

EXTENDED SHELF LIFE (ESL)-MILCH – WERTVOLLES MILCHPRODUKT ODER MILCH MIT ÜBERMÄBIGER HITZEBELASTUNG?

Helmut K. Mayer, Bernd Raba, Johannes Meier, and Anita Schmid

Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, AG Lebensmittelchemie,
Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 11, 1190 Wien

1. EINLEITUNG

Die relative kurze Haltbarkeitsdauer von pasteurisierter Milch führte zur Entwicklung von ultra-hocherhitzter Milch, wobei diese sogenannte UHT-Milch nach **Ultra-Hoch-Temperatur-Behandlung** mindestens 3 Monate oder länger ungeöffnet bei normaler Umgebungstemperatur haltbar ist, und aus diesem Grunde in vielen Ländern bereits hohe Akzeptanz erlangt hat (z.B. Frankreich, Deutschland, Portugal, Spanien). In anderen Ländern wiederum stehen die Konsumenten dieser Haltbarmilch wegen des zum Teil sehr stark ausgeprägten Kochgeschmacks eher skeptisch gegenüber (z.B. Österreich, Griechenland, Irland, Niederlande, Großbritannien). In den letzten Jahren kann ein scheinbar unaufhaltbarer Trend in Richtung einer „neuen“ Konsummilchart festgestellt werden, die verlängerte Haltbarkeit bei gleichzeitig geringen negativen Begleiterscheinungen (wie z.B. Kochgeschmack, Vitaminverluste) bewirbt. Diese auf der Packung als „länger frisch“ bezeichnete sogenannte ESL-Milch (*Extended Shelf Life*) weist eine Haltbarkeit von mindestens 21 Tagen bei Kühlschrank-Temperaturen auf, wobei sensorisch im Vergleich zur herkömmlichen Frischmilch nahezu keine qualitativen Einbußen feststellbar sein sollen. Eine genaue Definition hinsichtlich der Bezeichnung und Haltbarkeit für den Begriff ESL-Milch gibt es aber bisher nicht [3, 4, 7].

Die gegenwärtig eingesetzten technologischen Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch sind die Mikrofiltration bzw. Tiefenfiltration, direkte Erhitzung mittels Injektions- bzw. Infusionsverfahren (z.B. 127 °C für 2-3 s), oder kostengünstigere indirekte Erhitzungsverfahren (z.B. 125 °C für 2 s). Die Hoherhitzung der Milch führt - in Abhängigkeit von der tatsächlichen Hitzebelastung der Milch – zu einem mehr oder

weniger signifikanten Verlust an organoleptischer und ernährungsphysiologischer Qualität (z.B. Kochgeschmack, Vitaminverluste, Präzipitation von Calciumphosphat, Denaturierung der hitzelablen Molkenproteine, *Maillard*-Reaktion, Verlust an essentiellen Aminosäuren wie Lysin). Zudem kommt es zu technologisch unerwünschten Ablagerungen denaturierter Proteine und Mineralstoffe an den Oberflächen der Wärmeaustauscher [4, 6, 7].

Um den tatsächlichen Einfluss des erfolgten Erhitzungsprozesses quantifizieren zu können, wurden eine Reihe von Erhitzungsindikatoren in der Literatur beschrieben, wobei sich einige milchspezifische Komponenten besonders als potentielle Erhitzungsindikatoren zur Abschätzung der wahren Hitzebelastung von erhitzter Milch anbieten (z.B. die Enzyme *Alkalische Phosphatase* und *Lactoperoxidase*, das Molkenprotein β -Lactoglobulin, Hydroxymethylfurfural (HMF), Lactulose, Furosin). Typ I-Reaktionen umfassen die Denaturierung, Degradation und Inaktivierung von hitzelablen Komponenten (hauptsächlich die Molkenproteine, milcheigene Enzyme und Vitamine) – diese Indikatoren sind bestens für die Bewertung einer eher geringeren Temperaturbehandlung bzw. Hitzebelastung geeignet, während Typ II-Reaktionen die Neubildung von Substanzen beinhalten, welche in nicht-erhitzter Milch (fast) nicht vorkommen (z.B. Lactulose, HMF, Furosin) – diese Indikatoren sind besser für die Abschätzung einer stärkeren Hitzebelastung geeignet [1, 2].

Ziel dieser Studie war es, die elektrophoretische Analyse von säurelöslichem β -Lactoglobulin als schnelles Screening-Verfahren einzusetzen und kostengünstige chromatographische Methoden für die Bestimmung von Furosin und säurelöslichem β -Lactoglobulin zu etablieren, um die tatsächliche Hitzebelastung von ESL-Milchproben am österreichischen Markt zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Milchproben

Konsummilch-Handelsproben ($n = 128$) unterschiedlicher Erhitzungsklassen von verschiedenen Molkereien wurden in österreichischen Märkten eingekauft. Proben von Rohmilch ($n = 7$), pasteurisierter Milch ($n = 33$), ESL-Milch mit der Bezeichnung „länger frisch“ ($n = 71$), und UHT-Milch ($n = 17$) wurden aliquotiert und für die nachfolgenden elektrophoretischen und chromatographischen Analysen tiefgefroren.

2.2. RP-HPLC von säurelöslichem β -Lactoglobulin

Die quantitative Bestimmung des säurelöslichen β -Lactoglobulins in flüssigen Milchproben wurde mittels *Reversed-phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) entsprechend dem FIL/IDF-Standard 178 (2005) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Caseine und denaturierte Molkenproteine wurden nach Zugabe von 2M HCL bei pH 4,6 präzipitiert. Die saure Molke mit den säurelöslichen Molkenproteinen wurde durch Zentrifugation abgetrennt und mit Natriumphosphat-Puffer verdünnt.

Die RP-HPLC wurde mittels Chromatographie-System von Waters (Milford, MA, USA) durchgeführt: Model 600E (Multisolvant delivery system), Rheodyne 7725i Injektor, Vorsäule (Sentry Guard, Symmetry™ C₁₈, 3.5 μ m, 2.1 x 10 mm) und eine Waters Symmetry™ 300 C₁₈-Säule (3.5 μ m, 2.1 x 150 mm). Die Detektion erfolgte bei 205 nm mittels UV/VIS Detektor (Waters 2489), die Steuerung und Auswertung erfolgte mittels Waters Millennium³² Chromatography manager [5].

2.3. RP-HPLC von Furosin

Die Probenvorbereitung inklusive saurer Hydrolyse und Aufreinigung der Hydrolysate mittels Festphasenextraktion (Waters Sep-Pak® Vac 3 cc, 500 mg, C₁₈ cartridge) vor der chromatographischen Trennung wurde nach FIL/IDF-Standard 193 (2004) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Zur chromatographischen Trennung des Furosins [ϵ -N-(2-Furoylmethyl)-L-lysin] wurde allerdings nicht die im FIL/IDF-Standard vorgeschlagene Säule (specific "Furosine dedicated" RP-HPLC C₈ column) verwendet, sondern dieselbe Säule (Waters Symmetry™ 300 C₁₈ column) wie für die Analyse des β -Lactoglobulins. Der für die Berechnung des Furosingehaltes (mg/100g Protein) erforderliche Proteingehalt der Milchproben wurde mittels *Kjeldahl*-Methode bestimmt [5].

2.4. SDS-PAGE von Milchproteinen

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) wurde zur Analyse der Gesamtproteinfraktion sowie auch der säurelöslichen Molkenprotein-Fraktion eingesetzt. Milchproben bzw. saure Molken (nach isoelektrischer Präzipitation

des Caseine und denaturierten Molkenproteine!) wurden direkt in Probenpuffer verdünnt, mit Dithiothreitol (DTT) vermischt und im Thermoblock erhitzt (10 min bei 100 °C). Nach dem Rückkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut DTT-Lösung als Reduktionsmittel zugegeben, und anschließend die Proteine mittels SDS-PAGE (15% T) aufgetrennt [5].

2.5. Alkalische PAGE von Molkenproteinen

Die alkalische PAGE wurde zur elektrophoretischen Trennung der säurelöslichen Molkenproteine eingesetzt. Saure Molken wurden direkt mit Probenpuffer verdünnt, mit Bromphenolblau-Lösung vermischt und in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur SE 600 (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) mittels Nativer PAGE (12.5% T) aufgetrennt [5].

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Elektrophorese von Milchproteinen

In dieser Studie wurde die Elektrophorese der Milchproteine als schnelles und zuverlässiges Screening-Verfahren zur Abschätzung der Hitzebelastung von Trinkmilch sowie zur Unterscheidung unterschiedlicher Erhitzungsklassen von Konsummilch eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung der Gesamtmilchprotein-Fraktion mittels SDS-PAGE wurde lediglich zur Bestätigung eines einheitlichen Bandenmusters aller untersuchten ESL-Milchproben durchgeführt. Nach Kochen der Proben mit SDS und DTT zeigen alle Milchproben – unabhängig von der Hitzebelastung während der Produktion in der Molkerei – das gleiche Bandenmuster (intensive Caseine, starkes β -Lg und etwas schwächeres α -La) (Abb. 1a). Demgegenüber zeigen aber die untersuchten ESL-Milchproben nach Auftrennung ihrer säurelöslichen Molkenproteine mittels alkalischer PAGE vollkommen unterschiedliche Bandenmuster. Da das im Zuge der Probenvorbereitung präzipitierte Casein (inklusive den hitzedenaturierten Molkenproteinen!) durch Zentrifugation abgetrennt worden war, können in den sauren Molken lediglich die bei pH 4,6 säurelöslichen (d.h. nicht hitze-denaturierten) Molkenproteine nachgewiesen werden (Abb. 1b). Es ist offenkundig, dass die Bandenintensität der säurelöslichen Molkenproteine mit zunehmender Hitzebelastung der untersuchten Trinkmilchproben abnimmt, wobei die Hitzestabilität der

Molkenproteine wie folgt abnimmt: α -La > β -Lg > BSA > Immunoglobuline. Daher nehmen einzelne Molkenproteinfraktionen in Abhängigkeit von ihrer individuellen Hitzestabilität als Folge von Erhitzungsprozessen im Zuge der Produktion von Trinkmilch ab, und können somit als Indikatoren für die tatsächliche Hitzebelastung von Handelsmilchproben verwendet werden. Unter Berücksichtigung der zuletzt extrem gestiegenen Kosten des für die HPLC-Analyse von β -Lactoglobulin und Furosin erforderlichen Acetonitrils, erweist sich die Elektrophorese als rasches, kostengünstiges und verlässliches Screening-Verfahren zur Unterscheidung zwischen niedrig-erhitzten und hoch-erhitzten ESL-Milchproben.

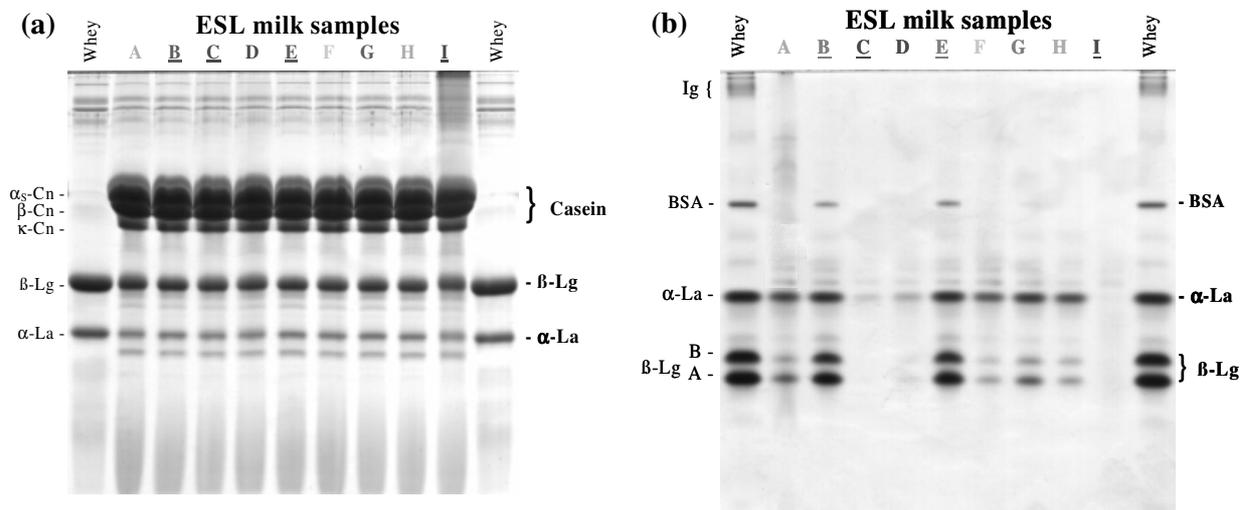


Abb. 1: SDS-PAGE der Gesamtmilchprotein-Fraktion (a), und Alkalische PAGE der bei pH 4,6 säurelöslichen Molkenprotein-Fraktion (b) verschiedener ESL-Milchproben aus Österreich.

3.2. RP-HPLC von säurelöslichem β -Lactoglobulin in Milchproben

Der offensichtliche Unterschied zwischen ESL-Milchproben „guter“ bzw. „schlechter“ Qualität (d.h. ESL-Milchproben mit geringer bzw. hoher Hitzebelastung!) wird in Abb. 2 gezeigt. Pasteurisierte Milch weist selbstverständlich nur eine geringe Hitzebelastung auf und hat einen hohen Gehalt (> 3000 mg/L) an säurelöslichem β -Lactoglobulin (Abb. 2a). Interessanterweise zeigten die im Rahmen dieser Studie untersuchten ESL-Milchproben von verschiedenen Herstellern erstaunlich große Unterschiede hinsichtlich ihrer tatsächlichen Hitzebelastung und somit dem Gehalt an

säurelöslichem β -Lg (3680 bis 140 mg/L). *Abb. 2c* zeigt das Chromatogramm der säurelöslichen Molkenproteine einer niedrig erhitzten ESL-Milchprobe mit hohem β -Lg-Gehalt (2792 mg/L), während eine offenkundig übermäßig hoch erhitzte ESL-Milchprobe mit extrem niedrigem β -Lg-Gehalt (260 mg/L) in *Abb. 2d* dargestellt ist. Mehr als die Hälfte der untersuchten ESL-Milchproben hatte einen Gehalt an säurelöslichem β -Lg <1800 mg/L, was als Grenzwert für ESL-Milch in Österreich diskutiert wird. Einige ESL-Milchproben wiesen einen extrem niedrigen Anteil (212 mg/L) an nativem (d.h. nicht hitzedenaturierten) β -Lg auf, was durchaus einer stark hitzebelasteten UHT-Milch entspricht (*Abb. 2b*).

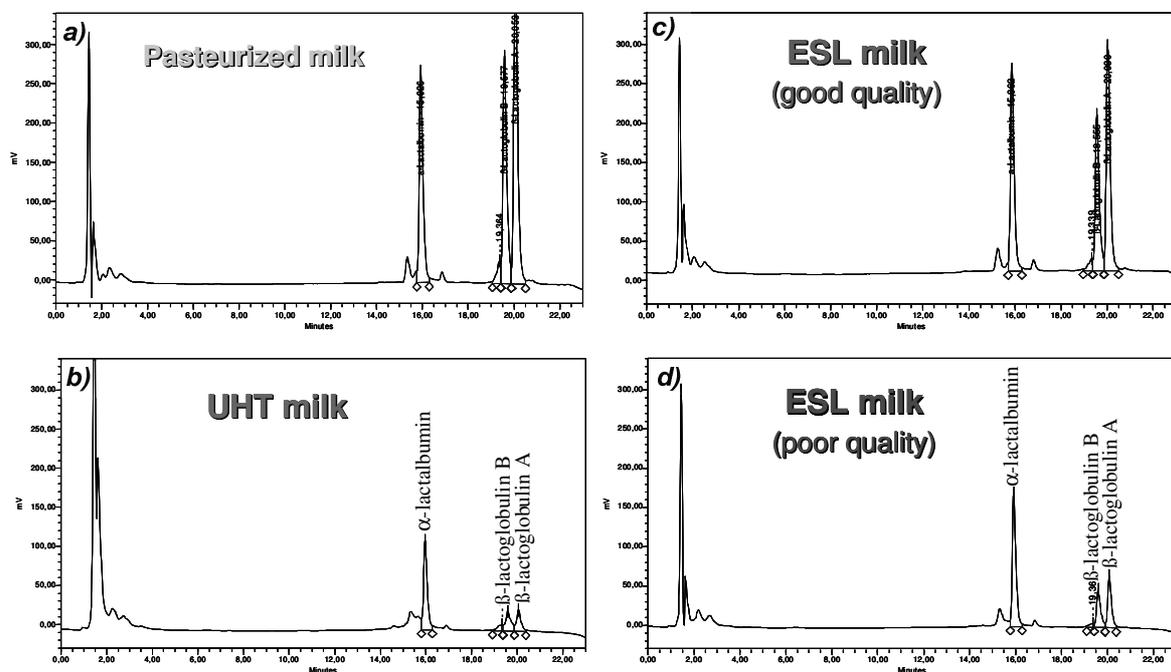


Abb. 2: RP-HPLC-Chromatogramm der säurelöslichen Molkenproteine in pasteurisierter Milch (a), UHT-Milch (b) und in ESL-Milchproben „guter“ (c) und „schlechter“ (d) Qualität (d.h. mit geringer bzw. hoher Hitzebelastung).

3.3. RP-HPLC von Furosin in Milchproben

Da im Rahmen dieser Studie Furosin sowie auch β -Lg von vielen Milchproben in alternierender Abfolge bestimmt werden sollten, wurde eine RP-HPLC-Methode für die Analyse von Furosin entwickelt, welche dieselbe HPLC-Säule wie für die Bestimmung von β -Lg verwendet, wodurch das ständige Wechseln der Säule vermieden werden konnte. Im Vergleich zur IDF-Standardmethode (22 min) konnte Furosin unter

Verwendung dieser Säule (Waters Symmetry™ 300 C₁₈ column) bereits innerhalb von 8 Minuten getrennt werden. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der β -Lg-Bestimmung konnten die extremen Unterschiede zwischen ESL-Milchproben „guter“ bzw. „schlechter“ Qualität (d.h. ESL-Milchproben mit geringer bzw. hoher Hitzebelastung) auch durch Bestimmung des Furosin-Gehaltes demonstriert werden. *Abb. 3a* zeigt das typische Chromatogramm von Furosin (11.6 mg/100g Protein) in ESL-Milch „guter“ Qualität (natives β -Lg: 2729 mg/L Milch), während in *Abb. 3b* ein Furosin-Chromatogramm (71.3 mg/100g Protein) einer ESL-Milch sehr „schlechter“ Qualität (natives β -Lg: 246 mg/L Milch) dargestellt ist.

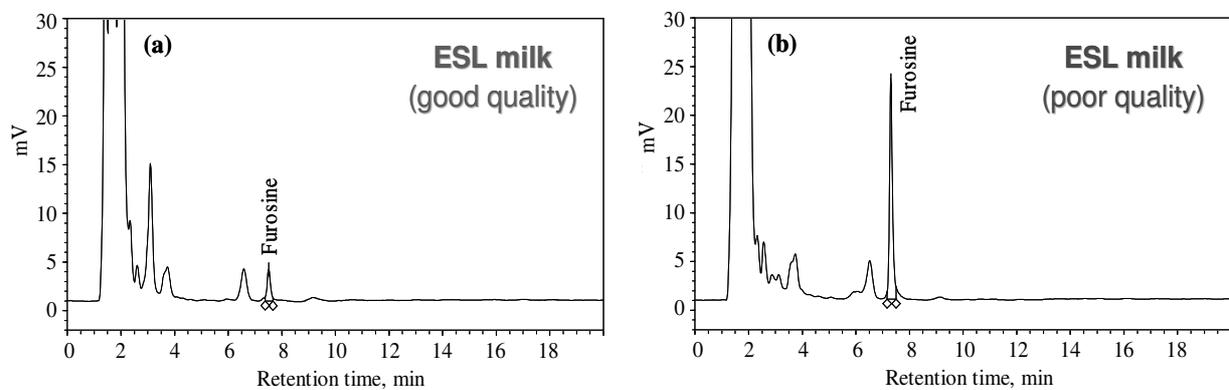


Abb. 3: RP-HPLC-Chromatogramm von Furosin in ESL-Milchproben „guter“ (a) und „schlechter“ (b) Qualität (d.h. mit geringer bzw. hoher Hitzebelastung).

3.4. Vergleich von säurelöslichem β -Lg und Furosin in ESL-Milchproben

In *Abb. 4* sind die Mittelwerte (\pm SD) für den Gehalt an säurelöslichem β -Lactoglobulin und Furosin in den untersuchten Milchproben von unterschiedlichen Erhitzungsklassen (Rohmilch, pasteurisierte Milch, ESL-Milch und UHT-Milch) zusammengefasst. Erwartungsgemäß hatten pasteurisierte Milchproben einen hohen β -Lg-Gehalt (3177 ± 288 mg/L) und niedrigen Furosin-Gehalt (9.9 ± 1.3 mg/100g Protein), während UHT-Milch in umgekehrter Weise einen sehr niedrigen β -Lg-Gehalt (226 ± 67 mg/L) und hohen Furosin-Gehalt (204 ± 124 mg/100g Protein) aufwies. Überraschenderweise mussten die ESL-Milchproben in zwei separate Gruppen geteilt werden: ESL-Milch „guter“ Qualität (45% der untersuchten Proben) zeigten einen Gehalt an säurelöslichem β -Lg > 1800 mg/L sowie einen Furosin-Gehalt < 40 mg/100g Protein, während ESL-Milchproben „schlechter“ Qualität einen sehr niedrigen Gehalt

an säurelöslichem β -Lg (< 500 mg/L) und einen hohe Furosine-Gehalt (> 40 mg/100g Protein) aufwiesen, was durchaus der Hitzebelastung einer UHT-Milch entspricht.

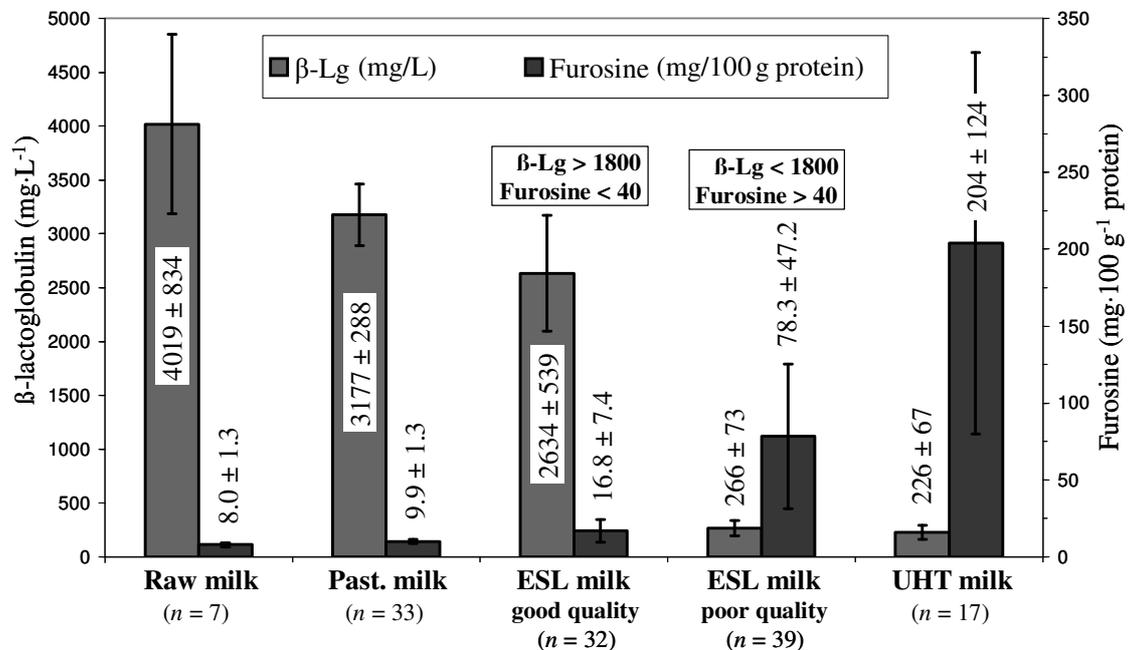


Abb. 4: Mittelwerte (\pm SD) für den Gehalt an säurelöslichem β -Lactoglobulin und Furosine in den untersuchten Milchproben von unterschiedlichen Erhitzungsklassen (Rohmilch, pasteurisierte Milch, ESL-Milch und UHT-Milch) ($n = 128$).

Abb. 5 zeigt die relative Verteilung der Gehaltswerte an säurelöslichem β -Lg und Furosine aller im Rahmen dieser Studie untersuchter ESL-Milchproben ($n = 71$). ESL-Milchproben "guter" Qualität (β -Lg > 1800 mg/L; 45%) wurden in 4 Gruppen unterteilt, wobei zusätzliche Grenzwerte von 2000, 2500 und 3000 mg/L berücksichtigt wurden. Ein unterer Grenzwert von 2000 mg/L war international für hoch-pasteurisierte Milch vorgeschlagen worden, während 1800 mg/L in Österreich und einigen anderen Ländern mangels gesetzlicher Regelungen als Grenzwert für ESL-Milch diskutiert wurde. Da lediglich 4 Proben (5%) zwischen diesen beiden vorgeschlagenen Grenzen lagen, würden durchaus beide Werte als gesetzliche Grenzwerte für die Kontrolle der Hitzebelastung von ESL-Milchproben durch die Lebensmittelbehörden geeignet sein.

Die relative Verteilung der Furosine-Gehaltswerte aller untersuchten ESL-Milchproben reflektiert die zuvor beschriebene Zweiteilung der in diese Studie inkludierten ESL-Milchproben in vergleichbarer Weise (Abb. 5). ESL-Milchproben

“guter” Qualität (Furosine < 40 mg/100g Protein; 45%) wurden wiederum in 4 Gruppen unterteilt, wobei zusätzliche Grenzwerte von 20, 15 und 12 mg/100g Protein berücksichtigt wurden. Obwohl ein Furosine-Gehalt von 20 mg/100g Protein als oberes Limit für hoch-pasteurisierte Milch diskutiert worden war, wird in dieser Studie (aufgrund des hohen Anteils an säurelöslichem β -Lg einiger betroffener Proben) ein Grenzwert von 40 mg/100g Protein vorgeschlagen. Nichtsdestotrotz würde auch ein oberes Furosine-Limit von 20 mg/100g Protein durchaus sehr gut zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie passen, da lediglich 7 ESL-Milchproben zwischen 20 und 40 mg/100g Protein lagen, wovon 5 Proben protein-angereicherte ESL-Milchproben waren, und sich lediglich 2 „normale“ Proben in diesem Bereich befanden, welche einen Furosine-Gehalt von 24.5 und 23.6 mg/100g Protein (bei gleichzeitig eher geringem β -Lg-Gehalt von 1827 and 1801 mg/L) aufwiesen.

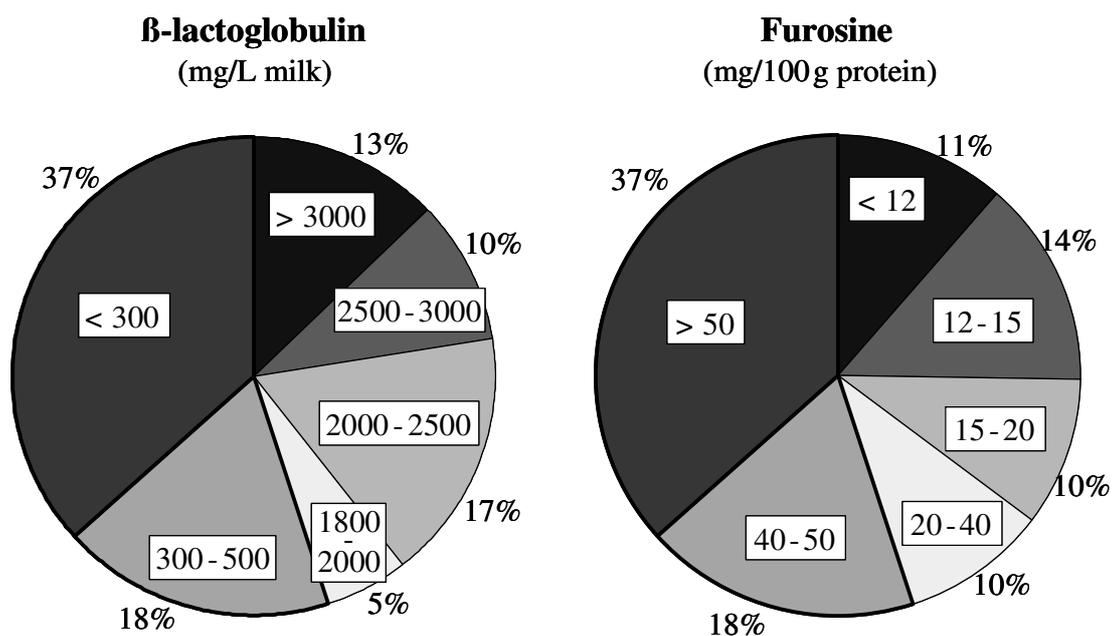


Abb. 5: Relative Verteilung der Gehaltswerte für säurelösliches β -Lactoglobulin und Furosine in ESL-Milchproben vom österreichischen Markt ($n = 71$).

Offenkundig waren ESL-Milchproben “schlechter” Qualität (d.h. ESL-Milch mit hoher Hitzebelastung) mittels indirekter UHT-Verfahren hergestellt worden, welche im Vergleich zu direkten Erhitzungsverfahren bei weitem kostengünstiger und energieeffizienter sind. Demgegenüber steht die wesentlich geringere tatsächliche

Hitzebelastung von mittels direkter Erhitzungsverfahren (Injektion bzw. Infusion) hergestellter ESL-Milch, wodurch sich diese Technologien durchaus als Alternative zu modernen Membrantrennverfahren (Mikrofiltration, Tiefenfiltration) anbieten [4, 7].

4. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Da in jüngster Zeit in Österreich sowie auch in anderen Ländern der EU ein scheinbar unaufhaltbarer Trend in Richtung ESL-Milch festgestellt werden kann, muss es zu einer gesetzlichen Regelung der sensorischen und ernährungsphysiologischen Qualität dieser „neuen“ Kategorie von Konsummilch kommen! Da den meisten Molkereien die negativen Auswirkungen einer übermäßigen Hitzebelastung von Konsummilch offenkundig nicht bewusst sind, bedarf es der Einführung verbindlicher gesetzlicher Grenzwerte für Erhitzungsindikatoren (z.B. säurelösliches β -Lactoglobulin, Furosin, Lactulose) zur Abschätzung und Kontrolle der tatsächlichen Hitzebelastung von ESL-Milch. Diese „länger frische“ Milch soll hinsichtlich sensorischer und ernährungsphysiologischer Qualität der pasteurisierten Milch vergleichbar sein, zudem aber den offenkundigen Vorteil einer verlängerten Haltbarkeit aufweisen. Keinesfalls aber darf ESL-Milch einer der UHT-Milch vergleichbaren Hitzebelastung ausgesetzt werden, um die berechtigte Konsumentenerwartung nach einem „Frisch“-Produkt mit hoher ernährungsphysiologischer Wertigkeit, zugleich aber verlängerter Haltbarkeit zu erfüllen. Die vorliegende Studie zeigte allerdings, dass – in eklatantem Widerspruch zu diesen Anforderungen – 55 % der untersuchten ESL-Milchproben einen sehr geringen Gehalt an säurelöslichem β -Lactoglobulin (< 500 mg/L) sowie einen hohen Furosin-Gehalt (> 40 mg/100g Protein) aufwiesen, was durchaus der hohen Hitzebelastung einer UHT-Milch vergleichbar ist. Aus diesem Grund besteht die dringende Notwendigkeit, gesetzliche Grenzwerte für ausgewählte Erhitzungsindikatoren in der EU einzuführen, um eine maximal zulässige Hitzebelastung von ESL-Milch zu garantieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen den diskutierten Grenzwert für den maximalen Furosin-Gehalt von 20 mg/100g Protein in ESL-Milch, wobei allerdings bei protein-angereicherten Proben ein höheres Limit von 40 mg/100g Protein akzeptiert werden muss. Insgesamt erwies sich das säurelösliche β -Lactoglobulin als der robustere Hitzeindikator für die Abschätzung der tatsächlichen Hitzebelastung von ESL-Milch, wobei der diskutierte Grenzwert von 1800 (eventuell 2000) mg/L Milch

jedenfalls als Limit für ESL-Milch empfohlen werden kann. Zudem kann die Elektrophorese der säurelöslichen Molkenproteine als rasches, kostengünstiges und verlässliches Screening-Verfahren zur Unterscheidung zwischen niedrig-erhitzten und hoch-erhitzten ESL-Milchproben eingesetzt werden, um eine hohe ernährungsphysiologische Qualität von „länger frischer“ Milch auch in Zukunft zu gewährleisten.

LITERATUR

- [1] Cattaneo S., Masotti F., Pellegrino L., Effects of overprocessing on heat damage of UHT-milk, Eur. Food Res. Technol. 226 (2008) 1099-1106.
- [2] Claeys W.L., Van Loey A.M., Hendrickx M.E., Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk, Trends Food Sci. Technol. 13 (2002) 293-311.
- [3] Dyck B., Neue Marktchancen durch ESL-Technologie, Dt. Molk. Ztg. (dmz) 20 (2004) 22-25.
- [4] Gallmann P., Eberhard P., Sieber R., Vor- und Nachteile der ESL (Extended Shelf Life)-Milch, Agrarforschung 8 (2001) 112-117.
- [5] Mayer, H.K., Raba, B., Meier, J., Schmid, A., RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble β -lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf life milk samples in Austria. Dairy Science and Technology (in press).
- [6] Rysstad G., Kolstad J., Extended shelf life milk – advances in technology, Int. J. Dairy Technol. 59 (2006) 85-96.
- [7] Schwermann S., Schwenzow U., Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Dt. Milchwirt. 59 (2008) 384-391, 428-432, 462-467.