

# Projekt „Molkkäse“: Innovative Analysenverfahren für die Bestimmung von Molkenproteinen in Molkenprotein-angereichertem Käse

T. von Oesen<sup>1</sup>, M. Treblin<sup>2</sup>, L.-C. Class<sup>2</sup>, I. Clawin-Rädecker<sup>1</sup>, D. Martin<sup>1</sup>, W. Hoffmann<sup>1</sup>, K. Schrader<sup>1</sup>,  
K. Borchering<sup>3</sup>, R. Zink<sup>3</sup>, S. Rohn<sup>2</sup>, J. Fritsche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch (Max Rubner-Institut, Kiel); <sup>2</sup>Institut für Lebensmittelchemie (Universität Hamburg);  
<sup>3</sup>DMK, Deutsches Milchkontor GmbH, Bremen

## Einleitung

Nachhaltiges Wirtschaften sowie eine ressourceneffiziente Lebensmittelproduktion gewinnen immer mehr an Bedeutung. Um die Effizienz der Käseproduktion zu steigern, wird angestrebt, den Molkenproteinanteil (MPA) in gereiftem Käse z.B. durch intensivere thermische Behandlung eines definierten Anteils der Käsereimilch zu erhöhen. Im Sinne des Verbraucherschutzes ergibt sich daraus eine erforderliche Kennzeichnung dieser Produkte, insbesondere zur Differenzierung von traditionellen Herstellungsverfahren. Bislang existiert keine validierte analytische Methode zur Bestimmung des Molkenproteinanteils in gereiftem Käse.

## Ziele

- Identifizierung von Peptidmarkern (Biomarkern) zur Quantifizierung des MPA in Schnittkäse mittels LC-MS und HPTLC unter Verwendung verschiedener Detektionsmethoden
- Physikalisch/chemische und sensorische Charakterisierung von Molkenprotein-angereichertem Schnittkäse
- Identifizierung von Biomarkern als geeignete Qualitätsparameter für Molkenprotein-angereichertem Schnittkäse

## Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – HPLC

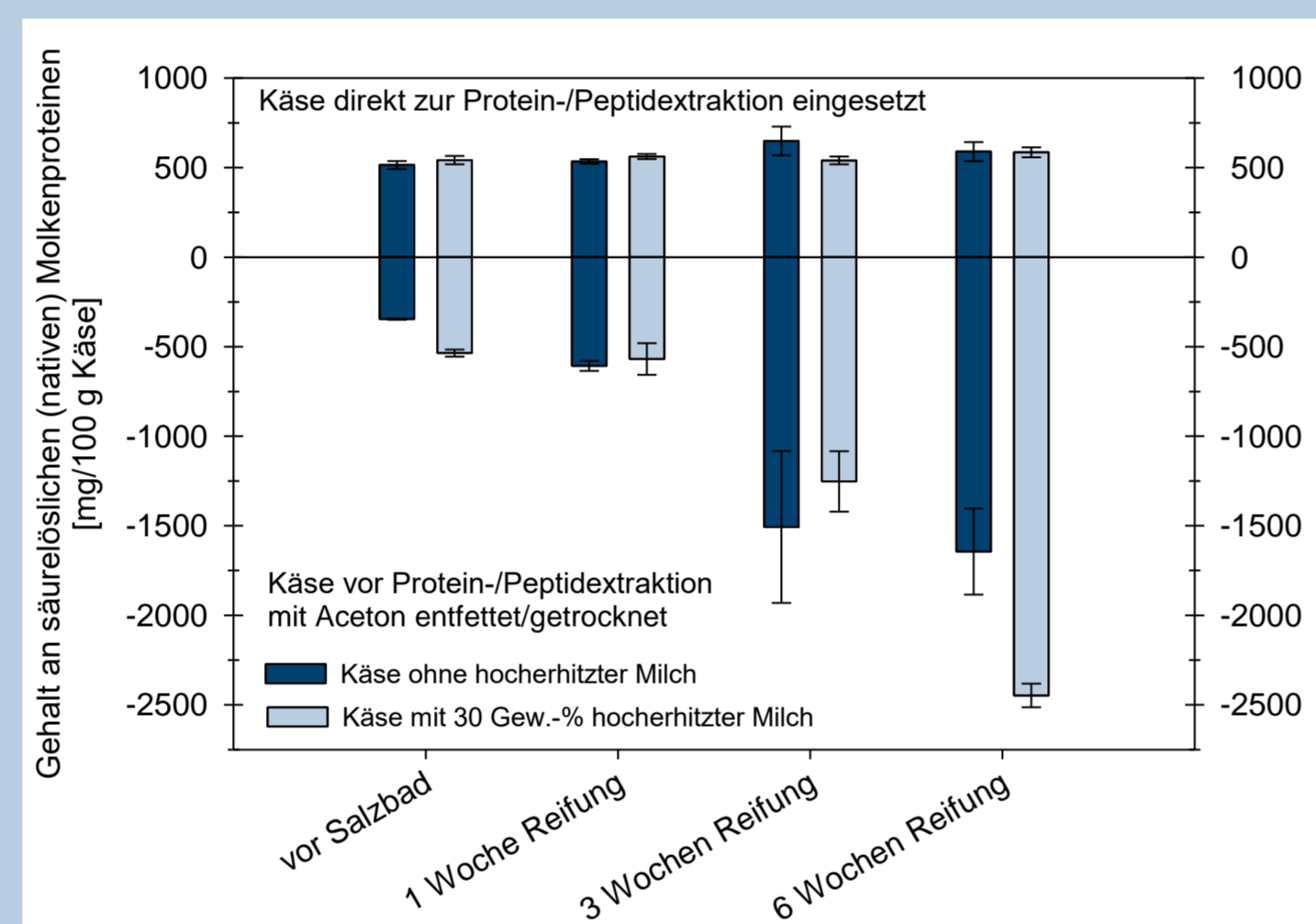
### Methoden

- Produktion von Edamer Käse mit und ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch im Technikumsmaßstab
- Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsschritte (Homogenisierung, Entfettung) für die nachfolgende Protein-/Peptidextraktion mit Phosphatpuffer (pH 6,7)
- Charakterisierung von Peptid-/Proteinprofilen im Verlauf der Käsereifung für die Identifizierung von Protein/Peptidmarkern mittels LC-MS und/oder HPLC

## Ergebnisse

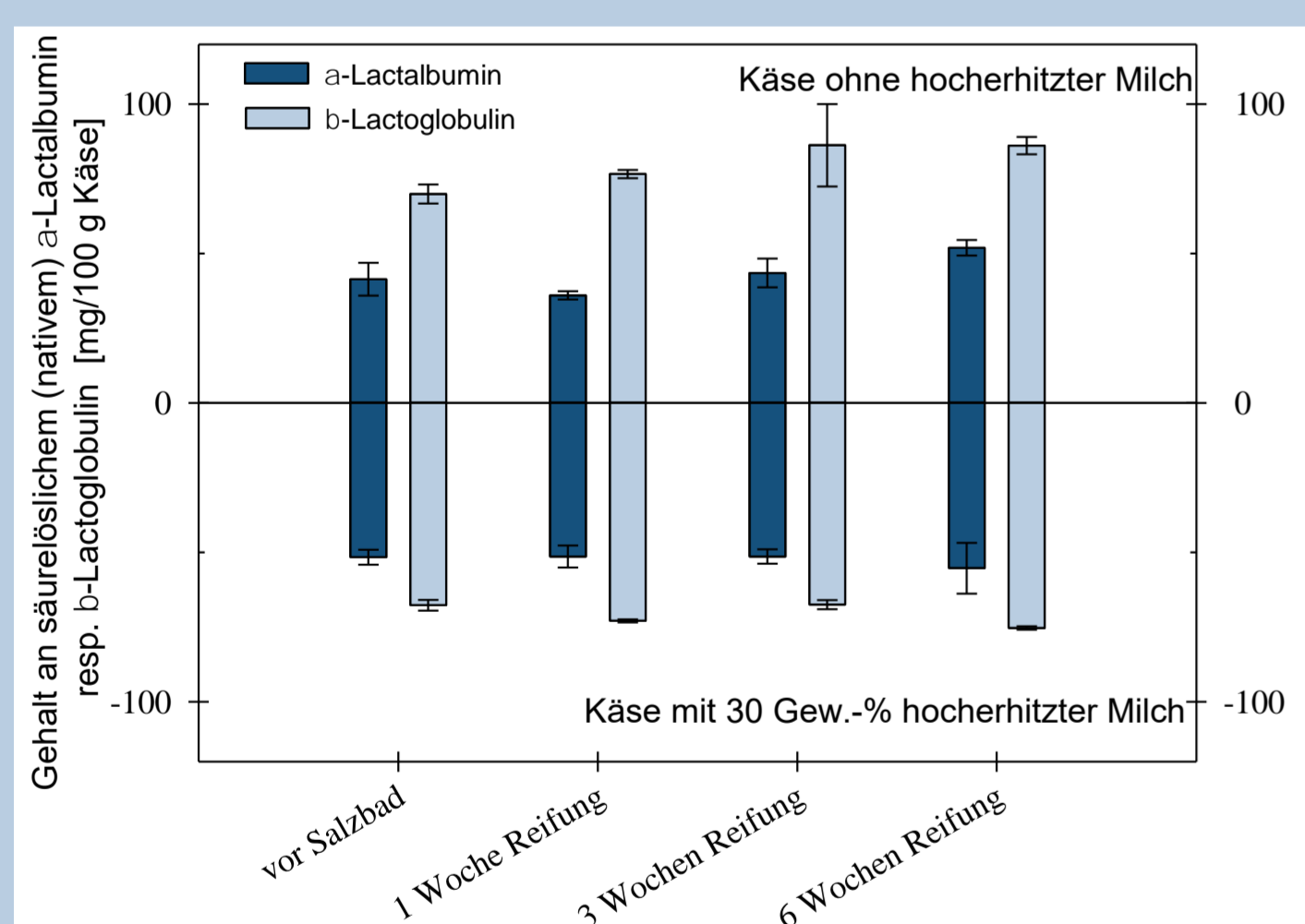
Eine Probenvorbereitung unter Verwendung von Aceton zur Entfettung und Trocknung des Käses führt zu einer scheinbaren Zunahme des Gehalts an säurelöslichen (nativen) Molkenproteinen im Verlauf der Reifung (**Abb. 1**). Die zunehmend während der Reifung gebildeten Peptide werden bei einer Behandlung mit Aceton dem Käse entzogen und führen zu einer Aufkonzentrierung der verbleibenden Proteine.

Säurelösliches (natives)  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin werden im Verlauf der Reifung nicht abgebaut (**Abb. 2**). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Käse mit und ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch erkennbar. Weitere Analysen werden zeigen, ob es ggf. Unterschiede bzgl. des Gehalts an denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin gibt.

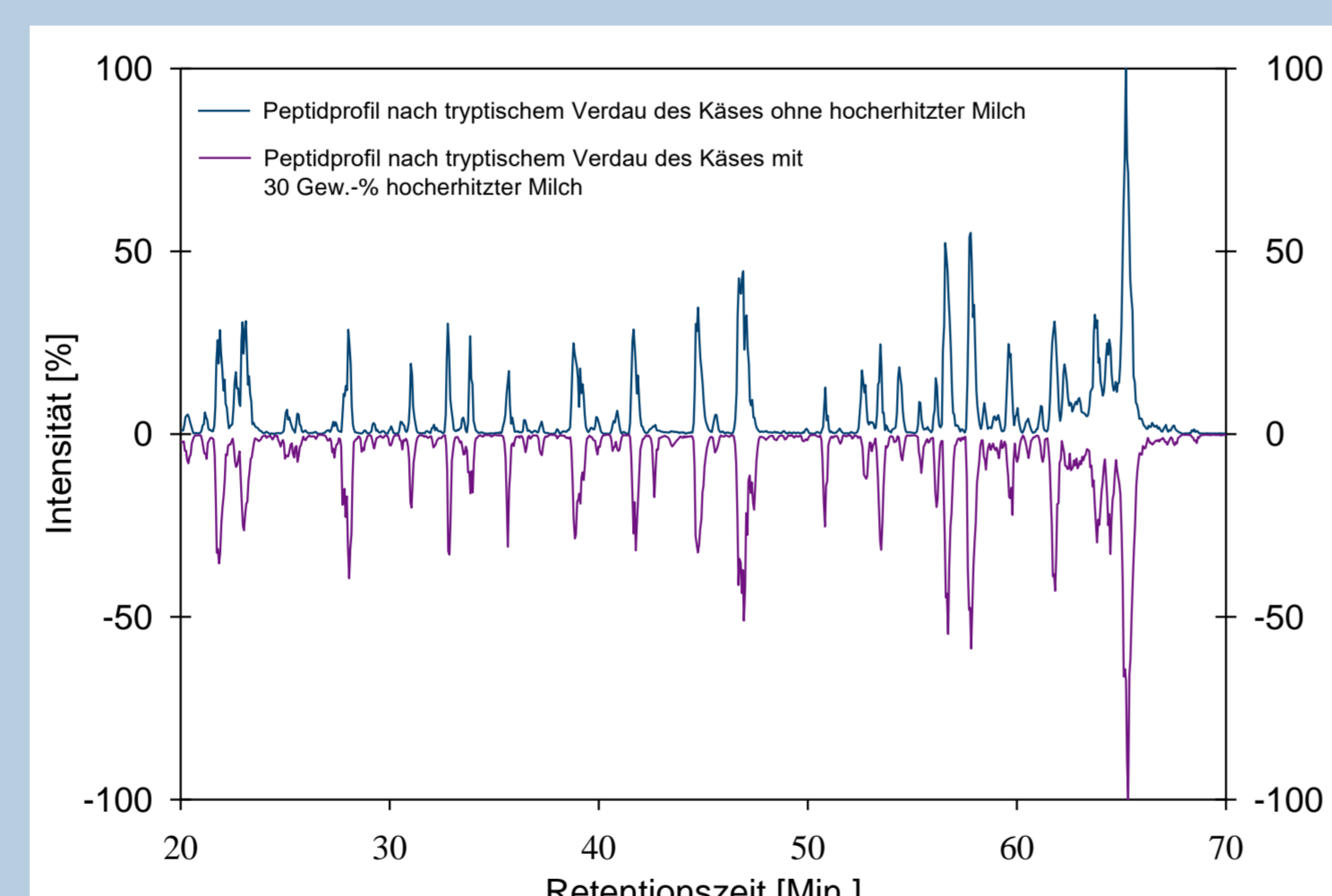


**Abb. 1:** Effekt unterschiedlicher Probenvorbereitungen auf den Gehalt an säurelöslichen (nativen) Molkenproteinen im Käse.

Die Peptidprofile des Käses mit und ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch zeigen keine Unterschiede bzgl. der im Verlauf der Reifung gebildeten Peptide (**Abb. 3**).



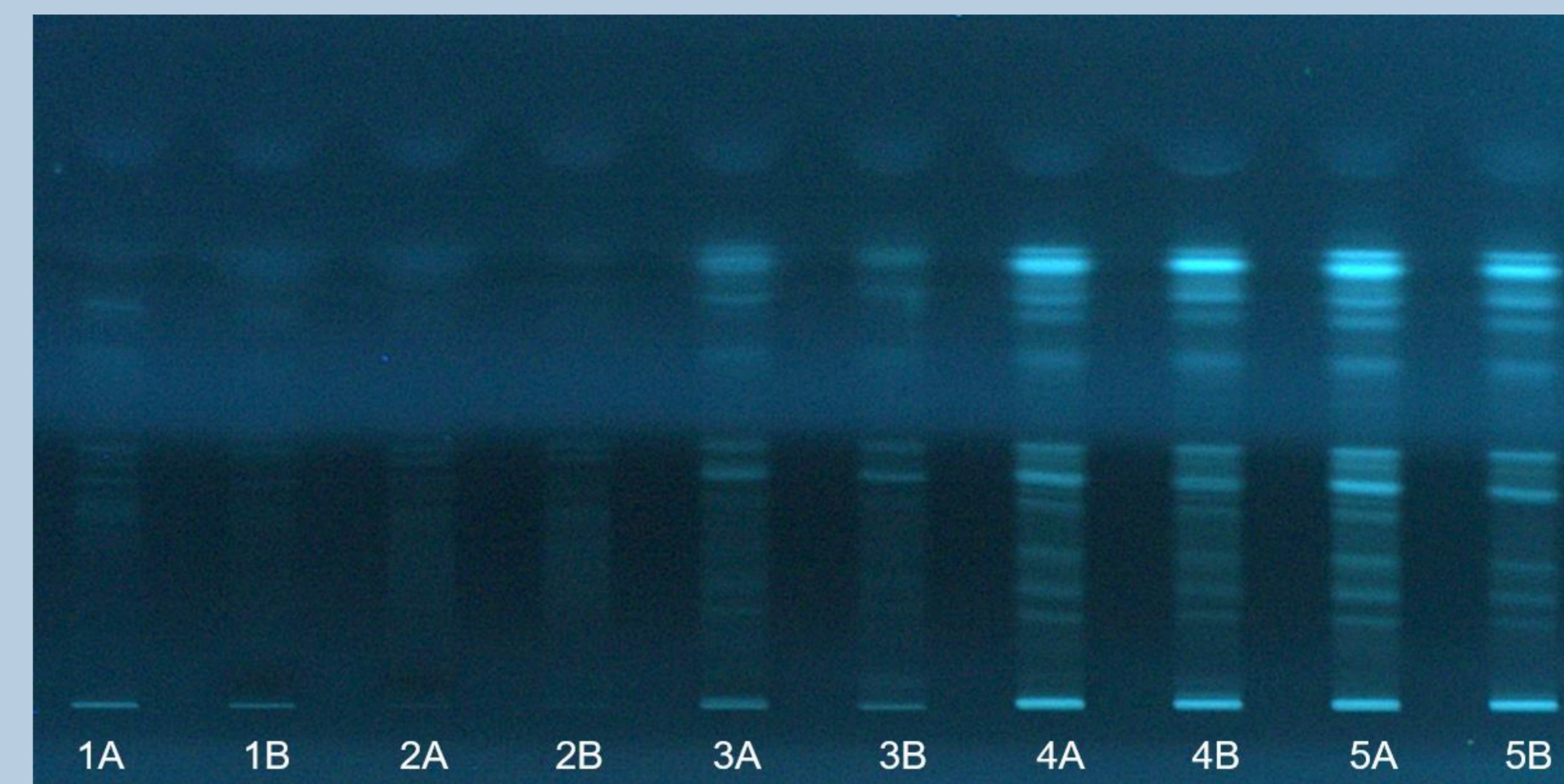
**Abb. 2:** Gehalt an säurelöslichem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im Käse mit und ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch in verschiedenen Reifestadien. Es wurde eine direkte Protein-/Peptidextraktion (ohne Entfettung o.ä.) mit Phosphatpuffer durchgeführt.



**Abb. 3:** LC-MS Chromatogramm. Peptidprofile der Käse mit und ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch nach sechs Wochen Reifungszeit.

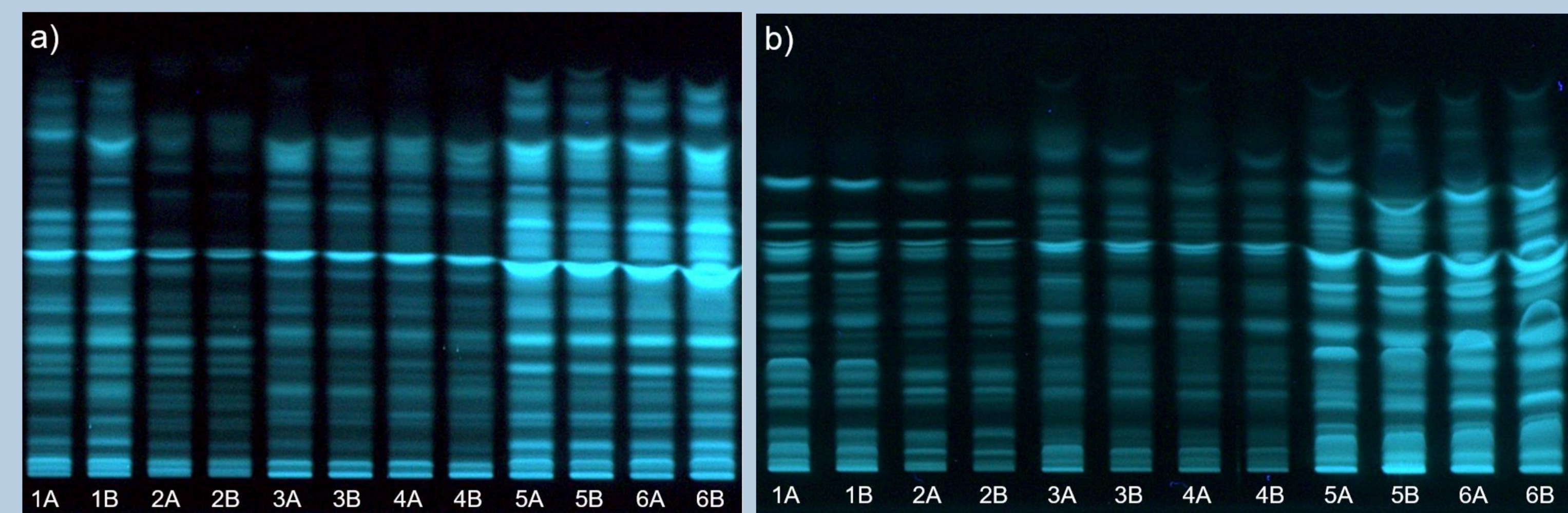
## Hochleistungsdünnschichtchromatographie – HPTLC

- Entwicklung einer Methode zur Konzentrierung und Aufreinigung von Peptiden und Proteinen mit C18 Pipettenspitzen nach Extraktion mit einer Natriumchlorid-Lösung
- Identifizierung von möglichen Peptid-Biomarkern durch Vergleich der verschiedenen Peptidmuster nach proteolytischem Abbau mit unterschiedlichen Enzymen
- Vergleich von Käseproben diverser Prozessstufen mit und ohne Anteil an hoherhitzter Milch



**Abb. 4:** Peptid- und Proteinprofile von Käseproben verschiedener Prozessstufen nach Isolation mit C18 Pipettenspitzen. A: Käse ohne hoherhitzte Milch, B: Käse mit 30 Gew.-% hoherhitzter Milch; 1: Kesselmilch, 2: Molke, 3: Käse nach dem Salzbad, 4: Käse nach drei Wochen Reifung, 5: Käse nach sechs Wochen Reifung.

- Mit zunehmender Prozessstufe steigt sowohl die Konzentration der Peptide und Proteine im Käse als auch die Anzahl der neu gebildeten Peptide (**Abb. 4**).
- Die Käseproben ohne Zugabe von hoherhitzter Milch unterscheiden sich visuell nicht vom Käse mit 30 Gew.-% hoherhitzter Milch



**Abb. 5:** Proteolytischer Abbau von Käseproben unterschiedlicher Prozessstufen. Verwendete Enzyme: 5a) Trypsin, 5b) Asp-N; A: Käse ohne hoherhitzte Milch, B: Käse mit 30 Gew.-% hoherhitzter Milch; 1: Kesselmilch, 2: Molke, 3: Käse vor dem Salzbad, 4: Käse nach dem Salzbad, 5: Käse nach drei Wochen Reifung, 6: Käse nach sechs Wochen Reifung.

- Unterschiedliche Peptidmuster aufgrund abweichender Schnittstellen der eingesetzten proteolytischen Enzyme
  - Trypsin schneidet hinter zwei Aminosäuren (R, K) (**Abb. 5a**), Asp-N nur nach D (**Abb. 5b**)
  - Asp-N generiert weniger Peptidbanden mit einem höheren Molekulargewicht (**Abb. 5b**)
- Mit zunehmender Reifung entstehen mehr Peptidbanden mit einer höheren Konzentration
- Kein visueller Unterschied zwischen den Peptidmustern der Käse mit oder ohne 30 Gew.-% hoherhitzter Milch

## Fazit

- Die Probenvorbereitung zur Protein-/Peptidextraktion sollte keine Schritte zur Entfettung oder Trocknung enthalten, da hierdurch der Gehalt an nativen Molkenproteinen beeinflusst wird; eine direkte Protein-/Peptidextraktion des Käses mit Puffer ist am geeignetsten (**Abb. 1**).
- Festphasenextraktion über Kartuschen oder C18 Pipettenspitzen stellen eine schnelle und einfache Methode zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung von Peptiden und Proteinen dar, ohne dass darüber hinaus weitere Schritte (z.B. Dialyse, Entfettung) notwendig sind.
- Säurelösliches (natives)  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin werden im Verlauf der Reifung nicht abgebaut (**Abb. 2**).
- Die Peptidprofile nach der Käsereifung (**Abb. 3**) sowie nach enzymatischem *in-vitro* Verdau (**Abb. 5**) lassen keine Unterschiede in der Käsereifung zwischen dem Käse mit und ohne definiertem Anteil an hoherhitzter Milch erkennen.
- Trypsin, Asp-N and Lys-C zeigten die vielversprechendsten Peptidprofile für die Identifizierung von Peptidmarkern sowie für die Quantifizierung des MPA. Erste Unterschiede in den minderen Peptiden konnten identifiziert werden.

## Danksagung

Wir möchten folgenden Kollegen/innen für die sorgfältige Durchführung danken:

- N. Johannsen, S. Kleiner, L. Kurch – Herstellung der Modellkäse
- K. Hansen, K. Laß, A. Thoß, C. Voß – nasschemische Analysen
- N. Bahr, F.-D. Geyik, J. von Knebel, B. Neumann, A. Schwall – technische Unterstützung und Probenvorbereitung
- Longina Reimann und Sabine Splitzer – nasschemische Analysen und Probenmanagement

Die Förderung des Vorhabens erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund des Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgt über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.