenden 10 Proben (Gruppe 8, Tab. 4. 19) werden später basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten multivariaten Datenanalyse eingruppiert.

**Tab. 4.19** Unterteilung der Schmelzkäse nach dem enthaltenen Anteil an deklariertes Käserohware und Darstellung der sich ergebenden Gruppenstatistik.

Nummer	% Käse	Anzahl Objekte	Bezeichnung
1	20	2	SK32, SK52
2	30	0	---
3	40	2	SK1, SK3
4	50	6	SK2, SK4, SK13, SK28, SK40, SK44
5	60	32	SK5-7, SK9, Sk11, SK14-16, SK18-20, SK22-23, SK26-27, SK29, SK31, SK33, SK35-36, SK39, SK41- 43, SK45-51, SK53
6	70	7	SK25, SK30, SK38, SK54-56, SK59
7	80	1	SK60
8 - ungruppiert	keine Angabe	10	SK8, SK10, SK12, SK17, SK21, SK24, SK34, SK37, SK57-58

Die eigentlichen Ergebnisse der Diskriminanzanalyse sind in den Tabellen 4.20 bis 4.22 sowie den Abbildungen 4.61 und 4.62 dargestellt.

Bei acht gewählten Gruppen lassen sich anhand der 13 Variablen 5 Diskriminanzfunktionen wiedergeben, deren geschätzte standardisierte Diskriminanzfunktionskoeffizienten in Tab. 4.20 illustriert sind. Anhand dieser kann die Wichtigkeit der einzelnen Merkmalseigenschaften innerhalb der Diskriminanzfunktionen beschrieben werden. Funktion 1 und 2 sind dabei beispielsweise durch eine große diskriminatorische Bedeutung der Variablen Kalium und dem Quotient der Mineralstoffe gekennzeichnet. Geringe diskriminatorische Relevanz zeigt für diese Funktionen die Messgröße Calcium. Neben dieser Variablen weisen die Trockenmasse und der Proteingehalt eine ebenso geringe Bedeutung für Funktion 1 auf. Im Vergleich hierzu sind die Funktion 3, 4 und 5 nur durch eine geringere diskriminatorische Bedeutung zur Klassifizierung der Objekte charakterisiert. Die in diesen Funktionen jeweils wichtigen Messgrößen zur Durchführung der Diskriminanzanalyse sind grün hervorgehoben.

**Tab. 4. 20** Auflistung der fünf ermittelten kanonischen Diskriminanzfunktionen und deren Koeffizienten. Die positiv (grün) oder negativ (rot) hochladenden Variablen der jeweiligen Funktionen sind farbig markiert.

	Diskriminanzfunktion				
	1	2	3	4	5
<b>Trockenmasse</b>	<b>-1,068</b>	0,192	0,569	0,644	-0,026
<b>Protein</b>	<b>-1,026</b>	0,246	-0,925	<b>0,846</b>	0,325
<b>Lactose</b>	-0,303	-0,719	0,856	0,379	0,288
<b>NPN</b>	-0,266	-0,247	<b>1,420</b>	<b>-0,843</b>	<b>-0,884</b>
<b>Cystinwert</b>	-0,114	0,168	0,154	0,244	-0,318
<b>freie Aminosäuren</b>	0,444	-0,258	-0,279	-0,039	<b>1,509</b>
<b>Calcium</b>	<b>-3,825</b>	<b>-1,835</b>	<b>-1,229</b>	-0,329	-0,230
<b>Kalium</b>	<b>5,086</b>	<b>2,852</b>	0,882	0,366	0,272
<b>Quotient Ca / K</b>	<b>5,244</b>	<b>3,546</b>	<b>1,509</b>	0,342	0,083
<b>CMP</b>	0,254	-0,094	-0,439	0,049	-0,158
<b>κ-CN</b>	-0,518	0,409	0,230	-0,001	0,078
<b>Orotsäure</b>	0,106	0,107	0,316	0,362	-0,021
<b>ε-AP</b>	-0,106	-0,298	-0,318	0,741	0,020

Die Beiträge der jeweiligen Diskriminanzfunktionen 1 bis 5 zur erklärten Gesamtvarianz des Datensatzes können der Tabelle 4.21 entnommen werden. Es ist ersichtlich, dass bereits die ersten beiden Funktionen mit 94 % kumulierter Varianz den Hauptanteil dieser erklären. Funktion 3 bis 5 tragen somit nur noch mit 6 % zur Klassifizierung der analysierten Schmelzkäse bei und werden deshalb im weiteren Verlauf der Diskriminanzanalyse zugunsten der graphischen Visualisierung (Abb. 4. 61) vernachlässigt.

**Tab. 4. 21** Extrahierte Funktionen mit Eigenwerten und Varianzerklärungsanteil der Diskriminanzanalyse.

Funktion	Eigenwerte	% Varianz	% kumulierte Varianz
1	21,1	79,6	79,6
2	3,8	14,4	94,0
3	0,8	3,1	97,1
4	0,6	2,1	99,3
5	0,2	0,7	100

In den Abbildungen Abb. 4. 61 und Abb. 4. 62 sind die Ergebnisse der kanonischen Diskriminanzfunktionen 1 und 2 graphisch als kombinierte Gruppen dargestellt. Anhand der Abbildung 4.62 können die Gruppen der Schmelzkäse mit variierenden Gehalten an Käserohware sehr gut in die vorgegebenen Gruppen klassifiziert werden.

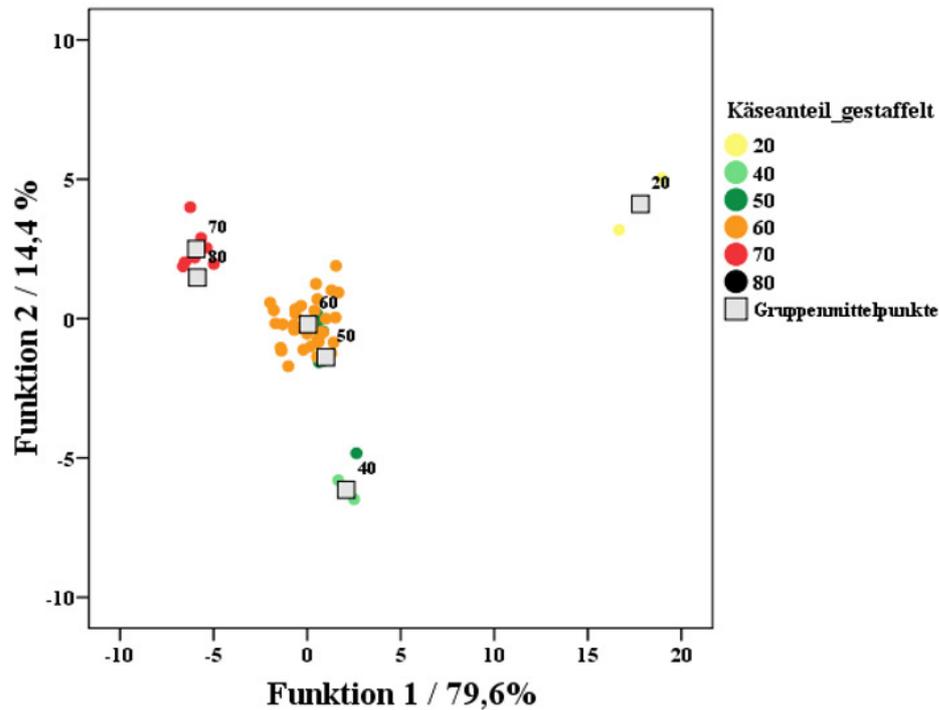


Abb. 4.61 Kombinierte Darstellung der gruppierten 50 Schmelzkäse in der Diskriminanzebene.

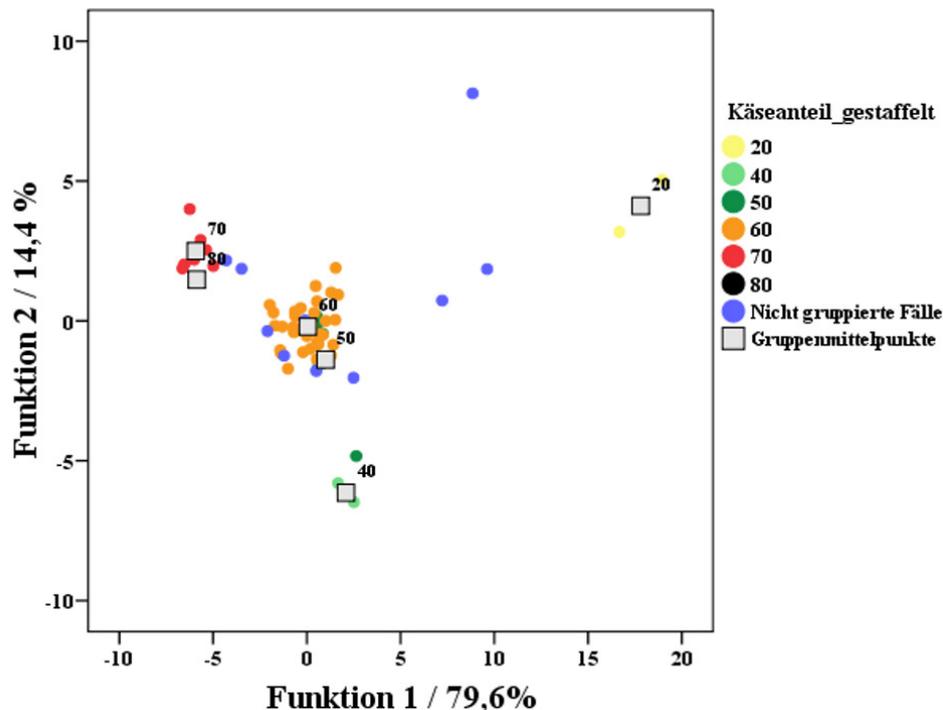


Abb. 4.62 Kombinierte Darstellung der gruppierten 50 Schmelzkäse (basierend auf dem enthaltenen Käseanteil) sowie der 10 ungruppierten Proben in der Diskriminanzebene.

Die Gruppenmittelpunkte aller Gruppen sind mit 2 Ausnahmen gut voneinander unterscheidbar. Die Schmelzkäse mit 50 bzw. 60 % ebenso wie die Gruppen mit 70 bzw. 80 % Käseanteil sind in deren Merkmalseigenschaften sehr ähnlich, was eine Differenzierung dieser zueinander erschwert. Eine Korrelation bezüglich des

enthaltenen Käseanteiles und der resultierenden Diskriminanzfunktion ist abzuleiten, wobei die Schmelzkäse mit nur 20 % Käseanteil davon ausgenommen sind. Je höher der Käseanteil, desto geringer ausgeprägt sind die Schmelzkäse in deren Funktionswerten der 1. kanonischen Diskriminanzfunktion. Im Gegensatz hierzu steigen die Funktionswerte der 2. kanonischen Diskriminanzfunktion mit höherem Anteil an Käserohware kontinuierlich an. Basierend auf den deklarierten, prozentualen Käseanteilen und den Ergebnissen der Diskriminanzanalyse konnten 92 % der gruppierten Objekte korrekt eingestuft werden. Genaue Ergebnisse hierzu sind der nachfolgend illustrierten Tabelle (Tab. 4. 22) zu entnehmen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist eine Positionierung von Objekten mit unbekannter Zusammensetzung durchgeführt worden. Die Ergebnisse hierzu zeigt Abbildung 4.63, welche die Klassifizierung der nicht gruppierten 10 Schmelzkäseproben im Vergleich zu den anhand des Käseanteils gestaffelten Schmelzkäsen darstellt. Eine genaue anteilige Zuordnung der Proben zu den einzelnen Gruppen ist Tab. 4. 22 zu entnehmen.

Tab. 4. 22 Klassifikationsmatrix

		vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit					
Anzahl	20	40	50	60	70	80	
20	2	-	-	-	-	-	
40	-	2	-	-	-	-	
50	-	-	4	2	-	-	
60	-	-	1	31	-	-	
70	-	-	-	-	6	1	
80	-	-	-	-	-	1	
%	20	40	50	60	70	80	
20	100	-	-	-	-	-	
40	-	100	-	-	-	-	
50	-	-	66,67	33,34	-	-	
60	-	-	3,1	96,9	-	-	
70	-	-	-	-	85,7	14,3	
80	-	-	-	-	-	100	
<b>ungruppierte</b>	2	0	2	4	1	1	

Die unbekanntes Schmelzkäseproben können mit Ausnahme von 3 der 10 Proben bereits sehr gut visuell klassifiziert werden. Mit einem Anteil von 80 % werden diese basierend auf den ermittelten Diskriminanzfunktionen den Gruppen mit 50 % oder mehr Käseanteil zugeordnet. Die verbleibenden 2 Proben können mittels des erhaltenen Modells am ehesten den Schmelzkäsen mit 20 % Käseanteil zugeteilt werden.

Mittels der durchgeführten Diskriminanzanalyse ist es möglich, den heterogenen Datensatz der handelsüblichen Schmelzkäse sehr gut basierend auf 13 Messgrößen in

Gruppen mit gestaffeltem Käseanteil zu klassifizieren. Basierend auf dem ermittelten Modell der kanonischen Diskriminanzfunktionen ist zudem eine Klassifizierung unbekannter Proben möglich.

#### 4.5.5 Zusammenfassung der multivariaten Datenanalyse

Zusammenfassend soll im folgenden Abschnitt kurz auf die Beantwortung der am Anfang des Kapitels aufgeworfenen 3 Hauptfragen mittels multivariater Datenanalysen eingegangen werden. Diese lauten wie folgt:

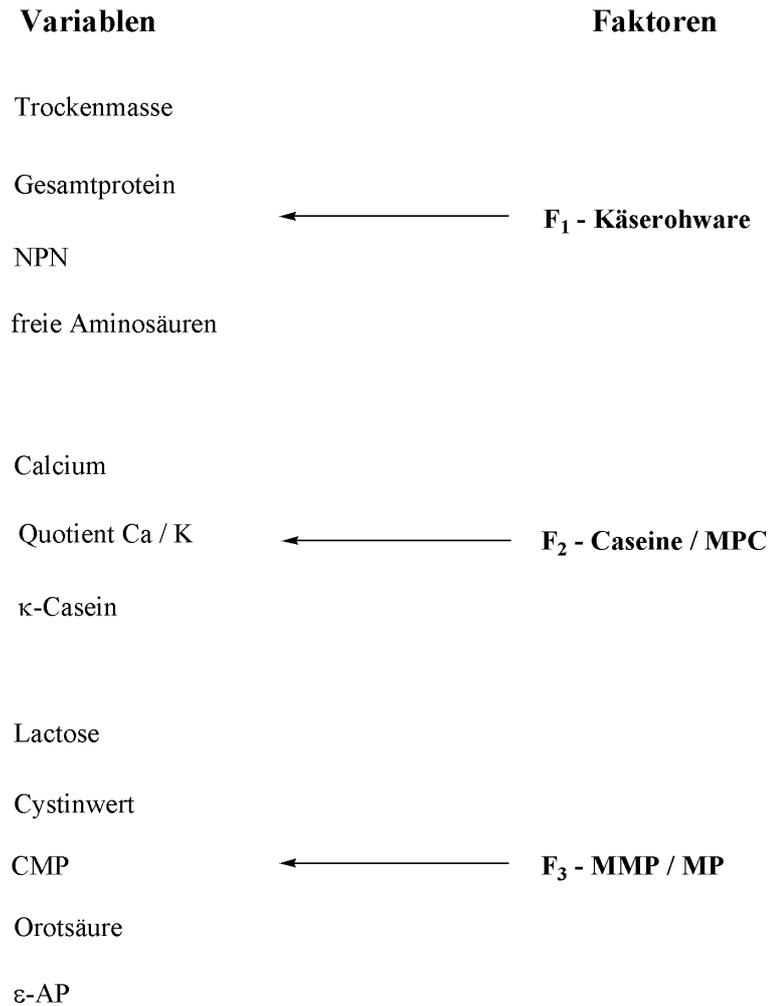
1) Sind die analysierten Schmelzkäse mittels der gewählten chemischen Messgrößen eindeutig voneinander unterscheidbar und ist anhand dieser eine Gruppierung der Schmelzkäse nach dem enthaltenen Käseanteil möglich?

Diese beiden Aspekte konnten im Zuge der durchgeführten Datenanalysen mittels einer Clusteranalyse sowie einer Diskriminanzanalyse eindeutig mit ja beantwortet werden. Dabei konnte die Clusteranalyse basierend auf 55 Messgrößen den homogenen Datensatz der 60 handelsüblichen Schmelzkäse in 6 Cluster einteilen. Die Proben innerhalb der Cluster weisen dabei geringere Unterschiede auf. Die Cluster zueinander unterscheiden sich jedoch deutlich. Mittels der durchgeführten Diskriminanzanalyse war es weiterhin möglich den, noch aus 13 Messgrößen bestehenden, Datensatz der Schmelzkäse hinsichtlich des deklarierten Käseanteils zu klassifizieren. Basierend auf dem ermittelten Modell der kanonischen Diskriminanzfunktionen ist zudem eine sinnvolle Klassifizierung unbekannter, neuer Proben fortlaufend möglich.

Weiterhin ist es möglich die Schmelzkäseproben mittels der Ergebnisse der Faktorenanalyse grafisch darzustellen. Anhand dieser Illustration können die Schmelzkäse sehr gut zueinander positioniert werden. Eine Abgrenzung von sehr unterschiedlichen Proben bzw. eine Bündelung von wenig abweichenden Proben ist somit ebenso möglich.

2) Welche der untersuchten Messgrößen sind am aussagekräftigsten für die untersuchten Schmelzkäse? Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Klärung inwieweit weniger selektive Messgrößen aus dem Datensatz entfernt werden können.

Erste Hinweise hierzu wurden bereits mittels der durchgeführten Clusteranalyse der zur Schmelzkäseherstellung eingesetzten Rohwaren gewonnen. Anhand der berechneten t-Werte ist es möglich, den Rohwaren Käse, LC, MMP, MP sowie SC charakteristische Messgrößen zuzuordnen. Mittels einer im Anschluss berechneten Faktorenanalyse wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die für die Faktoren Käse, Caseine und MMP / MP charakteristischen, dominierenden Variablen fasst nachfolgende Abbildung zusammen (Abb. 4. 63).



**Abb. 4. 63** Zuordnung der Variablen zu den übergeordneten Faktoren

Mittels einer durchgeführten Korrelations- und Varianzanalyse war es zudem möglich, den mit 55 Messgrößen sehr umfangreichen Datensatz auf 13 signifikante Variablen zu reduzieren.

3) Können aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen der einzeln betrachteten Messgrößen mittels multivariater Datenanalyse den Rohwaren charakteristische einzelne Messgrößen zugeordnet werden anhand derer eine anteilige Quantifizierung in Schmelzkäsen möglich ist?

Im Rahmen der umfangreichen Analyse verschiedenster chemischer Parameter ist es bislang mit Ausnahme von Molkenpulver, welches eindeutig über das enthaltene Caseinomakropeptid quantifiziert werden kann, nicht gelungen weitere Messgrößen zu finden, die exakt nur für einen Rohwarenzusatz in Schmelzkäse kennzeichnend sind. Dies ist infolge des gleichen Ausgangsrohstoffes Milch auch sehr schwierig bis unwahrscheinlich. Aufbauend auf den mittels Faktoren- und Clusteranalyse gewonnenen Erkenntnissen können einzelnen Rohwarengruppen jedoch dominierende Messgrößen zugeordnet werden, anhand derer ein qualitativer Nachweis in der

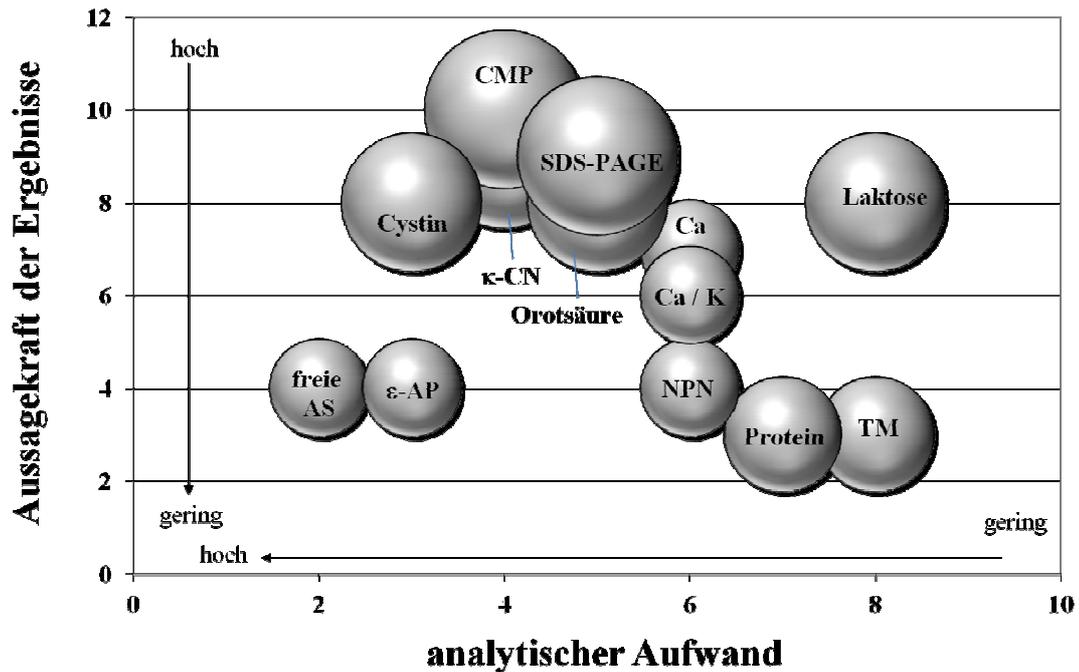
Schmelzkäsematrix möglich ist (Abb. 4. 63). Eine visuelle Positionierung und qualitative Bewertung der analysierten Schmelzkäseproben ist zudem mittels dreier etablierter Datenanalyse-Modelle (Cluster-, Faktoren- und Diskriminanzanalyse) gelungen. Eine Quantifizierung des Käseanteils in Schmelzkäsen allein anhand nur einer Messgröße ist jedoch nicht möglich. Die Schlussfolgerung kann somit nur lauten, dass zur Bestimmung der Rezeptur von Schmelzkäsen die ermittelten, relevanten 13 Messgrößen sowie deren multivariate Datenanalyse angewendet werden sollten. Wie genau man nun bei der Analyse einer unbekannt Probe vorgehen kann, ist nachfolgend dargelegt.

## 4.6 Analysestrategie und Modell-Berechnungen

### 4.6.1 Strategische Überlegungen zur Analyse einer unbekannt Probe

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit möglichst geringem zeitlichem und analytischem Aufwand eine Aussage zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von Schmelzkäseerzeugnissen zu erhalten. Anhand der multivariaten Datenanalyse konnte das zunächst aus 55 Messparametern bestehende Analysenportfolio auf nur noch 13 analytische Messgrößen reduziert werden. Eine weitere Verkleinerung des Datensatzes ist hingegen wenig sinnvoll, da allein nur die Konzentration an MP anhand einer Variable errechnet werden kann. Im Gegensatz dazu sind die im Produkt enthaltenen Anteile an Käse, LC, SC sowie MMP und MPC z.T. durch die gleichen Variablen charakterisiert, wobei dies in unterschiedlicher Ausprägung auftritt. Um dennoch die Analyse effizienter zu gestalten wurde eine Priorisierung der Messgrößen hinsichtlich des analytischen Aufwandes sowie der Aussagekraft der Ergebnisse vorgenommen. Zusätzlich zu den bislang etablierten 13 Messgrößen wurde die SDS-PAGE mit in diese Betrachtungen einbezogen, da anhand dieser sehr anschaulich und schnell Informationen zu den im Schmelzkäse enthaltenen Protein- und Peptidfraktionen erhalten werden können.

Anhand der Abb. 4. 64 sind die einzelnen Messgrößen hinsichtlich der Aussagekraft und des analytischen Aufwandes zueinander positioniert. Die Größe der dargestellten Kugeln spiegelt dabei zusätzlich die Priorisierung der durchzuführenden Analysen wieder. Sehr große Kugeln stehen dabei für Messgrößen die zu Beginn der Untersuchung sehr schnell und einfach eine qualitative Aussage zu den im Schmelzkäse enthaltenen Rohwaren liefern. Hierzu gehören beispielsweise die SDS-PAGE und die Gehalte an Cystin, CMP, Orotsäure,  $\kappa$ -CN sowie Lactose. Analysen die beispielsweise deutlich aufwendiger sind und / oder einen geringeren Anteil zur Unterscheidung der Schmelzkäse liefern, sind der NPN, die freien Aminosäuren sowie die Gehalte an Calcium. Repräsentiert werden diese demzufolge durch kleinere Kugeln (Abb. 4. 64).



**Abb. 4.64** Darstellung einer Aufwand-Nutzen-Analyse der verbleibenden analytischen Messgrößen zur Bestimmung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen [Kugelgröße – Mass für die Priorisierung der durchgeführten Analysen]

Basierend auf diesen Aspekten wurde nachfolgend ein Entscheidungsbaum zur Analyse von Schmelzkäseerzeugnissen etabliert (Abb. 4.65).

Zu Beginn der Analyse würde sich dabei die Durchführung einer SDS-PAGE anbieten. Anhand dieser kann sehr anschaulich zum Einen der Proteolysegrad und zum Anderen das Vorhandensein von Molkenproteinen, welche auf den Einsatz von MMP, MP und / oder MPC hinweisen, visualisiert werden. Je nachdem ob Molkenproteine enthalten sind, kann nachfolgend mittels der Bestimmung des Gehaltes an Caseinomakropeptid eindeutig das enthaltene MP nachgewiesen und quantifiziert werden (rechter Pfad in Abb. 4.65). Eine Differenzierung zwischen MMP, MP und MPC kann abschließend mittels der Analyse des Cystinwertes, der Lactose, der Orotsäure sowie der ε-AP vorgenommen werden. Basierend auf den im Abschnitt 4.1 ermittelten Gehalten der Rohwaren ist eine Berechnung der enthaltenen Anteile an MMP und MPC theoretisch somit möglich.

Sind keine Molkenproteine mittels SDS-PAGE nachweisbar, kann direkt dem linken Pfad in Abb. 4.65 gefolgt werden. Dieser weist neben der Bestimmung von intaktem κ-CN, welches eindeutig als Nachweis und zur Quantifizierung von SC (z.T. auch in MMP und MPC enthalten) angewendet werden kann, auch noch die Analysenparameter zur Charakterisierung von Käse und Labcasein auf. Zwischen den beiden zuletzt genannten Rohwaren kann dabei nur qualitativ in Schmelzkäsen differenziert werden.

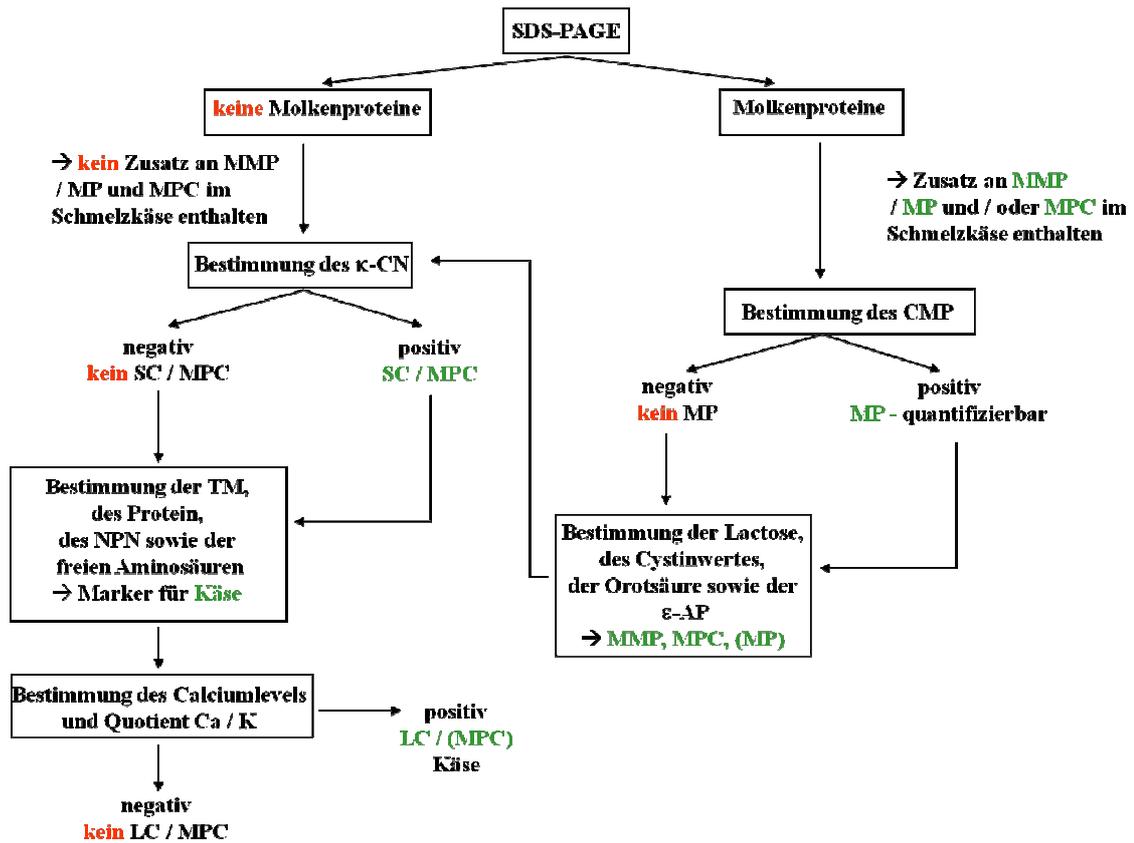
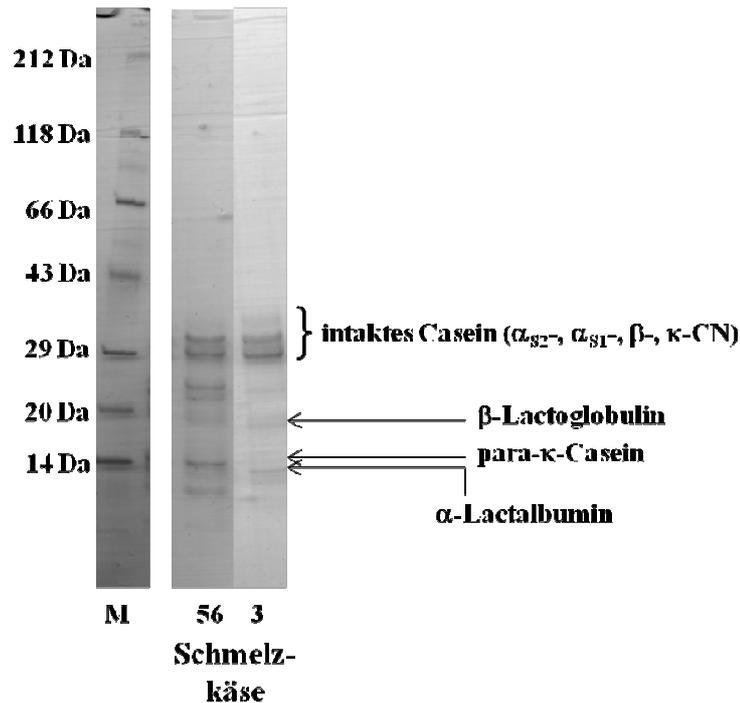


Abb. 4. 65 Darstellung der Reihenfolge und Aussagekraft der durchzuführenden analytischen Methoden zur Ermittlung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen mittels eines Entscheidungsbaums.

#### 4.6.2 Modell-Berechnung

Basierend auf dem im vorherigen Abschnitt dargelegten Analyseplan zur Ermittlung der Zusammensetzung von Schmelzkäsen wurde nachfolgend anhand zweier Proben mit bekannter Zusammensetzung (SK3 und SK56) versucht, die Anteile an Käse, MMP, MP sowie SC rechnerisch zu ermitteln. Die erhaltenen Ergebnisse hierzu sowie eine detaillierte Darlegung der Berechnungsgrundlage sind nachfolgend illustriert.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Proben zunächst mittels SDS-PAGE charakterisiert (Abb. 4. 66). Die Identifizierung der einzelnen Proteinfractionen erfolgte dabei anhand des Vergleiches mit Standardmaterialien. Probe SK56 (Bahn 2 / 3, Abb. 4. 66) weist dabei einen intensiven Abbau von intaktem Protein auf, wobei besonders  $\alpha_{S1}$ -Casein betroffen ist. Ebenso ist die fortgeschrittene Proteolyse anhand des vermehrten Auftretens von Peptiden gekennzeichnet, welche im Bereich von 10 bis 24 kDa und teilweise auch darunter Banden verursachen. Dies lässt vermuten, dass zur Herstellung dieses Schmelzkäseerzeugnisses v.a. gereifte Käserohware und nur begrenzt Milcheiweißerzeugnisse eingesetzt wurden. Weiterhin kann anhand der schwachen Banden der Molkenproteine  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG bei 13,5 und 20 kDa auf den geringen Zusatz von MMP, MPC und / oder MP zu diesem Schmelzkäse geschlossen werden.



**Abb. 4. 66** SDS-PAGE (10-20 % AA) nach Coomassie Brilliantblau Detektion zur Bestimmung von Caseinen, Molkenproteinen und Peptiden in exemplarisch ausgewählten Schmelzkäsen (SK56 und SK3).

Im Gegensatz hierzu ist die Schmelzkäseprobe SK3 (Bahn 4 / 5, **Abb. 4. 66**) durch eine schwächere Proteolyse sowie einen deutlich geringeren Anteil an Gesamtprotein gekennzeichnet (SK56 – 20,2 %; SK 3 – 11,9 % / Proteingehalt ermittelt mit Kjehldahl). Dies lässt auf einen niedrigeren Anteil sowohl an Käse als auch an Milcheiweißerzeugnissen schließen. Im Vergleich zur Probe SK56 können deutlich stärkere Banden der Molkenproteine ( $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG) nachgewiesen werden. Die anteilig enthaltene Menge an MMP, MP und / oder MPC scheint in diesem Schmelzkäse somit größer zu sein. Beide Schmelzkäse weisen bei etwa 29 kDa eine schwache Bande auf, welche als  $\kappa$ -CN identifiziert werden konnte. Anhand dieser ist eindeutig der Einsatz von SC und / oder MMP bzw. MPC nachweisbar. Aufbauend auf diesen ersten Resultaten wurden anschließend die im Abschnitt 4.6.1 aufgelisteten Messgrößen analysiert und nachfolgend näherungsweise zur Abschätzung der Anteile an Käse, MMP, MP sowie Milcheiweißerzeugnissen herangezogen. Die hierzu nötigen Berechnungen können in 4 Schritte unterteilt werden, welche nachfolgend zusammengefasst dargelegt werden.

### **1. Schritt: Bestimmung des Anteils an MP**

Zunächst kann anhand der ermittelten Konzentration an CMP (3.5.11, 4.2.3) eindeutig auf den Anteil an MP im Schmelzkäse geschlossen werden. Die hierzu notwendigen Rechenschritte sind nachfolgend illustriert.

$$MP[\%] = \left( \frac{CMP}{12\% * 20\% * 1000} \right) - F$$

MP [%]- Anteil an Molkenpulver, CMP – Konzentration an Caseinomakropeptid (mg / 100 g), 20 % - Anteil CMP am Molkenprotein, 12 % - Anteil Molkenprotein am Molkenpulver, 1000 - Faktor zur Umrechnung von mg auf g, F - Korrekturfaktor [gemittelte Konzentration in Käse 1%]

**SK56** – 47 mg CMP/ 100 g Probe → 0,9 g MP / 100 g Probe

**SK3** – 87 mg CMP / 100 g Probe → 2,6 g MP / 100 g Probe

## 2. Schritt: Bestimmung des Anteils an MMP / MPC

Im Folgenden kann basierend auf dem Gehalt an MP über den Cystinwert (3.5.12, 4.1.2.2) auf den im Produkt enthaltenen Anteil an MMP und / oder MPC geschlossen werden. Grundlage hierzu stellt die nachfolgend abgebildete Gleichung dar.

$$MMP / MPC[\%] = \frac{(Cystinwert_{Probe} - (Anteil_{MP} * Cystinwert_{MP}) - F)}{Cystinwert_{MMP}}$$

MMP / MPC [%] - Anteil an Magermilchpulver, Milchpulverkonzentrat, Cystinwert<sub>Probe</sub> – Konzentration an Cystin in der Schmelzkäseprobe, Cystinwert<sub>MP</sub> – gemittelte Konzentration an Cystin in Molkenpulvern (2323 mg / 100 g), Cystinwert<sub>MMP</sub> – gemittelte Konzentration an Cystin in Magermilchpulvern / Milchpulverkonzentraten, Anteil<sub>MP</sub> – prozentualer Anteil an Molkenpulver im Produkt (Schritt 1), F - Korrekturfaktor [gemittelte Konzentration in Käse 380 mg / 100 g]

**SK56** – 450,1 mg Cystin/ 100 g Probe → 4,9 g MMP / 100 g Probe

**SK3** – 534,3 mg Cystin / 100 g Probe → 10 g MMP / 100 g Probe

## 3. Schritt: Bestimmung des Anteils an SC

SC kann über den im jeweiligen Schmelzkäseerzeugnis ermittelten Gehalt an intaktem κ-Casein (3.5.11, 4.2) berechnet werden. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass der im MMP / MPC enthaltene Anteil an κ-Casein zuvor davon abzuziehen ist.

$$SC[\%] = \frac{\kappa - CN - (Anteil_{MMP} * \kappa - CN_{MMP})}{\kappa - CN_{SC}}$$

SC [%] - Anteil an Säurecasein, κ-CN<sub>Probe</sub> – Konzentration an κ-Casein in der Schmelzkäseprobe, κ-CN<sub>MMP</sub> – ermittelte Konzentration an κ-Casein in Magermilchpulver (3400 mg / 100 g), κ-CN<sub>SC</sub> – ermittelte Konzentration an κ-Casein in Säurecasein (12900 mg / 100 g), Anteil<sub>MMP</sub> – prozentualer Anteil an Magermilchpulver im Produkt (Schritt 2)

**SK56** – 365 mg Cystin/ 100 g Probe → 1,5 g SC / 100 g Probe

**SK3** – 413 mg Cystin / 100 g Probe → 0,6 g SC / 100 g Probe

#### 4. Schritt: Bestimmung des Anteils an Käse

Der im Schmelzkäseprodukt enthaltene Anteil an Käse kann nun über verschiedene Messgrößen abgeschätzt werden. Am einfachsten kann dies über den Gesamtproteingehalt (3.5.2, 4.1.1.1) erfolgen. Der dazu notwendige Rechenschritt ist nachfolgend dargestellt.

$$Käse[\%] = \frac{GP_{Probe} - (Anteil_{MP} * P_{MP}) - (Anteil_{MMP} * P_{MMP}) - (Anteil_{SC} * P_{SC})}{P_{Käse}}$$

Käse [%] - Anteil an Käse,  $GP_{Probe}$  - Konzentration an Gesamtprotein in der Schmelzkäseprobe,  $P_{MMP}$  - ermittelte Konzentration an Protein in Magermilchpulver (34 g / 100 g),  $P_{SC}$  - ermittelte Konzentration an Protein in Säurecasein (85 g / 100 g),  $P_{MP}$  - ermittelte Konzentration an Protein in Molkenpulver (12 g / 100 g),  $Anteil_{MMP}$  - prozentualer Anteil an Magermilchpulver im Produkt (Schritt 2),  $Anteil_{SC}$  - prozentualer Anteil an Säurecasein im Produkt (Schritt 3),  $Anteil_{MP}$  - prozentualer Anteil an Molkenpulver im Produkt (Schritt 1),

**SK56** – 20 g Protein/ 100 g Probe → **68 g Käse / 100 g Probe**

**SK3** – 12 g Protein / 100 g Probe → **31 g Käse / 100 g Probe**

Die in den beiden exemplarisch ausgewählten Proben (SK56 und SK3) rechnerisch ermittelten Gehalte an Käse, MMP, MP sowie SC sind nachfolgend tabellarisch den theoretisch enthaltenen Mengen gegenübergestellt (Tab. 4. 23).

**Tab. 4. 23** Vergleich der rechnerisch ermittelten Anteile an proteinhaltigen Rohwaren in Schmelzkäseerzeugnissen mit den theoretisch enthaltenen Mengen laut Verpackung.

Probe	Rohware	rechnerisch ermittelt	deklariert laut Hersteller
<b>SK56</b>	Käse	68 %	69 %
	MMP	4,9 %	5,3 %
	Milcheiweiß (SC)	1,5 %	1,5 %
	MP	0,9 %	0 %
<b>SK3</b>	Käse	31 %	35 %
	MMP	10 %	9,3 %
	MP	2,6 %	2,8 %
	Milcheiweiß (SC)	0,6 %	1,5 %

Anhand der dargelegten Werte können die gewählten Messgrößen sehr gut zur Abschätzung des Käseanteiles in den untersuchten beiden Schmelzkäsen mit bekannter Rezeptur herangezogen werden. Im Falle des Schmelzkäses SK56 weicht der ermittelte Anteil an Käse von 68 % nur um 1 % von der Angabe des Herstellers (69 %) ab. Beim Vergleich der Ergebnisse der Probe SK3 konnte eine nur geringfügig größere Anweichung von 4 % ermittelt werden (Tab. 4. 23). Weiterhin ist es möglich, mit

geringen Abweichungen auch die Anteile an zugesetzten Proteinpulvern im Schmelzkäse zu ermitteln. Geringfügig fehlerbehaftet ist in diesem Zusammenhang lediglich die Ermittlung der Anteile an MP in SK56 sowie des Anteiles an SC in SK3.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann jedoch nur näherungsweise auf die Käseanteile von Proben mit unbekannter Zusammensetzung geschlossen werden, da zur quantitativen Abgrenzung von MMP zu MPC sowie von Käse zu LC keine der bislang analysierten Messgrößen geeignet ist. In den beiden gewählten Beispiel-Schmelzkäsen war jedoch nur jeweils einer dieser Zusätze enthalten. Für die Untersuchung gänzlich unbekannter Schmelzkäse sowie Schmelzkäseerzeugnisse sollte demzufolge dem in Abschnitt 4.6.1 vorgeschlagenen Analyseplan gefolgt werden. Basierend auf diesem können zusätzlich die in Abschnitt 4.5 dargelegten 3 statistischen Modelle (Clusternalyse, Faktorenanalyse und Diskriminanzanalyse) zur grafischen Positionierung der Proben zueinander in einem großen Datenpool angewendet werden.

#### 4.7 Orientierende sensorische und mikroskopische Studien

Die mikroskopischen und sensorischen Studien zur Untersuchung der Auswirkungen eines Austausches von Käserohware in Schmelzkäse gegen Trockenmilch, Molke- und Milcheiweißerzeugnisse wurden an definiert hergestellten Modell-Schmelzkäsen durchgeführt (vgl. dazu Tab. 3. 5). Der Austausch von Käserohware durch die gewählten Proteinzusätze erfolgt dabei in Abstufungen von 2 bis maximal 10 %, wobei die Trockenmasse (50 %) und Fettgehalte (46 bis 47 % Fett i. Tr.) der Schmelzkäse nahezu konstant gehalten wurden. Der ausgewählte Größenbereich an Zusatzbeimischung ist dabei an die am Markt üblichen bzw. maximal vorstellbaren Einsatzmengen angelehnt. Ziel dieser Untersuchungen ist es zu klären, inwieweit strukturelle Unterschiede zwischen Schmelzkäsen nach Austausch der Käserohware durch Caseine und molkenproteinhaltige Rohwaren auftreten und ob diese mit sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden können.

Generelle Betrachtungen zur Verteilung einer Fettphase in einer kontinuierlichen Proteinmatrix am Beispiel von Schmelzkäse werden mittels mikroskopischen Methoden bereits seit längerem durchgeführt (Caric et al. 1985, Heertje et al. 1981, Kalab 1993, Awad et al. 2002, Pereira et al. 2009, Ye et al. 2009, Cunha et al. 2010). Anhand dieser Aufnahmen ist die Beurteilung der Protein-Mikrostruktur der untersuchten Proben sowie der darin emulgierten Fettphase möglich (Marchesseau et al. 1997, Lee et al. 2004). Neben einfachen lichtmikroskopischen werden heute vermehrt besser auflösende, elektronenmikroskopische Verfahren (Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM)) angewendet. Im Vergleich zur TEM, welche den Ist-Zustand der Probe widerspiegelt, erfolgt bei der REM während der Probenaufarbeitung eine Entwässerung und Entfettung der Proben. Als Folge können

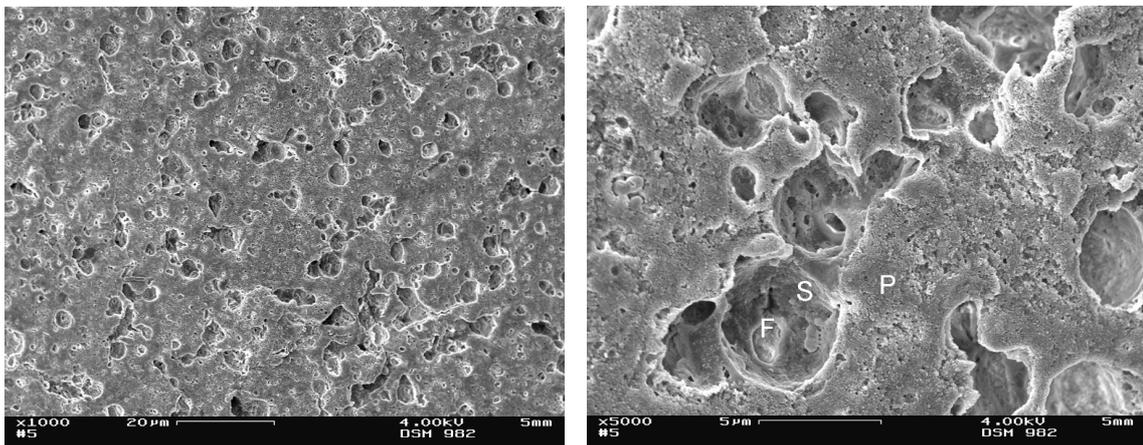
mittels der REM die in der Probe enthaltenen Fettaggregate nur als Hohlräume abgebildet werden (Tamime et al. 1990). Ein Rückschluss auf den Ist-Zustand der Probe ist jedoch trotzdem jeder Zeit möglich, weshalb zur ersten orientierenden Untersuchung der Schmelzkäseproben ein am Institut für Lebensmittelchemie in Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Dresden speziell für Schmelzkäse angepasstes und etabliertes REM-Verfahren Anwendung fand (Mulsow 2008). Die abschließende Auswertung und Zuordnung von wichtigen Strukturmerkmalen der Schmelzkäsematrix (Protein, Fett) wurde anhand des Vergleiches mit bislang veröffentlichten Darstellungen durchgeführt.

In den Abbildungen **Abb. 4. 67** bis **Abb. 4. 69** sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Schmelzkäsen mit variierenden Anteilen an Käserohware sowie Trockenmilch, Molke- und Milcheiweißerzeugnissen gezeigt.

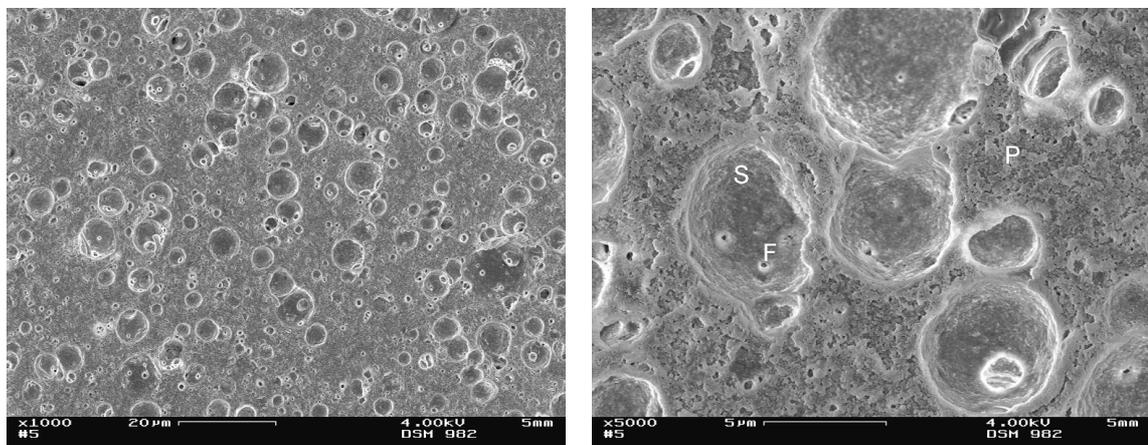
Der Referenz-Schmelzkäse mit 85 % Käseanteil (**Abb. 4. 67**) weist eine homogene und großflächige Proteinmatrix (P) auf, in welche die Fettphase (F) eingebettet ist. Die Verteilung der Fettkügelchen ist dabei inhomogen wobei der Trend zu größeren, zusammengelagerten Fettaggregaten deutlich erkennbar ist. Die Durchmesser der Fettkugeln weisen Größen von  $< 1 \mu\text{m}$  bis  $5 \mu\text{m}$  auf und liegen damit im Bereich der für Schmelzkäse typischer Weise gefundenen Werte (Kapoor et al. 2008). Serumbereiche (S), welche sich zwischen Fettphase und Proteinmatrix befinden, sind im Referenz-Schmelzkäse, welcher nur Käserohware enthält, deutlich auszumachen.

Im Vergleich dazu weisen die untersuchten Schmelzkäse nach Austausch von Käserohware durch Milcheiweißerzeugnisse ebenso eine homogene aber bereits flockige Proteinmatrix (P) auf, wobei diese kompakter und fester vernetzt zu sein scheint als beim Referenz-Schmelzkäse. Exemplarisch ist dies in der **Abb. 4. 68** für Schmelzkäse mit 10 %igem Säurecaseinzusatz gezeigt. Die Ursache für die bereits visuell wahrnehmbare gesteigerte Festigkeit der Schmelzkäse mit Milcheiweißerzeugniszusatz liegt im Vergleich zum Referenz-Schmelzkäse im deutlich erhöhten Proteingehalt begründet. Durch Zusatz von 10 % Milcheiweißerzeugnis kann der Anteil an Käserohware im Schmelzkäseprodukt um 34 % auf nur noch 56 % gesenkt werden, woraus gleichzeitig ein Anstieg des Proteingehaltes von 18,1 % auf 20,8 % resultiert. Folglich kann bei einem geringeren Produkteinsatz an teurer Käserohware eine Ausbeuteerhöhung und Verfestigung der Schmelzkäse durch vermehrten Zusatz an Milcheiweißerzeugnissen erzielt werden. Vergleichbare REM-Aufnahmen konnten für Schmelzkäse mit Labcaseinzusatz erhalten werden. Bei Einsatz geringerer Mengen dieser Milcheiweißerzeugnisse (2 % bzw. 5 %) sind identische Veränderungen zu erzielen, wobei diese jedoch schwächer ausgeprägt sind. Große Unterschiede sind weiterhin in der Form, Größe und Verteilung der Fettphase (F)

innerhalb des Proteinnetzwerks infolge der verringerten emulgierenden Kapazität dieser Schmelzkäse zu verzeichnen. Durch Zusatz an Milcheiweißerzeugnis zum Schmelzkäse resultieren darin größere (zum Teil deutlich über  $5\ \mu\text{m}$ ), inhomogen verteilte Fettkugelhohlräume (F), welche eine glattere Oberfläche mit weniger ausgefranzten Rändern aufweisen. Protein (P), Serum (S) und Fettphase (F) sind deutlicher voneinander abgegrenzt als im Referenz-Schmelzkäse.



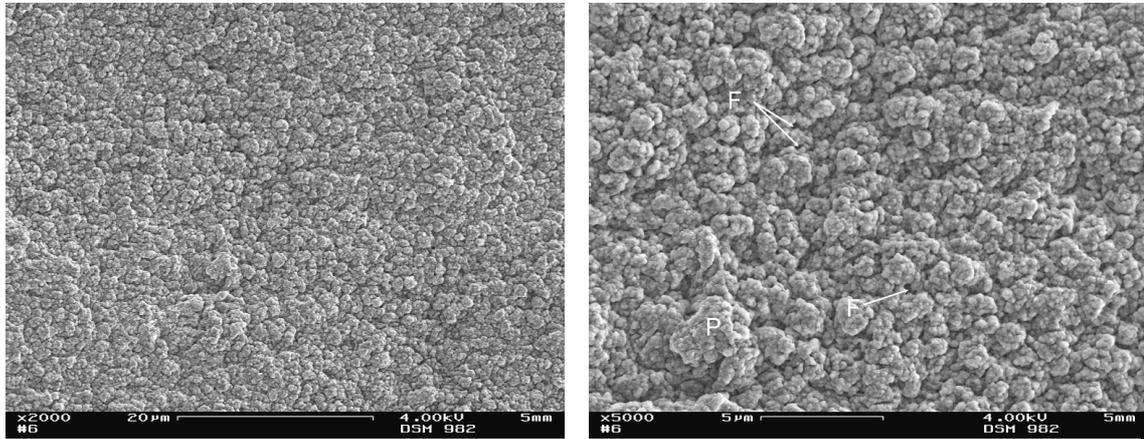
**Abb. 4. 67** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 85 % Anteil an Käserohware und ohne zugesetztes Casein oder Molkenprotein. links: Vergrößerung 1:1000, rechts: Vergrößerung 1:5000 [P – Proteinmatrix, F – Fettkugelhohlräum, S - Serum]



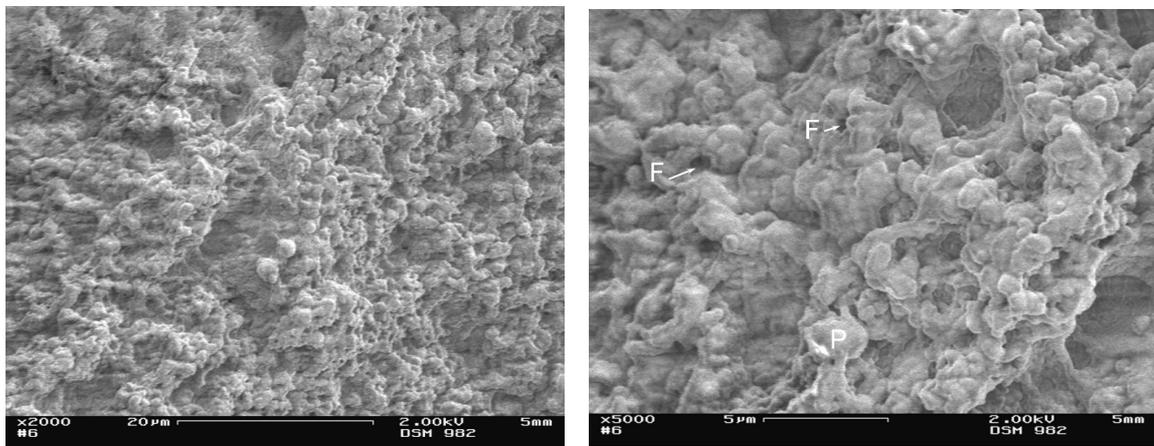
**Abb. 4. 68** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Modellschmelzkäses mit 56 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Säurecasein. links: Vergrößerung 1:1000, rechts: Vergrößerung 1:5000 [P – Proteinmatrix, F – Fettkugelhohlräum, S - Serum]

Im Gegensatz zum Referenz-Schmelzkäse und den Schmelzkäsen mit einem Zusatz an Milcheiweißerzeugnis unterscheiden sich die rasterelektronischen Aufnahmen der Schmelzkäse mit Trockenmilch- und Molkeerzeugniszusatz deutlich. Exemplarisch ist dies in den Abbildungen 4.69 und 4.70 an Schmelzkäsen mit 10 %igem Zusatz an Magermilchpulver und Molkenpulver. Das Proteinnetzwerk (P) weist eine homogene Strukturierung auf. Im Vergleich zum Referenz-Schmelzkäse zeigt es hingegen eine

aufgelockerte und schaumartige Struktur. Hervorgerufen wird dies vermutlich durch die enthaltenen Molkenproteine und die in größeren Mengen eingetragene Lactose. Für Schmelzkäse mit Magermilchpulverzusatz (Abb. 4. 69) ist in Folge des hohen Eintrages an Caseinen ein noch kompakteres Proteinnetzwerk erkennbar, welches im Falle der Schmelzkäse mit Molkenpulverzusatz deutlich aufgelockert erscheint (Abb. 4. 70).



**Abb. 4. 69** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 53 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Magermilchpulver. Links: Vergrößerung 1:2000, rechts: Vergrößerung 1:5000 [P – Proteinmatrix, F – Fettkugelhohlraum]



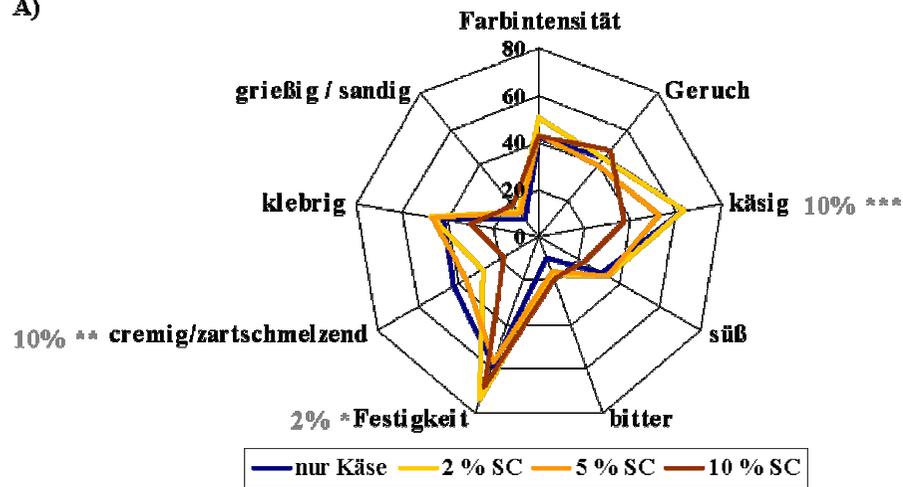
**Abb. 4. 70** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Modell-Schmelzkäses mit 53 % Anteil an Käserohware und 10 % zugesetztem Molkerpulver. links: Vergrößerung 1:2000, rechts Vergrößerung 1:5000 [P – Proteinmatrix, F – Fettkugelhohlraum]

Die Verteilung und Größe der Fettphase ist in beiden molkenproteinhaltigen Schmelzkäsen vergleichbar. Die Durchmesser der Fettkugelhohlräume (F) sind im Kontrast zum Referenz-Schmelzkäse deutlich reduziert ( $< 1\mu\text{m}$ ) und homogen über das Proteinnetzwerk (P) verteilt, was auf die verbesserte emulgierende Kapazität der Molkenproteine zurückgeführt werden kann. Die strukturellen Veränderungen sind dabei bereits bei geringen Anteilen dieser Zusätze in Schmelzkäse (4 %) feststellbar. Im Gegensatz zum Milcheiweißerzeugniszusatz bewirkt ein alleiniger Zusatz an Molken-

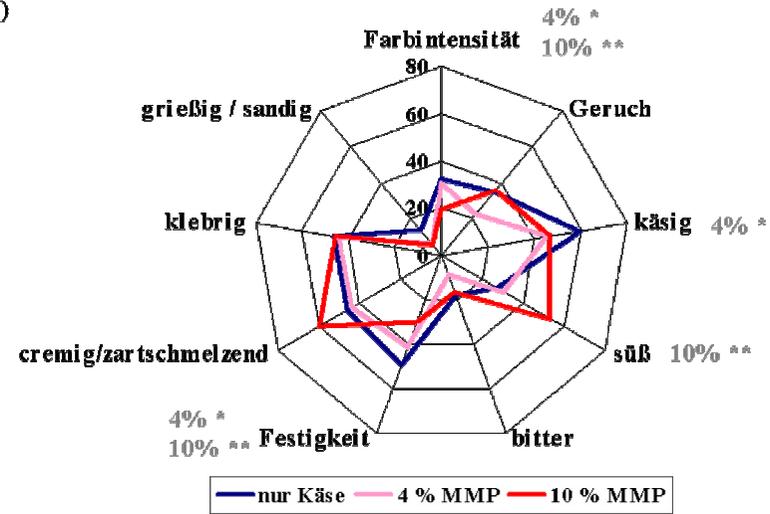
und Magermilchpulver zu Schmelzkäsen ein Absinken der Proteingehalte um 31 % (absolut 12,4 %) bzw. 19 % (absolut 14,8 %) bei jeweils 10 %igem Anteil dieser sowie ein deutliches Erweichen der Probe, was bei der Herstellung von schnittfestem Schmelzkäse problematisch werden kann (Strahm 2006).

Inwieweit die strukturell gefundenen Unterschiede zwischen Schmelzkäsen nach Austausch der Käserohware durch Caseine und molkenproteinhaltige Rohwaren mit sensorisch wahrnehmbaren und produktspezifischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden können, soll im Anschluss mittels sensorischer Tests geklärt werden. Ein Prüfpanel, bestehend aus 8 Personen, führte dazu eine Profilprüfung nach DIN 10967-1:1999-10 sowie eine Hedonische Prüfung mit Entscheidungsbegründung nach (Simat 2004) durch. Die Ergebnisse der Profilprüfung sind in den **Abb. 4. 71 A bis D** jeweils im Vergleich zum Referenz-Schmelzkäse gezeigt. Zur Schulung der Prüfer wurden diesen zunächst orientierend verschiedene Schmelzkäse unterschiedlicher Zusammensetzung gereicht. Anhand dieser erfolgte gemeinsam eine einfache beschreibende Prüfung nach DIN 10964 zur Festlegung qualitätsbestimmender Merkmalseigenschaften, deren Intensität anschließend mittels einer Profilprüfung bestimmt werden sollte. Als zu beurteilende Merkmalseigenschaften wurden der Geruch, der Geschmack (käsig, süß und bitter), die Festigkeit sowie die Textur (cremig / zartschmelzend, klebrig, grießig / sandig) bewertet. Hinsichtlich dieser Parameter kann eine sehr gute Unterscheidung zwischen Milcheiweißerzeugniszusatz auf der einen Seite (SC, LC) und molkenproteinhaltigen Zusätzen auf der anderen Seite (MMP, MP) vorgenommen werden. Die Ausprägung der Merkmalseigenschaften verhält sich dabei zum Teil gegenläufig. So sind die Schmelzkäse mit Zusatz an Labcasein und Säurecasein deutlich fester, klebriger und sandiger als die Referenzprobe, welche nur aus Käserohware hergestellt wurde. Die Cremigkeit und der käsige Geschmack sinken hingegen ab. Im Gegensatz dazu wurden Schmelzkäse mit Magermilchpulver und Molkenpulver als weniger fest, käsig, sandig und geringer gefärbt als die Schmelzkäse-Referenz beschrieben. Im Vergleich zu dieser sind der süße Geschmack und die cremige Textur der molkenproteinhaltigen Schmelzkäse jedoch deutlich ausgeprägt. Analog zu den mikroskopischen Beobachtungen ist die Ausprägung der jeweiligen Merkmalseigenschaft für Magermilchpulver geringer als für Molkenpulver.

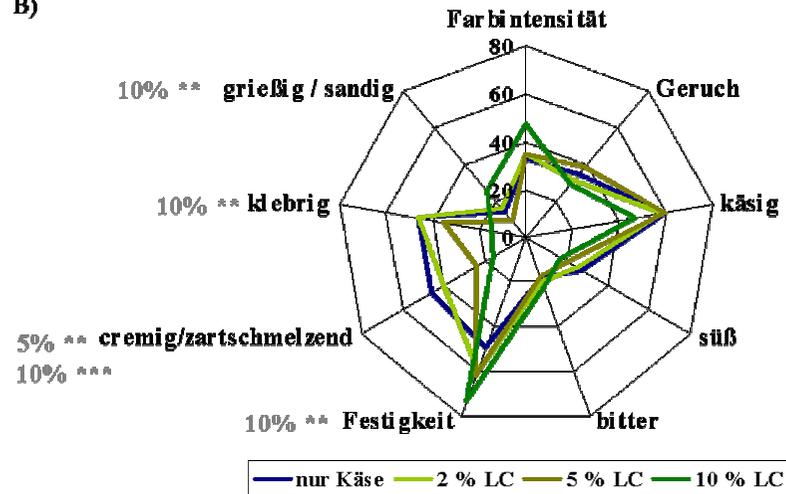
A)



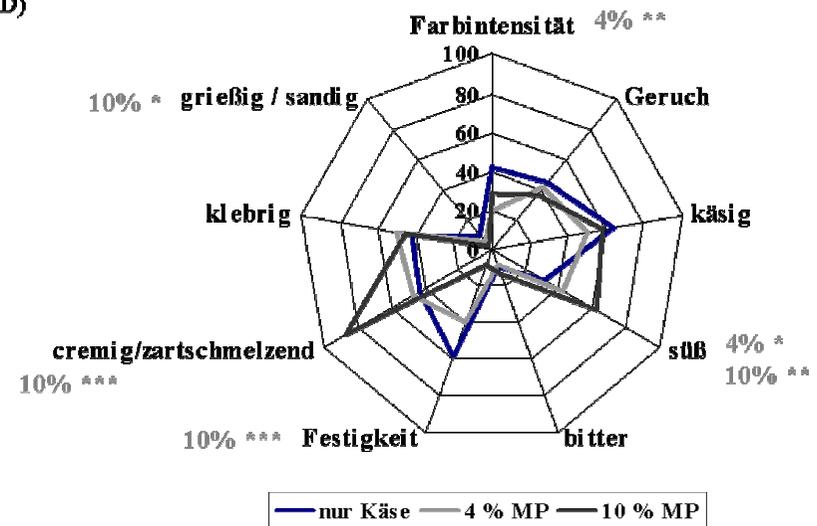
C)



B)



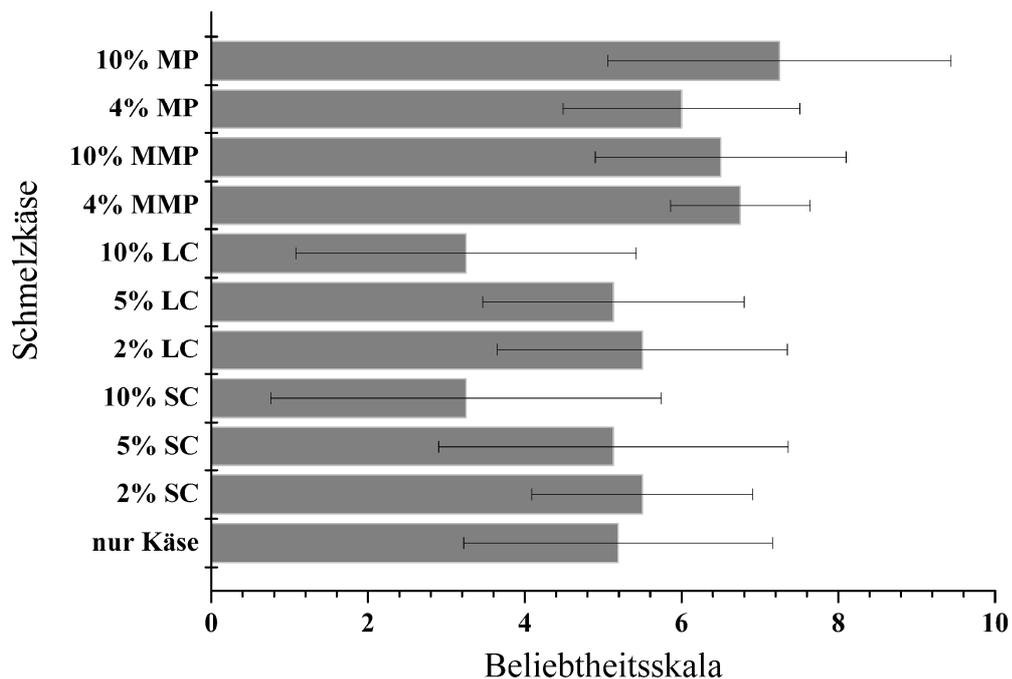
D)



**Abb. 4.71** Profilprüfung der analysierten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Anteilen an Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen nach DIN 10967-1:1999-10. [prozentuale Darstellung der über alle Panelteilnehmer gemittelten Daten, n=8, Signifikanzniveaus \*P <0.05, \*\*P <0.01 im Vergleich zum Referenz-Schmelzkäse (nur Käserohware, keine Zusätze), SC - Säurecasein, LC - Labcasein, MMP - Magermilchpulver, MP - Molkenpulver]

Lediglich für den Geruch und die Ausprägung einer bitteren Note wurden mittels der durchgeführten Profilprüfung keine Unterschiede zwischen der Referenz-Probe und den anderen untersuchten Schmelzkäsen gefunden.

Anhand eines einfachen hedonischen Tests wurde die Beliebtheit der dargebotenen Schmelzkäse im Panel analysiert (siehe dazu **Abb. 4. 72**). Trotz großer Schwankungen innerhalb der Bewertung des Panels für einzelne Schmelzkäse kann anhand der Mittelwerte eine leichte Bevorzugung von Schmelzkäsen mit molkenproteinhaltigen Zusätzen (MMP / MP) gefunden werden. Als Ursache hierfür werden ein ausgewogen süß-aromatischer Geschmack sowie eine cremige Konsistenz angeführt. Ein reiner Zusatz von Säurecasein bzw. Labcasein wird bis zu einem Anteil von 5 % vergleichbar zur Schmelzkäse-Referenz bewertet. Ab einem Gehalt von 10 % ist eine deutliche Tendenz zur Ablehnung dieser Schmelzkäse im Panel feststellbar. Begründet wurde diese Ablehnung vor allem mit einer zu festen und sandigen Konsistenz. Ein fader und unaromatischer Geschmack der Schmelzkäse wurden ebenso kritisiert. Generelle Trends für den heimischen Schmelzkäsemarkt können aber in Folge der geringen Panel-Teilnehmerzahl daraus nicht gezogen werden.



**Abb. 4. 72** Hedonischer Test der analysierten Modell-Schmelzkäse mit variierenden Anteilen an Milcheiweiß, Trockenmilch- und Molkeerzeugnissen. [Bewertungsskala von 9- gefällt außerordentlich bis 1- missfällt außerordentlich, n=8, SC – Säurecasein, LC – Labcasein, MMP – Magermilchpulver, MP- Molkenpulver]

Für die analysierten Modell-Schmelzkäse kann ein direkter Zusammenhang der sensorischen und mikroskopischen Ergebnisse, welche vor allem im Bereich der Textureigenschaften liegt, gefunden werden. Die Erniedrigung der Cremigkeit und

Weichheit der Probe nach Caseinzusatz geht dabei mit einer Vergrößerung der Fettkugeldurchmesser und daraus resultierend einer inhomogenen Verteilung der Fettkugeln einher. Die Festigkeit der Probe wird durch eine kompaktere Proteinmatrix hervorgerufen. Im Gegensatz dazu sind durch molkenproteinhaltige Zusätze mittels Rasterelektronenmikroskopie eine homogenere Fettverteilung und bessere Emulgierung sowie ein schaumartiges, lockeres Proteingerüst nachweisbar, welche sich günstig auf die sensorischen Eigenschaften Cremigkeit und Weichheit auswirken. In Ergänzung zu den durchgeführten chemischen Analysen können mikroskopische und sensorische Methoden somit nicht nur zur Bewertung der Qualität von Schmelzkäseprodukten herangezogen werden sondern durchaus auch zur Eingruppierung dieser Produkte untereinander dienen.

## 5 AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung der qualitativen als auch quantitativen Zusammensetzung von Schmelzkäsen nicht nur anhand einer Messgröße erfolgen kann. Vielmehr wurden zur Klärung der Problematik 13 von 55 analysierten Messgrößen mittels multivariater Datenanalyse als relevant identifiziert. Die Suche nach weiteren v.a. Käse-spezifischen Messgrößen ist in diesem Zusammenhang fortwährend von großem Interesse, da eine Abgrenzung der Käserohware zum Labcasein bislang anhand der gewählten analytischen Marker noch nicht gelungen ist. Mögliche weitere, hilfreiche Messvariablen zur Charakterisierung der Käsematrix können neben der Erstellung von Peptid- auch Aromaprofile sein. Eine anteilige Quantifizierung der enthaltenen Käsemasse in Schmelzkäsen anhand dieser ist jedoch vermutlich auch nur näherungsweise möglich, da der reifungs- und sortenabhängige Einfluss der verschiedenen Käse auch auf diese Messgrößen einen erheblichen Einfluss nehmen kann.

Als vollkommen neue Ansätze zur Bestimmung der Zusammensetzung von Schmelzkäseprodukten sollten die Fluoreszenzspektroskopie sowie RAMAN- und NIR-Spektroskopie in Erwägung gezogen werden. Diese spektroskopischen Verfahren werden bereits seit mehreren Jahren erfolgreich zur Charakterisierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie der Zusammensetzung von Milch- und Milchprodukten eingesetzt (Andersen et al. 2008, González-Martín et al. 2007, Karoui et al. 2007b, Gianferri et al. 2007, Fagan et al. 2007, Rodriguez-Otero et al. 1997). Basiernd auf den jeweiligen Messprinzipien werden die Proben mit unterschiedlicher elektromagnetischer Strahlung angeregt. Nach Aufnahme der jeweiligen Spektren können diese dann in Abhängigkeit der Zusammensetzung unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden. Der Vorteil dieser spektroskopischen Methoden liegt v.a. im geringen analytischen Aufwand zur Probenvorbereitung. Nachteilig wirkt sich hingegen die zur Validierung und Etablierung notwendige sehr große Probenanzahl aus. Je größer die untersuchte Anzahl an Proben, desto aussagekräftigere Ergebnisse zur Unterscheidung der Rezeptur von Schmelzkäseprodukten sind mittels der Fluoreszenz- sowie der RAMAN- als auch NIR-Spektroskopie zu erwarten. In diesem Sinne ist es somit zweckmäßig, das bereits vorhandene Probenspektrum um weitere handelsübliche Schmelzkäseprodukte sowie Modell-Schmelzkäse bekannter Zusammensetzung zu erweitern. Letztere sollten zudem neben der Käserohware nicht nur einen weiteren Proteinzusatz (MMP, MPC, MP, LC, SC) sondern auch Mischungen dieser Rohwaren enthalten.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten ist am globalen Milchmarkt ein stetiger Anstieg der Rohstoffpreise zu verzeichnen. Diese Tatsache und der ohnehin schon hart umkämpfte Milchmarkt haben Schmelzkäseproduzenten dazu veranlasst, die in diesen Erzeugnissen wertgebende Rohware Käse anteilig durch günstigere Füllstoffe auf Milchbasis zu ersetzen. Das Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ist die Etablierung eines Analysenportfolios chemischer Parameter zur Bestimmung der kompositionellen Zusammensetzung von Schmelzkäseerzeugnissen, mit dessen Hilfe eine Unterscheidung der am Markt erhältlichen Produktqualitäten möglich ist. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Abgrenzung der Rohware Käse und den zum Schmelzkäseprodukt weiterhin zugesetzten Proteinpulvern auf Milchbasis (Magermilchpulver, Milchpulverkonzentrat, Molkenpulver, Säurecasein, Labcasein). Zusammen stellen diese Rohwaren mengenmäßig den größten Anteil in Schmelzkäsen dar und bestimmen somit maßgeblich deren technologische und sensorische Eigenschaften und damit verbunden die Qualität der fertigen Produkte.

Im Rahmen dieser vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden handelsübliche Schmelzkäse, Rohwaren zu deren Herstellung sowie Modell-Schmelzkäse bekannter Zusammensetzung anhand 55 analytischer Messgrößen, welche in die Kategorien der Hauptinhaltsstoffe, der organischen Säuren, der Mineralstoffe, der Caseine, der Molkenproteine, der Proteolyseparameter sowie der Maillard-Reaktionsprodukte unterteilt werden können, charakterisiert. Die dargelegten Messgrößen sind dabei größtenteils zur signifikanten, qualitativen Unterscheidung der untersuchten Schmelzkäse untereinander geeignet. Als klassische, Käse charakterisierende Messgrößen können vor allem Marker der abgelaufenen Proteolyse wie beispielsweise die Menge an freien Aminosäuren genutzt werden. Im Gegensatz hierzu sind die molkenproteinhaltigen Rohwaren Magermilchpulver und Molkenpulver durch die Molkenproteine -  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin - sowie durch hohe Gehalte an Kalium, Orotsäure und Lactose gekennzeichnet. Ein hoher Gehalt an intaktem Casein, eine hohe Trockenmasse bzw. ein hoher Gesamtproteingehalt deuten hingegen auf den Zusatz von Säurecasein, Labcasein oder Milchpulverkonzentrat hin. Eine quantitative Abgrenzung der Rohwaren in Schmelzkäse sowie die Bestimmung der Rezeptur unbekannter Proben ist allein mittels einzelner Messgrößen jedoch bislang nicht zufriedenstellend möglich. Der Ausgangsrohstoff Milch, aus welchem alle interessierenden Schmelzrohwaren hergestellt werden, sowie die große Diversität des Rohstoffes Käse begrenzen die Möglichkeiten der univariaten Datenanalyse dabei

zusätzlich. Weiterhin werden aus technologischer und ökonomischer Sicht heutzutage nicht nur einzelne Zusätze sondern zumeist Mischungen dieser zur Herstellung von Schmelzkäse eingesetzt. Infolgedessen können Überlagerungen und Aufhebungen charakteristischer Messgrößen eintreten, welche einzeln betrachtet einen großen Spielraum für Über- sowie Unterschätzungen und folglich resultierend für Fehlinterpretationen zulassen. Eine genaue Zuordnung der Messgrößen zu jeweils charakteristischen Schmelzrohwaren ergibt mit Ausnahme von Caseinomakropeptid (CMP), welches allein nur in Molkenpulver zu finden ist, häufig Überschneidungen. Die hierzu nötigen Untersuchungen konnten, nach der erfolgreichen Etablierung einer RP-HPLC Methode zur Bestimmung von CMP, durchgeführt werden. Mittels dieser ist es möglich durch Differenzbildung, zum Einen direkt vorhandenes CMP bzw. nach enzymatischer Spaltung mit Labferment neu gebildetes CMP zu erfassen. Anhand dieser Methode ist es gelungen, einen Zusatz von Molkenpulver zu Schmelzkäsen in Modell- als auch Handelsproben eindeutig ab einer Beimischung von größer als 1 % nachzuweisen und zu quantifizieren. Parallel dazu kann nach einer Behandlung der Proben mit Labferment der Anteil an neugebildetem CMP zusätzlich zur Bestimmung des Gehaltes an intaktem  $\kappa$ -Casein ermittelt werden.

Weiterhin konnten im Rahmen der durchgeführten analytischen Untersuchungen ausgewählte  $\alpha$ -Amadori-Produkte (Derivate des Lysins, Leucins, Isoleucins und Valins), welche Marker der Frühphase der Maillard-Reaktion am N-Terminus von Peptiden und freien Aminosäuren darstellen, erstmalig in verschiedenen Schmelzkäsen und Käsesorten sowie weiteren proteinhaltigen Rohwaren zur Herstellung von Schmelzkäseerzeugnissen identifiziert und quantifiziert werden. Die ermittelten Werte an  $\alpha$ -AP schwanken in Schmelzkäsen dabei zwischen 331 bis 915  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ . Für  $\epsilon$ -AP, welche infolge der Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäureseitenketten des Lysins entstehen, wurden in handelsüblichen Schmelzkäsen Gehalte von durchschnittlich 1100  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$  ermittelt. Zu etwa 50 % werden AP während der Herstellung von Schmelzkäse, in Abhängigkeit der vorhandenen Menge an Lactose und den gewählten Prozessbedingungen gebildet. Die restlichen 50 % werden hingegen durch die Rohwaren in den Schmelzkäse eingetragen. Im Vergleich zu Schmelzkäse wurden in handelsüblichen Käsen deutlich geringere Gehalte an  $\epsilon$ -AP (24 – 591  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) als auch an  $\alpha$ -AP (138 – 681  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ) ermittelt. Mit fortschreitender Reifung konnte in diesen Produkten ein abnehmender Quotient von  $\alpha$ - zu  $\epsilon$ -AP beobachtet werden. Dieser Wert kann jedoch nur unter Berücksichtigung der jeweiligen Käsesorte zur Beurteilung des Reifungsverlaufes herangezogen werden, da in Abhängigkeit der Käsesorte die Gehalte an  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -AP unterschiedlich schnell abnehmen. Als universeller Marker der Käsureifung sind  $\alpha$ -AP als auch  $\epsilon$ -AP somit nur limitierend geeignet. Beeinflusst wird der Gehalt sowohl an  $\alpha$ -AP als auch an  $\epsilon$ -AP in Käsen weder durch die Gehalte an reduzierendem Zucker

noch durch ablaufende proteolytische Prozesse. Vielmehr werden die Unterschiede in den Gehalten an AP zwischen den analysierten Käsen durch die unterschiedliche Herstellung und variierende, enzymatische Aktivität der Mikroorganismen sowie durch die fortschreitende Maillard-Reaktion bestimmt. Im Vergleich zu thermisch stärker behandelten Lebensmitteln ist die Blockierung essentieller Aminosäuren durch die Bildung von Amadori-Produkten sowohl in Käsen als auch Schmelzkäsen zu vernachlässigen. Eine qualitative Bewertung der Rezeptur von Schmelzkäsen kann anhand der analysierten  $\epsilon$ - als auch  $\alpha$ -AP durchgeführt werden. Vergleichbar zu den anderen diskutierten Messgrößen ist ebenso allein anhand der Amadori-Produkte jedoch keine eindeutige quantitative Abgrenzung der unterschiedlichen Rohwaren in Schmelzkäse möglich.

Um diese Limitierungen auszuräumen, wurden schließlich multivariate Datenanalyseverfahren, welche alle 55 bislang einzeln betrachteten Messgrößen mathematisch miteinander kombinieren, angewendet. Mittels einer durchgeführten Korrelations- und Varianzanalyse kann der Datensatz zunächst von ursprünglich 55 Analysenparametern auf 13 relevante Variablen reduziert werden. Mittels des so reduzierten Datensatzes ist es gelungen, anhand dreier etablierter Datenanalyse-Modelle (Cluster-, Faktoren- und Diskriminanzanalyse) eine visuelle Positionierung der Proben zueinander vorzunehmen, anhand derer eine verfeinerte qualitative und semiquantitative Bewertung der analysierten Schmelzkäseproben möglich ist. Eine absolute Quantifizierung des Käseanteils in Schmelzkäsen allein anhand nur einer Messgröße ist jedoch auch basierend auf diesen Ergebnissen nicht möglich. Zur genaueren Bestimmung der Rezeptur von Schmelzkäsen und Schmelzkäseerzeugnissen müssen somit 13 Messgrößen (Trockenmasse, Protein, Lactose, Nicht-Protein-Stickstoff, Cystinwert, Summenparameter der freien Aminosäuren, Calcium, Kalium, Quotient Mineralstoffe, Caseinomakropeptid,  $\kappa$ -Casein, Orotsäure,  $\epsilon$ -Amadori-Produkte) ermittelt sowie die multivariate Datenanalyse dieser mittels einer Cluster-, Faktoren- und Diskriminanzanalyse angewendet werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

ACQUISTUCCI, R., PANFILI, G. and MARCONI, E., 1996. Application of the microwave hydrolysis to furosine determination in cereal and dairy foods. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3855-3857

Agroscope Liebefeld Posieux., 2006. *Schmelzkäsefehler - Ursachen und Massnahmen*

AIMUTIS, W.R., 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *J. Nutr.*, 134, 989S-995S

AKALIN, A.S., GÖNC, S. and AKBAS, Y., 2002. Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. *J. Dairy Sci.*, 85, 1670-1676

AKALIN, A.S., KINIK, O. and GÖNC, S., 1997. Determination of organic acids in commercial cheeses by high performance liquid chromatography. *Milk Sci. Int.*, 52, 260-262.

ANDERSEN, C.M. and MORTENSEN, G., 2008. Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 720-729.

ANGRICK, M. and REWICKI, D., 1980. Maillard Reaction. *Chemie in unserer Zeit*, 14, 149-157

ARVANITOYANNIS, A.S. and TZOUROS, N.E., 2005a. Implementation of quality control methods in conjunction with chemometrics toward authentication of dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 231-249

ARVANITOYANNIS, I.S., CHALHOUB, C., GOTSIOU, P., LYDAKIS-SIMANTIRIS, N. and KEFALAS, P., 2005b. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 193-203

ARVANITOYANNIS, I.S., KATSOTA, M.N., PSARRA, E.P., SOUFLEROS E.H. and KALLITHRAKA, S., 1999. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 321-336

ARVANITOYANNIS, I.S. and VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M., 2003. Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 173-218

AWAD, R.A., ABDEL-HAMID, L.B., EI-SHABRAWY, S.A. and SINGH, R.K., 2004. Physical and sensory properties of block processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Int. J. Food Pty.*, 7, 429-448

- AWAD, R.A., ABDEL-HAMID, L.B., EL-SHABRAWY, S.A. and SINGH, R.K., 2002. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Food Sci. Technol.*, 35, 54-61
- BACHMANN, H.P., BÜTIKOFER U., BADERTSCHER, R., DALLA TORRE; M., LAVANCHY, P., BÜHLER-MOOR, U., NICK, B., JIMENO, J., WARMKE, R., GROSCHE, W., SIEBER, R. And BOSSET, J.O., 1997. Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei subsp. casei* .1. Microbial, chemical, rheological and sensorial investigations. *Food Sci. Technol.*, 30, 417-428
- BACKHAUS, K., ERICHSON, B., PLINKE, W. and WEIBER, R., 2006. *Multivariate Analysenmethoden - eine anwendungsorientierte Einführung*. 11th ed. Germany: Springer Berlin Heidelberg New York.
- BALLING, R., 2004. Regionalität als Marketinginstrument. In: H.J. LEYRER, O. STRECKER and A. ELLES eds., *Erfolgstrategien für Lebensmittel Business - Trend, Analysen, Fallbeispiel Frankfurt am Main*: DLG-Verlag GmbH, 67-80
- BANKS, J.M., 1998. In: R. EARLY ed., *The Technology of Dairy Products*, London: Blackie Academic and Professional, 81-122
- BAPTISTA, J.A.B. and CARVALHO, R.C.B., 2004. Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. *Food Res. Int.*, 37, 739-747
- BARBAGALLO, R.N., LUPO, M. and TOMASELLI, F., 1998. Furosine as thermal damage marker in Mozzarella cheese from sicily. *Industrie Alimentari*, 37, 614-617
- BEDNARSKI, W., JEDRYCHOWSKI, L., HAMMOND, E.G. and NIKOLOV, Z.L., 1989. A method for the determination of alpha-dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.*, 72, 2474-2477
- BELITZ, H.D., GROSCHE, W. and SCHIEBERLE, P., 2001. Milch und Milchprodukte. In: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 5.th ed. Springer –Verlag, 490-535
- BERGER, W., KLOSTERMEYER, H., MERKENICH, K. and UHLMANN, G., 1989. *Die Schmelzkäseherstellung*. Ladenburg: Benckiser-Knapsack.
- BEVILACQUA, A.E. and CALIFANO, A.N., 1992. Changes in organic acids during ripening of Port Salut argentino cheese. *Food Chem.*, 43, 345-349
- BLEY, M.E., JOHNSON, M.E. and OLSON, N.F., 1985. Factors affecting nonenzymatic browning of process cheese. *J. Dairy Sci.*, 68, 555-561
- Boehringer Mannheim r-biopharm AG. Lactose / D-Galactose. o.J.
- Bong R., 1997. Neue Ansätze zur kompositionellen Analyse von Schmelzkäseerzeugnissen (Diplomarbeit). Technische Universität München, Fakultät Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan
- BOUNOUS, G. and GOLD, P., 1991. The biological activity of undenatured dietary whey proteins - role of glutathione. *Clin. Invest. Med.*, 14, 296-309

- BRANDSCH, M., BRUST, P., NEUBERT, K. and ERMISCH, A., 1994. beta-casomorphins - chemical signals of intestinal transport systems. In: V. BRANTL and H. TESCHEMACHER eds., beta-casomorphins and related peptides: recent developments, Weinheim (Germany), 207-219
- BRICKLEY, C.A., AUTY, M.A.E., PIRAINO, P. and MCSWEENEY, P.L.H., 2007. The effect of natural Cheddar cheese ripening on the functional and textural properties of the processed cheese manufactured therefrom. *J. Food Sci.*, 72, C483-C490
- BRIGNON, G., MERCIER, J.C. and Ribadeau.B, 1972. Primary structure of paracasein k bovine. *FEBS Letters*, 27, 301-305
- BRODY, E.P., 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br.J. Nutr.*, 84, S39-S46
- BUIARELLI, F., CARTONI, G., COCCIOLI, F. and JASIONOWSKA, R., 2003. Capillary zone electrophoresis of some organic acids in milk whey. *J. Sep. Sci.*, 26, 425-428
- BVE - Bundesvereinigung der Deutschen Ernährungsindustrie ,2011. *Marktinformationen - Lebensmitteltrends*.  
[http://www.bve-oline.de/markt\\_und\\_statistik/marktinformationen/lebensmitteltrends](http://www.bve-oline.de/markt_und_statistik/marktinformationen/lebensmitteltrends).
- BUSCH-STOCKFISCH, M., 2002. *Praxishandbuch Sensorik in der Produktentwicklung und Qualitätssicherung*. 1st ed. Hamburg: Behr's Verlag.
- CALABRESE, M.G., MAMONE, G., CAIRA, S., FERRANTI, P., ADDEO, F., 2009. Quantitation of lysinoalanine in dairy products by liquid chromatography mass spectrometry with selective ion monitoring. *Food Chem.*, 116, 799-805
- CALIFANO, A.N. and BEVILACQUA, A.E., 2000. Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *J. Food Comp. Anal.*, 13, 949-960
- CARDENAS RUIZ, J., GUERRA-HERNANDEZ, E. and GARCIA-VILLANOVA, B., 2004. Furosine is a useful indicator in pre-baked breads. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 366-370
- CARDENAS-RUIZ, J., GARCIA-VILLANOVA, B. and GUERRA-HERNANDEZ, E., 2003. Determination of furosine in honey. *J. Liquid Chrom. Rel. Technol.*, 26, 317-326
- CARIC, M., GANTAR, M. and KALAB, M., 1985. Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese. *Food Microstructure*, 4, 297-312.
- CARLES, C. and DUMAS, B.R., 1985. Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide-bond of bovine alpha-S1-casein - comparison of the behavior of this substrate with that of beta-caseins and k-caseins. *FEBS Letters*, 185, 282-286
- CASTELL-PALOU, A., ROSSELLO, C., FEMENIA, A. and SIMAL, S., 2010. Application of multivariate statistical analysis to chemical, physical and sensory characteristics of majorcan cheese. *Int. J. Food Engineering*, 6, article 2

- CATTANEO, S., MASOTTI, F. and PELLEGRINO, L., 2009. Liquid infant formulas: technological tools for limiting heat damage. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10689-10694
- CAVALIERSALOU, C. and CHEFTEL, J.C., 1991. Emulsifying salts influence on characteristics of cheese analogs from calcium caseinate. *J. Food Sci.*, 56, 1542-1547
- CHAMBRE, M. and DAURELLES, J., 2000. Processed Cheese. In: A. ECK and C.J. GILLIS eds., *Cheesemaking: from science to quality assurance*. Lavoisier Publishing Inc., 641-657
- CHAVEZ, N.A, SALINAS, E., JAUREGUI, J., PALOMARES, L. and MACIAS, K., 2008. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agric. Immunol.*, 19, 265-272
- CHURCH, F.C., PORTER, D.H., CATIGNANI, G.L. and SWAISGOOD, H.E., 1985. An ortho-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem.* 146, 343-348
- CLARE, D.A. and SWAISGOOD, H.E., 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83, 1187-1195
- COLLINS, Y.F., MCSWEENEY, P.L.H. and WILKINSON, M.G., 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects*, 3.th ed., Elsevier Academic Press, 373-390
- COLLINS, Y.F., MCSWEENEY, P.L.H. and WILKINSON, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 13, 841-866
- COOLBEAR, K.P., ELGAR, D.F., COOLBEAR, T. and AYERS, J.S., 1996. Comparative study of methods for the isolation and purification of bovine kappa-casein and its hydrolysis by chymosin. *J. Dairy Res.*, 63, 61-71
- CORDELLA, C., MOUSSA, I., MARTEL, A.C., SBIRRAZZUOLI, N. and LIZZIANI-CUVELIER, L., 2002. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1751-1764
- CORZO, N., VILLAMIEL, M., ARIAS, M., JIMENEZ-PEREZ, S. and MORALES, F.J., 2000. The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chem.*, 71, 255-258
- CRABBE, M., 2004. Rennets: General and Molecular Aspects. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects*, 3.th ed., Elsevier Academic Press, 19-45
- CUNHA, C.R., DIAS, A.I. and VIOTTO, W.H., 2010. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Res. Int.*, 43, 723-729
- DE KONING, P.J. and VAN ROOIJEN, P.J., 1971. Estimation of whey proteins in casein co-precipitate or in mixtures with milk powder by the use of a ninhydrin reaction. *Milk Sci.Int.*, 26, 1-6

- DE LA FUENTE, M.A. and JUAREZ, M., 2005. Authenticity assessment of dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 563-585
- DE NONI, I., PELLEGRINO, L. and MASOTTI, F., 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yoghurts from the Italian market. *Lait*, 84, 421-433
- DEKONING, P.J., Vanrooij, P.J. and KOK, A., 1966. Location of amino acid differences in genetic variants of kappa-casein A and B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 616-621
- DEL CASTILLO, M.D., VILLAMIEL, M., OLANO, A. and CORZO, N., 2000. Use of 2-furoylmethyl derivatives of GABA and arginine as indicators of the initial steps of Maillard reaction in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4217-4220
- DELFOUR, A., JOLLES, J., ALAIS, C. and JOLLES, P., 1965. Caseinoglycopeptides - characterization of a methionine residue and of N-terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 452-455
- DHIMAN, T.R., NAM, S.H. and URE, A.L., 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 463-482
- DINKCI, N., AKALIN, A.S., GÖNC, S. and UNAL, G., 2007. Isocratic reverse-phase HPLC for determination of organic acids in Kargi Tulum cheese. *Chromatographia*, 66, S45-S49
- Döhler A., 2005. Einfluss der mittels Transglutaminase sowie Hochdruck gebildeten Proteinmodifikationen auf chemische, physikalische und funktionelle Eigenschaften von Milchproteinen. (Diplomarbeit) Technische Universität Dresden
- DOI, H., IBUKI, F. and KANAMORI, M., 1979. Heterogeneity of reduced bovine kappa-casein. *J. Dairy Sci.*, 62, 195-203
- DRUSCH, S., FAIST, V. and ERBERSDOBLER, H.F., 1999. Determination of N-epsilon-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.*, 65, 547-553
- EBRINGER, L., FERENCIK, M. and KRAJCOVIC, J., 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. *Folia Microbiol.*, 53, 378-394
- EIGEL, W.N., BUTLER, J.E., ERNSTROM, C.A., FARRELL, H.M., JENNES, R. and WHITNEY, McL., 1984. Nomenclature of proteins of cows milk - 5th Revision. *J. Dairy Sci.*, 67, 1599-1631
- ELSAYED, M.M., 1997. Use of plant protein isolates in processed cheese. *Food*, 41, 91-95
- ENNIS, M.P. and MULVIHILL, D.M., 1999. Maillard reaction contributes to variability in hydration characteristics of rennet caseins in solutions of a calcium-sequestering salt. *Int. J. Dairy Technol.*, 52, 156-160
- ERBERSDOBLER, H.F. and SOMOZA, V., 2007. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 423-430

- ERDMANN, P. and NEUMANN, A.G., 1999. *Method for treating a lactic raw material containing GMP*. European Patent 880902.
- FAGAN, C.C., O'DONNELL, C.P., O'CALLAGHAN, D.J., DOWNEY, G., SHEEHAN, E.M., DELAHUNTY, C.M., EVERARD, C. and HOWARD, V., 2007. Application of mid-infrared spectroscopy to the prediction of maturity and sensory texture attributes of Cheddar cheese. *J. Food Sci.*, 72, E130-E137
- FARRELL, H.M., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G.T., BROWN, E.M., BUTLER, J.E., CREAMER, L.K., HICKS, C.L., HOLLAR, C.M., NG-KWAI-HANG, H. and SWAISGOOD, E., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth Revision. *J. Dairy Sci.*, 87, 1641-1674
- FICCADENTI, A., PERRA, F., PORCU, M. and SPANEDDA, L., 2005. Determinations of furosine in ovine dairy products. *Rivista Di Scienza Dell'Alimentazione*, 1-2, 61-69
- FINOT, P.A., DEUTSCH, R. and BUJARD, E., 1981. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Progr. Food Nutr. Sci.*, 5, 345-355
- FINOT, P.A. and MAURON, J., 1972. Blockage of lysine by Maillard reaction .2. chemical properties of derivatives N-(1-deoxy-D-1-fructosyl) and N-(1-deoxy-D-1-lactulosyl) of lysine. *Helv. Chim. Acta*, 55, 1153-1158
- FITZGERALD, R.J., MURRAY, B.A. and WALSH, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.*, 134, 980S-988S
- FOISSY, H., 2005. *Technologie tierischer Lebensmittel / VO 751.103*. Hochschulschrift ed. Universität für Bodenkultur Wien
- FÖRSTER, A., 2006. *Quantitative Studien zu Vorkommen und metabolischem Transit alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte*. (Dissertation) ed. Technische Universität Dresden
- FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M. and MCSWEENEY, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. P.F. FOX, T.P. GUINEE, T.M. COGAN and P.L.H. MCSWEENEY eds., 1.th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers
- FOX, P.F. and MCSWEENEY, P.L.H., 2004. Cheese: An Overview. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 13.th ed. Elsevier Academic Press, 1-18
- FOX, P.F. and MCSWEENEY, P.L.H., 1998. Chemistry and Biochemistry of cheese and fermented milks. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer Verlag. 379-436
- FRIEDRICH, C., 2010. *Milchverarbeitung und Vermarktung in Deutschland - eine deskriptive Analyse der Wertschöpfungskette*., Johann Heinrich von Thünen-Institut; Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei
- GAGNAIRE, V., MOLLE, D., HERROUIN, M. and LEONIL, J., 2001. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4402-4413
- GAGNAIRE, V., PIOT, N., CAMIER, B., VISSERS, J.P., JAN, G. and LEONIL, J., 2004. Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 185-201

- GARCIA-BANOS, J.L., CORZO, N., SANZ, M.L. and OLANO, A., 2004. Maltulose and furosine as indicators of quality of pasta products. *Food Chem.*, 88, 35-38
- GERLACH, S., SPILLER, A. and WOCKEN, C., 2006. Der Markt für Milch und Milcherzeugnisse. *Agrarwissenschaft*, 55, 29-50
- GIANFERRI, R., MAIOLI, M., DELFINI, M. and BROSIO, E., 2007. A low-resolution and high-resolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di bufala campana cheese. *Int. Dairy J.*, 17, 167-176
- GIBSON, G.R., PROBERT, H.M., VAN LOO, J., RASTALL, R.A. and ROBERFROID, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.*, 17, 259-275
- GLENN, T.A., DAUBERT, C.R., FARKAS, B.E. and STEFANSKI, L.A., 2003. A Statistical analysis of creaming variables impacting process cheese melt quality. *J. Food Qual.*, 26, 299-321
- GONZÁLEZ-MARTÍN, I., HERNANDEZ-HIERRO, J.M., MORON-SANCHO, R., SALVADOR-ESTEBAN, J., VIVAR-QUINTANA, A., REVILLA, I. 2007. Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheeses with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Anal. Chim. Acta*, 604, 191-196
- GONZALEZ-MARTIN, I., HERNANDEZ-HIERRO, J.M., REVILLA, I., VIVAR-QUINTANA, A., LOBOS\_ORTEGA, I. and GONZALES-PEREZ, C., 2011. The mineral composition (Ca, P, mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chem.*, 127, 147-152
- GUINEE, T.P., 2002. The functionality of cheese as an ingredient: a review. *Austr. J. Dairy Technol.*, 57, 79-91
- GUINEE, T.P., CARIC, M. and KALÁB, M., 2004. Pasteurized processed cheese and substitute / imitation cheese products. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., CHEESE - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2 Major Cheese Groups, 3.th ed. London: Elsevier Academic Press, 349-394
- GUNASEKARAN, S. and AK, M.M., 2003. *Cheese Reology and Texture*. 1.th ed. Boca Raton: CRC Press.
- GUPTA, S.K., KARAHADIAN, C. and LINDSAY, R.C., 1984. Effect of emulsifier salts on textural and flavor properties of processed cheeses. *J. Dairy Sci.*, 67, 764-778
- HARTMANN, R. and MEISEL, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 163-169
- HARTUNG, J., ELPELT, B. and KLÖSENER, K.H., 1995. *Statistik - Lehr- und Handbuch der angewandten statistik mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*. 10.th ed. München: R. Oldenburg Verlag GmbH.

- HAYALOGLU, A.A., CAKMAKCI, S., BRECHANY, E.Y., DEEGAN, K.C. and McSWEENEY, P.L., 2007. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *J. Dairy Sci.*, 90, 1102-1121
- HAYALOGLU, A.A., GUVEN, M., FOX, P.F. and MCCWEENEY, P.L.H., 2005. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in turkish white-brined cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 88, 3460-3474
- HEERTJE, I., BOSKAMP, M.J., VANKLEEF, F. and GORTEMAKER, F.H., 1981. The microstructure of processed cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 177-179
- HEIER, A., 2006. *Nachweis der geografischen Herkunft von Pistazien anhand der Stabilisotopenverhältnisse*. (Promotionsschrift) ed. Technische Universität Berlin.
- HENLE, T., WALTER, H., KRAUSE, I. and KLOSTERMEYER, H., 1991. Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated Milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.*, 1, 125-135
- HENLE, T., ZEHETNER, G. and KLOSTERMEYER, H., 1995. Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensmitteluntersuchung Forschung*, 200, 235-237
- HERNANDEZ-LEDESMA, B., AMIGO, L., RECIO, I. and BARTOLOME, B., 2007. ACE-Inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *J. Agricul. Chem.*, 55, 3392-3397
- HILL, R.J., NAUGHTON, M.A. and WAKE, R.G., 1970. The major genetic variant macro peptides of kappa casein a comparison of their amino-acid contents and tryptic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 200, 267-274
- HINRICHS, J., 2008. New approaches for cheese technology optimization. *Chem. Eng. Technol.*, 80, 1137-1146
- HODGE, J.E., 1953. Dehydrated foods - chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agricul. Food Chem.*, 1, 928-943
- HUI, Y., 2006. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. CCR Press.
- JAKOB, E., SCHMID, A., WALTHER, B., WECHSLER, D. and WEHRMÜLLER, K., 2008. *Käse, Ein wertvolles Lebensmittel*. Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP
- JARRETT, W.D., ASTON, J.W. and DULLEY, J.R., 1982. A simple method for estimating free amino-acids in cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 37, 55-58
- JAZIRI, M., MIGLIORE-SAMOR, D., CASABIANCA-PIGNÈDE, M.R., KEDDAD, K., MORGAT, J.L. and JOLLÉS, P., 1992. Specific binding-sites on human phagocytic blood-cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human-milk proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160, 251-261
- KALAB, M., 1993. Practical aspects of electron-microscopy in Dairy research. *Food Structure*, vol. 12, no. 1, pp. 95-114
- KAMMERLEHNER, J., 2003. *Käsetechnologie*. 1.th ed. Haltern: Walter Bode Verlag

- KANAMORI, M., DOI, H., IDENO, S. and IBUKI, F., 1981. Presence of o-glycosidic linkage through serine residue in kappa-casein component from bovine mature milk. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 27, 231-241
- KAPOOR, R. and METZGER, L.E., 2008. Process cheese: scientific and technological aspects - a review. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety*, 7, 194-214
- KAROUI, R. and DE BAERDEMAEKER, J., 2007a. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chem.*, 102, 621-640
- KAROUI, R., DUFOUR, E., SCHOONHEYDT, R. and BAERDEMAEKER, J.D., 2007b. Characterisation of soft cheese by front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools: effect of the manufacturing process and sampling zone. *Food Chem.*, 100, 632-642
- KELLY, P.M. and O'KENNEDY, B.T., 2001. The effect of casein/whey protein ratio and minerals on the rheology of fresh cheese gels using a model system. *Int. Dairy J.*, 11, 525-532
- KESSLER, W., 2006. *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*. 1.th ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- KLOSTERMEYER, H. and BUCHHEIM, W., 1988. Mikrostruktur von Schmelzkäseerzeugnissen. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 40, 219-231
- KOBAYASHI, H., KUSAKABE, I. and MURAKAMI, K., 1985. Substrate-specificity of the milk-clotting enzyme from *Irpex-Lacteus* on alpha-S1-casein. *Agricul. Biol. Chem.*, 49, 1611-1619
- KOCKLÄUNER, G., 2000. *Multivariate Datenanalyse - Am Beispiel des statistischen Programmpakets SPSS*. 1.th ed. Braunschweig / Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
- KRAUSE, R., 2005. *Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-Terminalen 2(1H)-Pyrazinonen*. (Dissertation) ed. Technische Universität Dresden
- KRAUSE, R., KNOLL, K. and HENLE, T., 2003. Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Euro. Food Res. Technol.*, 216, 277-283
- KRÖMKER, V., 2007. *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Thieme Georg Verlag
- KULOZIK, U. and GUILMINEAU, F., 2003. Food process engineering and dairy technology at the Technical University of Munich. *Int. J. Dairy Technol.*, 56, 191-198
- KWAK, H.S., CHOI, S.S., AHN, J. and LEE, S.W., 2002. Casein hydrolysate fractions act as emulsifiers in process cheese. *J. Food Sci.*, 67, 821-825
- LAHOV, E. and REGELSON, W., 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 131-145

- LAZARIDIS, H.N., ROSENAU, J.R. and MAHONEY, R.R., 1981. Enzymatic control of metabolability in a direct acidified cheese product. *J. Food Sci.*, 46, 332-335
- LECHNER, E. and ELBERTZHAGEN, H., 1985. Special methods for the differentiation of cottage cheeses produced by differing procedures. *J. Food Res. Technol.*, 180, 41-44
- LEDL, F. and SCHLEICHER, E., 1990. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human-body. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 29, 565-594
- LEE, S.K., ANEMA, S. and KLOSTERMEYER, H., 2004. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 39, 763-771
- LEE, S.K., BUWALDA, R.J., EUSTON, S.R., FOEGEDING, E.A. and McKENNA, A.B., 2003. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Food Sci. Technol.*, 36, 339-345
- LIESKE, B., FABER, W. and KONRAD, G., 1996. A new spectrophotometric approach for following the release of caseinomacropeptide during renneting of milk. *Milk Sci. Int.*, 51, 548-551
- LOBATO-CALLEROS, C., AGUIRRE-MANDUJANO, E., VERNON-CARTER, E.J. and SANCHEZ-GARCIA, J., 2000. Viscoelastic properties of white fresh cheese filled with sodium caseinate. *J. Texture Studies*, 31, 379-390
- LUCEY, J.A. and FOX, P.F., 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture - a review. *J. Dairy Sci.*, 76, 1714-1724
- MACFARLANE, S., MACFARLANE, G.T. and CUMMINGS, J.H., 2006. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Therap.*, 24, 701-714
- MACRAE, J., O'REILLY, L. and MORGAN, P., 2005. Desirable characteristics of animal products from a human health perspective. *Livestock Prod. Sci.*, 94, 95-103
- MAILLARD, L.C., 1917. Identification of synthesised humic materials with natural humic materials. *Annales De Chimie France*, 7, 113-152
- MAILLARD, L.C., 1916. A Synthesis of humic matter by effect of amine acids on sugar reducing agents. *Annales De Chimie France*, 5, 258-316.
- MAILLARD, L.C., 1912. The action of amino acids on sugar; the formation of melanoidin by a methodic route. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*, 154, 66-68
- MANN, E., 2004. Processed Cheese. *Dairy Ind. Int.*
- MARCHESSEAU, S., GASTALDI, E., LAGAUDE, A. and CUQ, J.L., 1997. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *J. Dairy Sci.*, 80, 1483-1489
- MARILLEY, L. and CASEY, M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 90, 139-159

- MARTIN-DIANA, A.B., FRAGA, M.J. and FONTECHA, J., 2002. Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *Euro. Food Res. Technol.*, 214, 282-286
- MASHAYEKHI, P., 2005. *Eine massensensitive elektronische Nase zur Erkennung, Unterscheidung und Qualitätskontrolle von Safran und Trüffel*. (Promotionsschrift) ed. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- MASOTTI, F. and DE NONI, I., 2005. Significance of furosine index in Taleggio cheese-making. *Ital. J. Food Sci.*, 17, 429-436
- Matissek R, Schnepel FM, Steiner G., 1989. *Lebensmittelanalytik*. 1. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag
- MAURER, S.V., 2005. Bestimmung von alpha-N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren in peptidhaltigen Lebensmitteln. wissenschaftliche Abschlussarbeit ed. Technische Universität Dresden
- Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel., 2011. *Flyer "Käse Und Käseimitat" - Auswirkungen Auf Die Ernährung*. [http://www.mri.bund.de/no\\_cache/de/veroeffentlichungen/verbraucherinformationen/kaese-und-kaese-imitat.html](http://www.mri.bund.de/no_cache/de/veroeffentlichungen/verbraucherinformationen/kaese-und-kaese-imitat.html).
- MCKENZIE, H.A. and WAKE, R.G., 1961. An improved method for isolation of kappa-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 240-242
- MCSWEENEY, P.L.H., 2004. Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *CHEESE - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects 3.th ed*. London: Elsevier Academic Press., 347-360
- MCSWEENEY, P.L.H. and FOX, P.F., 2004a. Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *CHEESE - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects 3.th ed*. London: Elsevier Academic Press, 362-371
- MCSWEENEY, P.L.H., OTTOGALLI, G. and FOX, P.F., 2004b. Diversity of Cheese Varieties: An Overview. In: P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T.M. COGAN and T.P. GUINEE eds., *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2 Major Cheese Groups 3rd ed*. Elsevier Academic Press, 1-22
- MCSWEENEY, P.L.H. and SOUSA, M.J., 2000. Biochemical Pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 80, 293-324
- MEHRA, R., MARNILA, P. and KORHONEN, H., 2006. Milk immunoglobulins for health promotion. *Int. Dairy J.*, 16, 1262-1271
- MEISEL, H., 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.*, 12, 1905-1919
- MEISEL, H., 2001. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Austr. J. Dairy Technol.*, 56, 83-92
- MEISEL, H., 1995. Application of 4th-derivative spectroscopy to quantitation of whey-protein and casein in total milk protein. *Milk Sci. Int.*, 50, 247-251

- MEISEL, H., 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Prod. Sci.*, 50, 125-138
- MEIXNER, O., 2007. *Marktanalyse ausgewählter Märkte der europäischen Agrar- und Ernährungswirtschaft*. Hochschulschrift ed. Universität für Bodenkultur Wien
- MENSINK, R.P., ZOCK, P.L., KESTER, A.D.M. and KATAN, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 1146-1155
- MERKENICH, K., MAURER-ROTHMANN, A., SCHEURER, G., WALTER, E., ALBERTSEN, K. and WILMSEN, A., 1996. *Verwendung von stabilisierten Molkenproteinpulvern zur Herstellung von Schmelzkäse und Käsezubereitungen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung*. EP0651610 ed., Patentschrift
- MERKENICH, K., MAURER-ROTHMANN, A., SCHEURER, G., WALTER, E., ALBERTSEN, K. and WILMSEN, A., 1995. *Verwendung stabilisierter Proteinpulver zur Herstellung von Schmelzkäse und Käsezubereitungen*. DE4222875C2 ed. PCT/EP1993/001813, Patentschrift
- Metrohm. Application Bulletin; Nr: 134/1 d; Bestimmung von Kalium mit der ionenselektiven Elektrode. o.J.
- Metrohm. Application Bulletin Nr: 137/3 d; Coulometrische Wasserbestimmung nach Karl-Fischer. o. J.
- Metrohm. D Milch und Milchprodukte, Methode 22 - D 4 Calcium. 2003.
- MEZZAROBA, L.F.H., CARVALHO, J.E., PONEZI, A.N., ANTONIO, M.A., MONTEIRO, K.M., POSSENTI, A. and SGARBIERI, V.C., 2006. Antiulcerative properties of bovine alpha-lactalbumin. *Int. Dairy J.*, 16, 1005-1012
- MICHAELIDOU, A.M., 2008. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, 79, 42-50
- Milchindustrie-Verband e.V., 2011a. *Innovationen - Deutsche Milchindustrie setzt weiter auf Ausbau der Produktpalette*.  
<http://www.milchindustrie.de/de/milch/innovationen/innovationen.html>.
- Milchindustrie-Verband e.V., 2011b. *Milch und Markt, Presse-Online-Services Der Deutschen Milchindustrie*.  
[http://www.milchindustrie.de/de/milch/branchenzahlen/produktion\\_milcherzeugnisse.html](http://www.milchindustrie.de/de/milch/branchenzahlen/produktion_milcherzeugnisse.html).
- Milchindustrie-Verband e.V., 2011c. *Molke - Einsatz und Chancen in der Lebensmittelindustrie*  
[http://www.milchindustrie.de/de/molke/einsatz\\_und\\_chancen\\_lebensmittelindustrie/](http://www.milchindustrie.de/de/molke/einsatz_und_chancen_lebensmittelindustrie/).
- Milchindustrie-Verband e.V., 2011d. *Privater Verbrauch - Wieviel Milch und Milchprodukte verzehrt ein Bundesbürger?*  
<http://www.meine-milch.de/markt/deutschland>.
- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428

- MIRALLES, B., KRAUSE, I., RAMOS, M. and AMIGO, L., 2006. Comparison of capillary electrophoresis and isoelectric focusing for analysis of casein/caseinate addition on processed cheeses. *Int. Dairy J.*, 16, 1448-1453
- MIRALLES, B., RAMOS, M. and AMIGO, L., 2000. Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses. *J. Dairy Res.*, 67, 91-100
- MOLLE, D. and LEONIL, J., 1995. Heterogeneity of the bovine kappa-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid-chromatography online with electrospray-ionization mass-spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 708, 223-230
- MONTANEZ, A., et al, 2000. Detection of glucomacropeptide (gmp) as an indicator of adulteration with cheese whey in dehydrated milk. *J. Veterinaria - Mexico*, 31, 217-222
- MORENOROJAS, R., POZOLORA, R., ZURERACOSANO, G. and AMAROLOPEZ, M.A., 1994. Calcium, magnesium, manganese, sodium and potassium variations in Manchego-type cheese during ripening. *Food Chem.*, 50, 373-378
- MORR, C.V. and SEO, A., 1988. Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. *J. Food Sci.*, 53, 80-87
- MOTTRAM, D.S., WEDZICHA, B.L. and DODSON, A.T., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449
- MULLALLY, M.M., MEISEL, H. and FITZGERALD, R.J., 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, 7, 299-303
- MULSOW, B.B., 2008. Struktur-Eigenschaftsbeziehungen nichtenzymatisch glykosylierter Molkenproteine. Dissertation ed. Technische Universität Dresden
- NAGAOKA, S., et al, 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 11-17
- NAKANO, T., KUSUMP, S., IKAWA, N. and OZIMEK, L., 2006. Detection of whey in margarine by analysis of sialic acid and kappa-casein glycomacropeptide. *Milk Sci. Int.*, 61, 36-40
- NEELIN, J.M., 1964. Variants of  $\kappa$ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 47, 506-509
- NEWBURG, D.S., RUIZ-PALACIOS, G.M. and MORROW, A.L., 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.*, 25, 37-58
- NICOLETTI, I., et al, 2000. Determination of furosine in hydrolyzate of processed milk by HPLC using a narrow bore column and diode-array detector. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 23, 717-726
- NTAILIANAS, H.A. and WHITNEY, R.M., 1963. Direct complexometric determination of calcium and magnesium in milk (eriochromeblack T method). *J. Dairy Sci.*, 46, 1335-1341
- OLSON, N.F., 1995. Cheese. In: H.J. REHM and G. REED eds., *Biotechnology* 9.th ed. Weinheim: Verlag Chemie. 355-384

- OTTO, M., 1997. Chemometrie - Statistik und Computereinsatz in der Analytik. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
- PANASIUK, R., AMAROWICZ, R., KOSTYRA, H. and SIJTSMA, L., 1998. Determination of alpha-amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem.*, 62, 363-367
- PARODI, P.W., 2004. Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.*, 59, 3-59
- PARODI, P.W., 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, 82, 1339-1349
- PELLEGRINI, A., 2003. Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharmaceut. Design*, 9, 1225-1238
- PELLEGRINO, L., BATELLI, G., RESMINI, P., FERRANTI, P., BARONE, F. and ADDEO, F., 1997. Effects of heat load gradient occurring in moulding on characterization and ripening of Grana Padano. *Lait*, 77, 217-228
- PELLEGRINO, L., CATTANEO, S., MASOTTI, F. and PSATHAS, G., 2010. Detection of milk powder and caseinates in Halloumi cheese. *J. Dairy Sci.*, 93, 3453-3460
- PELLEGRINO, L., RESMINI, P., DENONI, I. and MASOTTI, F., 1996. Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 79, 725-734
- PENNDORF, I., BIEDERMANN, D., MAURER, S.V. and HENLE, T., 2007. Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: quantification of alpha-N-(2-furoylmethyl) amino acids. *J. Agricul. Food Chem.*, 55, 723-727
- PEREIRA, C.I., GOMES, A.M.P. and MALCATA, F.X., 2009. Microstructure of cheese: processing, technological and microbiological considerations. *Trends Food Sci. Technol.*, 20, 213-219
- PERRA, E., PORCU, M., SANJUST, M.T. and SPANEDDA, L., 2002. Determination of furosine in sheep dairy products.. *Rivista Di Scienza Dell'Alimentazione*, 31, 165-178
- PIERGIOVANNI, L., DE NONI, I., FAVA, P. and SCHIRALDI, A., 1989. Nonenzymatic browning in processed cheeses kinetics of the Maillard reaction during processing and storage. *Ital. J. Food Sci.*, 1, 11-20
- PISKA, I. and STETINA, J., 2004. Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *J. Food Eng.*, 61, 551-555
- POSSEMIERS, S., VAN CAMP, J., BOLCA, S. and VERSTRAETE, W., 2005. Characterization of the bactericidal effect of dietary sphingosine and its activity under intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 59-70
- POULIOT, Y. and GAUTHIER, S.F., 2006. Milk growth factors as health products: some technological aspects. *Int. Dairy J.*, 16, 1415-1420

- PRÄVE, P., FAUST, U., SITTIG, W. and SUKATSCH, A., 1984. *Handbuch der Biotechnologie*. 2nd ed. Oldenbourg Verlag
- PUJOLLE, J., Ribadeau.B, GARNIER, J. and PION, R., 1966. A study of kappa-casein components .I. Preparation . evidence for a common C-terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 285-290
- PURNA, S.K.G., POLLARD, A. and METZGER, L.E., 2006. Effect of formulation and manufacturing parameters on process cheese food functionality - I. trisodium citrate. *J. Dairy Sci.*, 89, 2386-2396
- RABE, E., 1983. Determination of sodium and potassium by ion-sensitive electrodes. *Z Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 176, 270-274
- RAINER, L. and HEISS, C.J., 2004. Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J. Am. Dietetic Assoc.*, 104, 963-968
- RAMIREZ AYALA, A., VEGA Y LEON, S., PRADO FLORES, G. and GUTIERREZ TOLENTINO, R., 2009. Application of three analytic methods for the detection of cheese serum in UHT milk commercialized in Mexico City. *Interciencia*, 34, 406-412
- REGESTER, G.O. and SMITHERS, G.W., 1991. Seasonal-changes in the beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, glycomacropeptide, and casein content of whey-protein concentrate. *J. Dairy Sci.*, 74, 796-802
- RESMINI, P. and PELLEGRINO, L., 1991. Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chromatogr. Lab*, 6, 11
- RESMINI, P., PELLEGRINO, L. and BATTELLI, G., 1990. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci.*, 2, 173-184
- RESMINI, P., PELLEGRINO, L. and CATTANEO, S., 2003. Furosine and other heat-treatment indicators for detecting fraud in milk and milk products. *Ital. J. Food Sci.*, 15, 473-484
- REYNOLDS, E.C., 1999. Anticariogenic casein phosphopeptides. *Protein and Peptide Lett.*, 6, 295-303
- RIMBACH, G., MÖHRING, J. and ERBERSDOBLER, H.F., 2010. *Lebensmittelwarenkunde für Einsteiger: Käse und andere Milchprodukte*. 1.th ed. Berlin: Springer Verlag
- RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M. and CENTENO, J., 1997. Analysis of dairy products by Near-Infrared Spectroscopy: a review. *J. Agricul. Food Chem.*, 45, 2815-2819
- ROEDER, G., 1954. *Gründzüge der Milchwirtschaft und des Molkereiwesens*. Hamburg: Verlag Paul Parey
- ROGINSKI, H.F., FUQUAY, J.W. and FOX, P.F., 2003. *Encyclopedia of dairy sciences - Volume 1*. San Diego (California, US): Acedemic Press

- ROHM, H., TSCHAGER, E. and JAROS, D., 1996. Determination of proteolysis in swiss cheese: comparison of the Kjeldahl method and a spectrophotometric OPA assay. *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, 29, 191-194
- SAITO, T., YAMAJI, A. and ITOH, T., 1991. A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. *J. Dairy Sci.*, 74, 2831-2837
- SANZ, M.L., DEL CASTILLO, M.D., CORZO, N. and OLANO, A., 2003. 2-Furoylmethyl amino acids and Hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agricul. Food Chem.*, 51, 4278-4283
- SANZ, M.L., DEL CASTILLO, M.D., CORZO, N. and OLANO, A., 2001. Formation of Amadori compounds in dehydrated fruits. *J. Agricul. Food Chem.*, 49, 5228-5231
- SANZ, M.L., DEL CASTILLO, M.D., CORZO, N. and OLANO, A., 2000. Presence of 2-furoylmethyl derivatives in hydrolysates of processed tomato products. *J. Agricul. Food Chem.*, 48, 468-471
- SCHANBACHER, F.L., TALHOUK, R.S. and MURRAY, F.A., 1997. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Prod. Sci.*, 50, 105-123
- SCHLIMME, E. and BUCHHEIM, W., 1995. *Milch und ihre Inhaltsstoffe - chemische und physikalische Grundlagen*. Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann
- SCHUSTER, G.S., et al, 1980. Anticaries and antiplaque potential of free-fatty acids in vitro and in vivo. *Pharmacol. Ther. Dent.*, 5, 25-33
- SCHWIETZKE, U., SCHWARZENBOLZ, U. and HENLE, T., 2009. Influence of cheese type and maturation time on the early Maillard reaction in cheese. *Czech. J. Food Sci.*, 27, S140-S142
- SCHWIETZKE, U.; MALINOWSKI, J; ZERGE, K. and HENLE, T., 2011. Quantification of Amadori products in cheese. *Eur. Food Res. Technol.*, 233, 243 - 251
- Scil diagnostics. Enzytec™D-/L-Milchsäure, Id-N°: 1255. 2005a
- Scil diagnostics. Enzytec™Lactose / D-Galactose, Id-N°: 1213. 2005b
- Selz GJ. Sumerer und Akkader: Geschichte, Gesellschaft und Kultur. München: C. H. Beck Verlag; 2005.
- SHAMMET, K.M., BROWN, R.J. and MCMAHON, D.J., 1992. Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from kappa-casein. *J. Dairy Sci.*, 75, 1380-1388.
- SHIMP, L.A., 1985. Process cheese principles. *Food Technol.*, 39, 63
- SHIRASHOJI, N., JAEGGI, J.J. and LUCEY, J.A., 2006. Effect of trisodium citrate concentration and cooking time on the physicochemical properties of pasteurized process cheese. *J. Dairy Sci.*, 89, 15-28
- SIEGL, T., 2003. Studien zur Quervernetzung von Milchproteinen und zur Bildung individueller Crosslink-Aminosäuren. (Dissertation) ed. Technische Universität Dresden

- Simat TJ. Einführung in die Verfahren zur sensorischen Beurteilung von Lebensmitteln. 2004. Praktikumsskript ed. Technische Universität Dresden
- SOUCI, S.W., FACHMANN, W. and KRAUT, H., 2008. Food Composition and Nutrition Tables: Die Zusammensetzung Der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen, 7.th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
- SPENCER, R.L. and WOLD, F., 1969. A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins. *Anal. Biochem.*, 32, 185-190
- Spreer E. Technologie der Milchverarbeitung. 7. neubearbeitete und aktualisierte Auflage ed. Hamburg: B.Behr's Verlag GmbH & Co.; 1999
- STEINMANN, U., 2005. Herkunftsanalyse von tierischem Eiweiß mit HPLC und chemometrischer Auswertung. Promotionsschrift ed. Technische Universität Clausthal
- SAINT-GELAIS, D., DOYON, G., ROLLAND, J.R. and GOULET, J., 1991. Sugar and organic-acid concentrations during ripening of Cheddar cheese-like products. *Milk Sci. Int.*, 46, 288-291
- STRAHM, W., 2006. Schmelzkäsefehler – Ursachen und Massnahmen. Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP) ed., 1.th ed. Bern
- STRECKER, O.A. and OECKERMANN, G., 2010. Molkereiindustrie blickt nach vorn. *Deutsche Molkerei Zeitung*, 8/2010, 26-27
- SUHAIJ, M. and KORENKOVSKA, M., 2008. Study of some European cheeses geographical traceability by pattern recognition analysis of multielemental data. *Euro. Food Res. Technol.*, 227, 1419-1427
- SWAISGOOD, H., 1975. Primary sequence of kappa-casein. *J. Dairy Sci.*, 58, 583-592
- SWAISGOOD, H.E., 1992. Chemistry of caseins. In: P.F. FOX ed., *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* London: Elsevier Applied Science, 63-110
- SWAISGOOD, H.E., 1982. Chemistry of milk proteins. In: P.F. FOX ed., *Developments in Dairy Chemistry-1: Proteins* New York: Applied Science Publishers, 1-59
- SWAISGOOD, H.E., BRUNNER, J.R. and LILLEVIK, H.A., 1964. Physical parameters of  $\kappa$ -casein from cows milk. *Biochemistry*, 3, 1616-1623
- TAMIME, A.Y., KALAB, M., DAVIES, G. and YOUNIS, M.F., 1990. Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. *Food Structure*, 9, 23-37
- TEMPLETON, H.L. and SOMMER, H.H., 1930. Some observations on process cheese. *J. Dairy Sci.*, 13, 203-220
- TESCHEMACHER, H., KOCH, G. and BRANTL, V., 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, 43, 99-117
- THOMA, C., KRAUSE, I. and KULOZIK, U., 2006. Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *Int. Dairy J.*, 16, 285-293

- THOMAS, M.A., 1973. The manufacture of processed cheese scientific principles. *New South Wales Department of Agriculture Science Bulletin*, 84, 1-55
- THORMAR, H. and HILMARSSON, H., 2007. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem. Phys. Lipids*, 150, 1-11
- THORMAR, H., ISAACS, C.E., KIM, K.S. and BROWN, H.R., 1994. Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty-acids and monoglycerides. *Slow Infections of the Central Nervous System*, 724, 465-471
- TIRELLI, A., 1998. Improved method for the determination of furosine in food by capillary electrophoresis. *J. Food Prot.*, 61, 1400-1404
- TIRELLI, A. and PELLEGRINO, L., 1995. Determination of furosine in dairy products by capillary zone electrophoresis: a comparison with the HPLC method. *Ital. J. Food Sci.*, 7, 379-385
- TOKUSOGLU, O., AKALIN, A.S. and UNAL, K., 2006. Rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine (epsilon-N-2-furoylmethyl-L-lysine) in yogurt and cheese marketed in turkey. *J. Food Qual.*, 29, 38-46
- TOKUSOGLU, O., AKALIN, A.S. and UNAL, M.K., 2004. A rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine (epsilon-N-2-furoylmethyl-L-lysine) in pasteurized and UHT milks. *Milk Sci. Int.*, 59, 502-505
- TÖPEL, A., 2004. *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel*. 3.th ed. Behr's Verlag
- TORMO, M. and IZCO, J.M., 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *J. Chromatogr. A*, 1033, 305-310
- TSCHAGER, E., 1994a. Anwendung der OPA-Methode zur Bestimmung der Proteolyse im Käse. *Lebensmittelindustrie und Milchwissenschaft*, 20, 990-9
- TSCHAGER, E., 1994b. Eine einfache Methode zur Kontrolle des Eiweißabbaus im Käse. *Milchwirtschaftliche Berichte*. 119, 69-74
- UPRETI, P., MCKAY, L.L. and METZGER, L.E., 2006. Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *J. Dairy Sci.*, 89, 429-443
- VAN HOOYDONK, A.C.M., OLIEMAN, C. and HAGEDOORN, H.G., 1984. Kinetics of the chymosin-catalyzed proteolysis of kappa casein in milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 38, 207-222
- VEGARUD, G.E., LANGSRUD, T. and SVENNING, C., 2000. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Brit. J. Nutr.*, 84, S91-S98
- VERDINI, R.A., ZORRILLA, S.E. and RUBIOLO, A.C., 2004. Characterisation of soft Cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone. *Int. Dairy J.*, 14, 445-454

- VESPER, H., et al, 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.*, 129, 7, 1239-1250
- VILLAMIEL, M., ARIAS, M., CORZO, N. and OLANO, A., 2000. Survey of the furosine content in cheeses marketed in Spain. *J. Food Prot.*, 63, 974-975
- VILLAMIEL, M., ARIAS, M., CORZO, N. and OLANO, A., 1999. Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks. *Z. Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 208, 169-171
- VREEMAN, H.J., BOTH, P., BRINKHUIS, J.A. and VANDERSPEK, C., 1977. Purification and some physicochemical properties of bovine kappa-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 491, 93-103
- VREEMAN, H.J., VISSER, S., SLANGEN, C.J. and VANRIEL, J.A.M., 1986. Characterization of bovine kappa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by High-Performance Gel-Permeation Chromatography. *Biochem. J.*, 240, 87-97
- WELLNER, A., HUTTL, C. and HENLE, T., 2009. Influence of heat treatment on the formation of Amadori compounds in carrots. *Czech. J. Food Sci.*, 27, S143-S145
- WOYCHIK, J.H., 1964. Polymorphism in  $\kappa$ -casein of cow's milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 267-271
- WOYCHIK, J.H., KALAN, E.B. and NOELKEN, M.E., 1966. Chromatographic isolation and partial characterization of reduced  $\kappa$ -casein components. *Biochem.*, 5, 2276-2282
- YE, A., HEWITT, S. and TAYLOR, S., 2009. Characteristics of rennet-casein-based model processed cheese containing maize starch: rheological properties, Meltabilities and microstructures. *Food Hydrocolloids*, 23, 1220-1227
- ZIMECKI, M. and KRUZEL, M.L., 2007. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 6, 89-106

## 8 ANHANG

### Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE

Tab. 8.1 Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE.

Marker	Protein [Molekulargewicht-kDa]
Protein Test Mixture 4	Carbonic anhydrase [29]
	Albumin egg [45]
	Albumin bovine [67]
	Phosphorylase B [97,4]
Protein Test Mixture 5	Trypsin inhibitor bovine lung [6,5]
	Cytochrom C [12,5]
	Trypsin inhibitor soybean [21]
	Carbonic anhydrase [29]
ROTI®-Mark Standard	Myosin beef [212]
	β-Galactosidase, rec. <i>E.coli</i> [118]
	Serumalbumin beef, glycosyliert [66]
	Ovalbumin chicken, glycosyliert [43]
	Carbonic anhydrase [29]
	Trypsin inhibitor soybean [20]
	Lysozyme chicken [14]

### Prüfbogen der Profilprüfung

Vor Ihnen liegen Prüfproben, deren Intensität in den beschriebenen Merkmalseigenschaften bestimmt werden soll. Markieren Sie dazu Ihren sensorischen Eindruck auf der Skale zwischen sehr schwach und sehr stark. Benutzen Sie für jede Probe die angegebene Markierung. Falls Ihnen noch weitere Eindrücke während des Verkostens auffallen, notieren Sie diese bitte in nachfolgender Tabelle.

Probennummer	Markierung	Bemerkung / weitere nicht aufgeführte Eindrücke / Merkmalsausprägungen

**Aussehen / Farbe**

Farbintensität

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

**Geruch**

milchig bis

würzig-aromatisch

|—————|—————|  
 milchig    würzig

**Geschmack**

käsig-aromatisch

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

süß

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

bitter

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

**Textur (Mundgefühl / Konsistenz)**

weich bis fest

|—————|—————|  
 weich    fest

cremig / zartschmelzend

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

klebrig

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

grießig / sandig

|—————|—————|  
 sehr schwach            sehr stark

### Prüfbogen der Hedonischen Prüfung

Bitte verkosten Sie die vorliegenden Proben und tragen Sie ihre Beliebtheitswertung in die Tabelle ein. Wenn möglich begründen Sie Ihre Entscheidung.

Note	Prädikat	Probennummer					
9	gefällt außerordentlich						
8	gefällt sehr						
7	gefällt einigermaßen						
6	gefällt geringfügig						
5	weder gefällt / noch missfällt						
4	missfällt geringfügig						
3	missfällt einigermaßen						
2	missfällt sehr						
1	missfällt außerordentlich						

	Bemerkungen /Entscheidungsbegründung
Probennummer: Skalennote:	

## Hedonisches Bewertungsschema

Tab. 8.2 Hedonisches Bewertungsschema nach (Simat 2004).

“Gefallenbereich”	Prüferurteile [%]	Prüfaussage - Konsequenz
	100 bis 94	ausserordentlich akzeptiert (frei von Beanstandungen)
	93 bis 87	sehr akzeptiert (nahezu frei von Beanstandungen)
	86 bis 80	akzeptiert (nicht frei von Beanstandungen)
	79 bis 73	wenig akzeptiert (Beanstandungen gegeben)
	72 bis 66	sehr wenig akzeptiert (gewichtige Beanstandungen)
	65 bis 0	nicht akzeptiert (sehr gewichtige Beanstandungen)

## Überführungsfaktoren

Durch Multiplikation der ermittelten Stoffmenge an FMAS mit dem jeweiligen Überführungsfaktor (ÜF) kann die Konzentration an Amadori-Produkt berechnet werden. Die von (Maurer 2005, Penndorf et al. 2007) analytisch ermittelten ÜF ausgewählter Lactulosylderivate sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

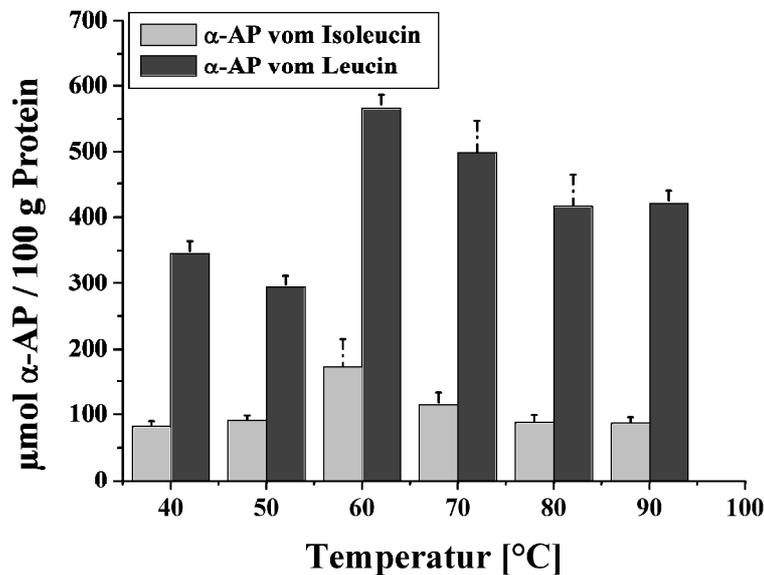
Tab. 8.3 Überführungsfaktoren zur Berechnung der Amadori-Produkte als Lactulosylderivate.

Verbindung	ÜF
Furosin	2,0
$\alpha$ -Furoylmethylalanin	4,0
$\alpha$ -Furoylmethyllysin	9,4
$\alpha$ -Furoylmethylvalin	10,1
$\alpha$ -Furoylmethyleucin	8,2
$\alpha$ -Furoylmethylisoleucin	9,7

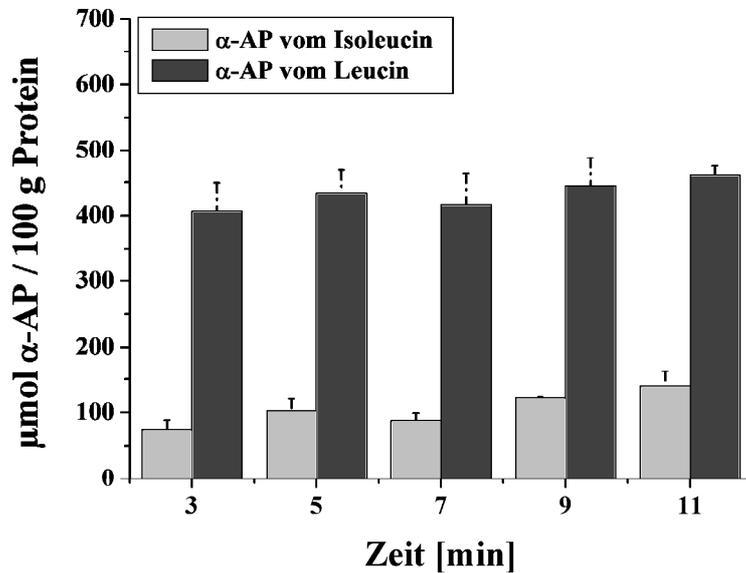
## Einfluss der Temperatur auf die Entstehung von $\alpha$ -AP

Die für diese Untersuchungen herangezogenen Modell-Schmelzkäse wurden im Labormaßstab anhand einer standardisierten Rezeptur (Käserohware 61%, Caseinat / MMP 8,6%, Butter 12,8%, Sonstiges 17,5% (Wasser, Schmelzsalze, Salz)) mittels eines handelsüblichen Thermomixers hergestellt. Die Prozessparameter wurden dahingehend modifiziert, dass zum einen unterschiedliche Temperaturen (50°C bis 90°C, 7 min) sowie variierende Rührzeiten (3 bis 11 min, 80°C) Anwendung fanden. Die dazu

erhaltenen Ergebnisse sind den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 8. 1, Abb. 8. 2) zu entnehmen.



**Abb. 8. 1** Einfluss der Herstellungstemperatur auf die Gehalte an  $\alpha$ -AP in Modell-Schmelzkäsen. Dargestellt sind die bei 40 bis 90°C (Zeit 7 min) mittels eines Thermomixers hergestellten Modell-Schmelzkäse, wobei die Gehalte an AP als Lactulosylderivate berechnet wurden ( $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ).



**Abb. 8. 2** Einfluss der Herstellungszeit bei konstanter Temperatur (80°C) auf die Gehalte an  $\alpha$ -AP in Modell-Schmelzkäsen. Dargestellt sind die 3 bis maximal 11 min bei 80°C mittels eines Thermomixers hergestellten Modell-Schmelzkäse, wobei die Gehalte an AP als Lactulosylderivate berechnet wurden ( $\mu\text{mol} / 100 \text{ g Protein}$ ).

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Thomas Henle, Professur für Lebensmittelchemie an der TU Dresden, möchte ich neben der Möglichkeit zur Bearbeitung einer so interessanten und anspruchsvollen Themenstellung für die stetige Unterstützung aller meiner Vorhaben, die konstruktiven Diskussionen sowie die hilfsbereite und freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Prof. Dr. Hans Meisel, Institutsleiter der Abteilung Sicherheit und Qualität bei Fisch und Milch des Max Rubener Institutes in Kiel, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Hochland Deutschland GmbH danke ich für die finanzielle und materielle Unterstützung während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang an Herrn Dr. Wolfgang Jung sowie Herrn Otto Specht.

Diese Gelegenheit möchte ich auch nutzen Frau Karla Schlosser für Ihre großen Bemühungen und die Durchführung unzähliger Probenserien am Aminosäurekatalysator zu danken. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Schwarzenbolz für die massenspektrometrischen Analysen und Frau Ellen Kern für die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten danke ich Frau Jessica Malinowski, Frau Simona Necula und Frau Katja Zerge.

Allen Mitarbeitern der Lebensmittelchemie möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken. Aufmunternde Worte, ein freundliches Lächeln und die ein oder andere Kaffeepause haben so manche frustrierende Tage erhellt.

Für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit danke ich Anke B., Anne W. und Kathrin.

Ganz besonders danke ich natürlich all mein Freunden sowie meinen Eltern und meinem Bruder, die für mich während des Studiums und der Anfertigung der Dissertation jederzeit ein offenes Ohr und moralische Unterstützung aufbrachten.

Michael, dir danke ich für das entgegengebrachte Verständnis und die Geduld sowie dafür, dass du mich stets bestärkt hast, wenn ich an mir gezweifelt habe.

## **VERSICHERUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Henle im Zeitraum von Februar 2007 bis September 2011 angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20.03.2000 in der geänderten Fassung vom 23.02.2011 erkenne ich in allen Teilen an. Weiterhin versichere ich, dass bisher kein erfolgloses, früheres Promotionsverfahren stattgefunden hat.

Dresden, 30.11.2011