

Michael Schmidt

Ein Beitrag zur Quantifizierung
individueller Milcheiweiß-Fractionen
in Milch und Milchprodukten



Herbert Utz Verlag · Wissenschaft
München

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugleich: Dissertation, München, Techn. Univ., 2003

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben – auch bei nur auszugsweiser Verwendung – vorbehalten.

Copyright © Herbert Utz Verlag GmbH 2003

ISBN 3-8316-0240-9

Printed in Germany

Herbert Utz Verlag GmbH, München

Tel.: 089/277791-00 – Fax: 089/277791-01

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
I.1	Problemstellung	1
I.2	Lösungsansatz	3
II	THEORIE	7
II.1	Milch und Milchprodukte	7
II.1.1	Produktion, Handel und Konsum	7
II.1.2	Milchweiß	12
II.1.2.1	Casein	14
II.1.2.2	Molkenprotein	15
II.2	Veränderung des Eiweiß-Gehaltes	16
II.3	Rechtliche Aspekte	19
II.4	Methoden zur Bestimmung des Casein-Molkenprotein-Verhältnisses	21
II.4.1	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	21
II.4.2	Derivativspektroskopie	23
II.4.3	Immunchemische Analyseverfahren	24
II.4.4	Elektrophoretische Methoden	25
II.4.5	Casein-Phosphor-Methode	27
II.4.6	Cystinwert-Methoden	27
II.5	Probleme der herkömmlichen Methoden	29
III	THEORIE ZUR CHEMOMETRIE / MATHEMATISCHE BERECHNUNGEN	33
III.1	Allgemeines	33
III.2	Chemometrie	36
III.3	Eigenvektor-Methoden	38
III.3.1	Hauptkomponenten-Regression (PCR) und Hauptkomponenten-Analyse (PCA)	40
III.3.2	PLS-Verfahren (Partial-Least-Squares)	45
III.3.3	Bestimmung der Faktoren-Zahl für ein Modell	48
III.3.4	Ausreißer-Test (Outlier Detection)	53
III.3.5	Aufbau des Training-Set	53
IV	EXPERIMENTELLER TEIL	58
IV.1	Proben	58
IV.2	Methoden	60
IV.2.1	Hydrolyse	60
IV.2.2	Aminosäure-Analyse mit HPLC	61
IV.2.3	Protein-Bestimmung	63
IV.2.4	Bestimmung der Trockenmasse	64
IV.2.5	Fett-Bestimmung	65
IV.2.6	Lactose-Bestimmung	66
IV.2.7	Bestimmung des Molkenprotein-Anteils (mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	66
IV.2.8	Bestimmung des Molkenprotein-Anteils (mittels Kapillar-Elektrophorese)	66
IV.2.9	Pyrolyse-Massenspektrometrie	67
IV.3	Chemikalienliste	70
V	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	72
V.1	Analytische Untersuchungen	72
V.1.1	Allgemeines	72
V.1.2	Aminosäure-Analytik	73
V.1.2.1	Hydrolyse	74
V.1.2.2	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	76
V.1.3	Protein-Bestimmung	79

V.1.4	Weitere Proben-Parameter	80
V.1.5	Spezielle Methoden zur Molkenprotein-Bestimmung	81
V.1.5.1	Elektrophoretische Methoden	81
V.1.5.2	Pyrolyse-Massenspektrometrie	83
V.2	Chemometrische Berechnungen	91
V.2.1	Validierung des Lösungsansatzes (Ansätze A - D)	91
V.2.1.1	Ansatz A	93
V.2.1.2	Ansatz B	96
V.2.1.3	Ansatz C	100
V.2.1.4	Ansatz D	102
V.2.1.5	Zusammenfassung	104
V.2.2	Verifikation und Optimierung des Lösungsansatzes	106
V.2.2.1	Modell-Rechnungen (Modelle 1-22)	106
V.2.2.1.1	Vergleich sämtlicher Modelle	108
V.2.2.1.2	Auswahl der besten fünf Modelle	116
V.2.2.1.3	Ermittlung des optimalen Modells	125
V.2.3	Ergebnisse der Berechnungen mit Modell 22	134
V.2.3.1	Ergebnisse der einzelnen Probengruppen	135
V.2.3.2	Vergleich mit elektrophoretischen Methoden	149
V.3	Allgemeine Diskussionspunkte	154
V.3.1	Wichtige Beobachtungen	154
V.3.2	Anmerkungen zu den Berechnungen mit GRAMS	156
V.3.3	Probleme bei den Berechnungen	158
V.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	160
VI	ZUSAMMENFASSUNG	166
VII	LITERATUR	168
VIII	ANHANG	183

I Einleitung

I.1 Problemstellung

Milch ist eines der wichtigsten Nahrungsmittel in der menschlichen Ernährung. Ihre Bedeutung liegt vor allem im Vorkommen aller wachstumsrelevanter Substanzen, und dieses in einem günstigen und ausgewogenen Verhältnis.

Neben dem direkten Gebrauch wird Milch auch zur Herstellung zahlreicher Produkte verwendet. Auch Caseinate und Molkenprotein-Konzentrate (ebenso wie weitere Molkenprotein-Produkte) werden erlaubterweise zur Erzeugung einer Vielzahl von traditionellen und neuen Lebensmitteln eingesetzt, und ihre Verwendung nimmt stetig zu [1, 2, 3]. Wirtschaftlich gesehen kommt der Milch und den Milchprodukten große Bedeutung zu. Nicht zuletzt aus diesem Grund existieren zahlreiche nationale [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10] und supranationale (z.B. auf EU-Ebene) [11, 12, 13] gesetzliche Regelungen, sowie internationale Standards [14, 15, 16, 17], die den Handel und den Verkehr solcher Produkte betreffen [18, 19, 20].

Es ist in diesem Zusammenhang wichtig, dass in diversen Vorschriften für einzelne Produkte explizit ein definiertes Casein-Molkenprotein-Verhältnis vorgeschrieben wird. So darf entsprechend deutschem Recht bei Käse dieses Verhältnis nicht von dem natürlichen, in reiner Milch anzutreffenden Verhältnis abweichen [6]. Dieses liegt etwa bei einem Wert von 80 : 20. Entsprechendes ist auch für diverse Käsesorten in den Codex-Alimentarius-Standards für Milch und Milchprodukte festgeschrieben [21]. In einer EU-Richtlinie ist dagegen aufgeführt, dass der Molkenprotein-Anteil bei adaptierter Säuglingsanfangsnahrung mindestens 50 % betragen muss [22].

Auch aus zollrechtlicher Sicht ist es von Bedeutung, zwischen Lebensmitteln, die unterschiedliche Mengen an Milcheiweiß enthalten, unterscheiden zu können. Beispielsweise darf zur Intervention freigegebenes Magermilchpulver, entsprechend den EG-Verordnungen 1725/79 [23] und 2188/81 [24], nur aus Magermilch hergestellt sein. Die Anwesenheit von Molkenbestandteilen ist nicht erlaubt [25]. Aufgrund der derzeitigen Preisunterschiede zwischen den einzelnen Milchbestandteilen erscheinen Verfälschungen hier jedoch finanziell attraktiv zu sein.

Gegenwärtig wird auch eine recht kontroverse Diskussion über die Standardisierung des Protein-Gehaltes von Konsummilch geführt. Diese ist in der Europäischen Union bis auf wenige Ausnahmen nicht erlaubt. Da aber der Milcheiweiß-Gehalt von Kuhmilch saisonal schwankt und der Preis direkt von diesem abhängt, ist es auch hier aus wirtschaftlicher Sicht interessant, Milch mit einem geringen Eiweiß-Anteil durch den Zusatz von Molkenprotein „aufzubessern“.

Um die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben überwachen zu können, ist die Verfügbarkeit geeigneter Analysemethoden von entscheidender Bedeutung. Zur Bestimmung des Molkenprotein-Anteils verschiedener Produkte existieren zwar eine ganze Reihe an Methoden¹, aber sie scheinen nicht ausreichend genau zu sein. So finden sich dann auch in der Literatur an vielen Stellen Hinweise darauf, dass für die quantitative Bestimmung des Molkenprotein-Anteils in milcheiweißhaltigen Produkten bisher noch keine befriedigende Lösung gefunden wurde, bzw. dass nach einer solchen intensiv gesucht wird [26, 27, 28, 29, 30]. Mit dieser Problematik beschäftigt sich auch eine Arbeitsgruppe des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes [31].

Ungeachtet aller ökonomischer Interessen darf aber nicht übersehen werden, dass Molkenprotein ein sehr hochwertiges Eiweiß [32, 33] darstellt, und somit auch qualitativ zur Verbesserung eines Lebensmittels beiträgt. Daher ist es auch aus anderen Gründen wichtig, die genaue Zusammensetzung von Lebensmitteln (hinsichtlich des Molkenprotein-Anteils) zu kennen. Beispiele hierfür sind ernährungsphysiologische Aspekte und Fragen der Produktdeklaration, die ihrerseits dem Verbraucherschutz und der Verbraucher-Information dienen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine verlässliche Methode zur quantitativen Bestimmung des Molkenprotein-Zusatzes zu Milch und Milchprodukten zu erarbeiten. Diese Methode sollte eine Alternative zu den konventionellen Methoden darstellen, deren Einsatz häufig an Problemen wie der Protein-Denaturierung oder Matrixeffekten scheitert [34, 35, 36, 37, 38].

¹ Gängige Verfahren zur Bestimmung des Molkenprotein-Anteils sind Cystinwert-Methoden, die Casein-Phosphor-Methode, diverse elektrophoretische Verfahren und auch die Hochleistungs-Flüssigchromatographie.

I.2 Lösungsansatz

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz beruht auf der Überlegung, die matrix- und produktionsabhängigen Probleme der konventionellen Methoden zu umgehen, indem die Analytik der individuellen Proteinfractionen auf die Analytik ihrer Aminosäure-Bausteine, die sich während der Verarbeitung praktisch nicht verändern, zurückgeführt wird. Die Aminosäure-Zusammensetzung einer komplexen Eiweiß-Mischung ergibt sich immer aus der Summe der Aminosäuren der enthaltenen Einzelfractionen (vgl. Abb. 2). Ist die Zusammensetzung der verschiedenen Einzelfractionen bekannt, so sollte es mathematisch möglich sein, den jeweiligen Anteil einer einzelnen Fraction an der gesamten Mischung zu bestimmen. Anders ausgedrückt heißt das, es sollte mit Hilfe multivariater Statistik-Methoden ein fraktionsspezifisches Aminosäure-Spektrum innerhalb eines Aminosäure-Gesamtspektrums erkannt und quantifiziert werden (vgl. Abb. 3).

Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung eines derartigen Ansatzes sind Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung der einzelnen Protein-fractionen. Dies ist im Falle von Caseinen und Molkenproteinen gegeben, wie Abb. 1 verdeutlicht.

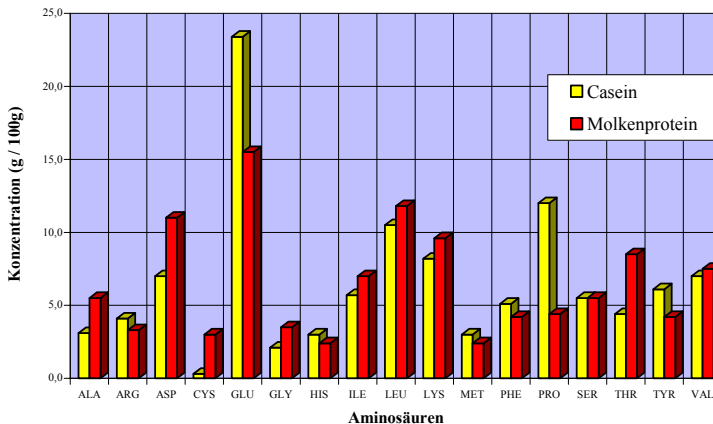
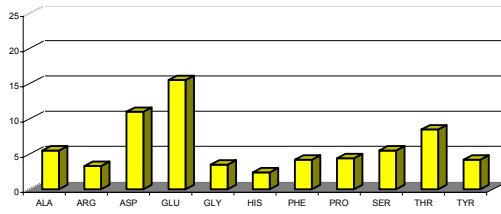
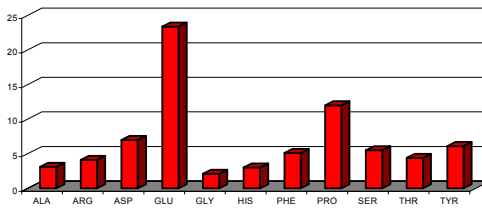


Abbildung 1. Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung von Casein und Molkenprotein [39]

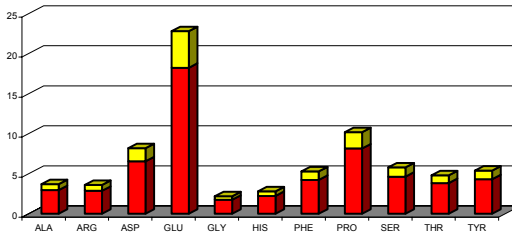


Aminosäure-Zusammensetzung von reinem Molkenprotein

+

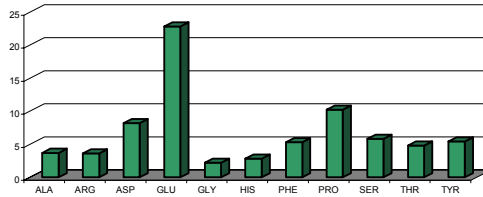


Aminosäure-Zusammensetzung von reinem Casein



Aminosäure-Zusammensetzung von Milch (bestehend aus 20 % Molkenprotein und 80 % Casein)

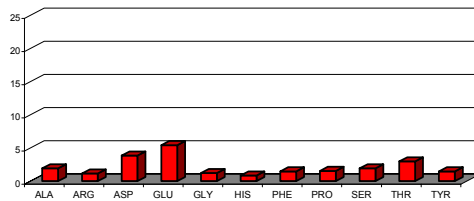
Abbildung 2. Durch Addition entsprechender prozentualer Anteile der Einzel-Spektren von Molkenprotein und Casein entsteht das Gesamt-Aminosäure-Spektrum von Milch (im Beispiel für 11 ausgewählte Aminosäuren)



Aminosäure-Spektrum einer Probe (gegeben)

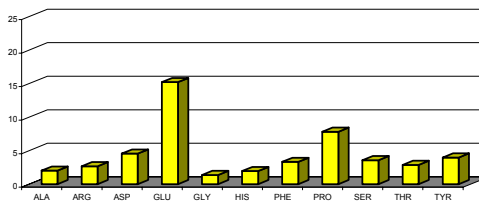


Computer



x % Molkenprotein (Im Gesamt-Spektrum enthaltenes Aminosäure-Spektrum des Molkenproteins (berechnet))

+



(100-x) % Restspektrum (im Falle, dass die Eiweiß-Fraktion der Probe aus reinem Milchprotein bestand, entspricht dies dem Casein-Anteil)

Abbildung 3. Bestimmung des Molkenprotein-Gehalts einer Probe über die Aminosäure-Zusammensetzung des Gesamtspektrums (im Beispiel für 11 ausgewählte Aminosäuren)

In der vorliegenden Arbeit sieht der analytische Ablauf dabei vor, dass zunächst die Totalhydrolyse des Untersuchungsmaterials durchgeführt wird. Anschließend soll mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) der Aminosäure-Gehalt der Hydrolysate bestimmt werden. Aus der so ermittelten Aminosäure-Zusammensetzung der gesamten Probe wird dann mit Hilfe eines Chemometrie-Rechenprogramms (GRAMS/32) der Molkenprotein-Anteil über sein Aminosäure-Spektrum berechnet.

Für einen Teil der Proben soll der Molkenprotein-Gehalt außerdem noch elektrophoretisch bestimmt werden. Die so erhaltenen Werte werden anschließend in Vergleich zu den rechnerisch ermittelten Gehalten gesetzt.

Zusätzlich werden für einige Proben noch vergleichende Untersuchungen mit einem Pyrolyse-Massenspektrometer durchgeführt, um zu sehen inwieweit sich diese Schnellmethode zur Lösung des Problems anbietet.

Zur Absicherung der entwickelten Methode wurde für die vorliegende Arbeit eine Vielzahl an Proben mit unterschiedlichen Molkenprotein-Gehalten ausgewählt und analysiert. Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, dass speziell solches Material in die Untersuchungen miteinbezogen wird, bei dem der technologische Herstellungsprozess zu einer Veränderung des natürlichen Casein-Molkenprotein-Verhältnisses geführt hat. Weiterhin sollten auch regionale und saisonale Unterschiede mit in die Untersuchungen einfließen. Deshalb wurden über das ganze Jahr verteilt Proben aus ganz Europa bezogen.

Die Probenmenge umfasste Konsummilchproben, diverse Milchprodukte (Joghurt, Quark, Frischkäse), Säuglingsmilchnahrung und Referenzmaterialien (Casein, Molkenprotein, Milchpulver mit unterschiedlichen Molkenprotein-Gehalten). Außerdem wurden noch spezielle Proben aus der Produktionsüberwachung untersucht. Hierbei handelte es sich vornehmlich um Produkte (Frischkäse, Milch- und Molkenpulver), bei denen das Casein-Molkenprotein-Verhältnis gezielt verändert worden war.