

Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie  
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und  
Umwelt  
Technische Universität München

Hitzebedingte Veränderungen an der Caseinmicelle unter  
UHT-Bedingungen und deren Auswirkungen auf die Käsertechnologie

Dipl. LM.-Ing. Selda Bulca

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Ulrich M. Kulozik  
2. Univ.-Prof. Dr. Jörg Hinrichs  
(Universität Hohenheim)

Die Dissertation wurde am 23.04.07 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für die Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.06.07 angenommen.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung aller bedanken, die die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Ulrich Kulozik, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation eröffnete. Ihm möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit und die zahlreichen fachlichen Diskussionen danken.

Danken möchte ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Jörg Hinrichs (Fachgebiet Lebensmittel tierischer Herkunft der Universität Hohenheim) für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Korreferate sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel (Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der technischen Universität München) für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Weiterhin bedanke ich mich insbesondere bei Frau Dr.-Ing. Sabine Lauber für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und für die zahlreiche Diskussionen und Vorschläge. Ferner möchte ich meinen Diplomanden, Praktikanten und wissenschaftlichen Hilfskräften danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen für die vielfältige Unterstützung und das angenehme Arbeitsumfeld. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei dem türkischen Erziehungsministerium bzw. der türkischen Botschaft in Berlin für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Darüber hinaus gilt mein Dank dem Bayerischen Gemeindeunfallversicherungsverbands, im Besonderen Frau Tanja Kolbe, für Ihre Betreuung nach meinem Unfall.

Meiner Mutter, meiner Schwestern und meinen Brüdern danke ich herzlich für das Interesse an dieser Arbeit und ihre Unterstützung in den letzten Jahren.

Freising

Selda Bulca

Für meine Mutter

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung	2
<b>2 AKTUELLER STAND DES WISSENS</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Thermodynamische Kräfte in der Caseinmicelle</b>	<b>4</b>
2.1.1 Hydrophobe Wechselwirkungen	4
2.1.2 Elektrostatische Wechselwirkungen	5
2.1.3 Wasserstoffbrückenbindungen	6
2.1.4 Disulfid-Brückenbindungen	6
2.1.5 Kolloidales Calciumphosphat	7
<b>2.2 Unterschiedliche Modelle zur Aufklärung der Caseinstruktur</b>	<b>8</b>
2.2.1 Coat-Core Modell (Mantel-Kern)	8
2.2.2 Internal Structure (Innere Struktur)	9
2.2.3 Submicellen-Modelle	11
2.2.4 Gel-like Aggregates (Gel-ähnliche Aggregate)	15
<b>2.3 Die Interaktionen zwischen Molkenproteinen und Caseinen während der Erhitzung der Milch und Lösungswege zur Optimierung der Labgelbildungseigenschaften von UF- bzw. MF-Retentate</b>	<b>19</b>
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Hitzestabilität der Caseinlösungen</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Untersuchung der hitzebedingten Veränderungen an oder in der Caseinmicellen</b>	<b>22</b>
3.2.1 Untersuchung der Veränderungen in der Calciumverteilung	23
3.2.2 Untersuchungen mit niederenergetischem Ultraschall	24
3.2.3 Untersuchungen mit NMR ( <u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance) zur Wassermobilität	24
3.2.4 Untersuchung des Polymerisationsgrads zwischen der Caseinfraktionen	25
3.2.5 Hitzebedingte Dissoziation der Caseinfraktionen	26
3.2.6 Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität	29
3.2.7 Analyse des Serumbindevermögens	30
3.2.8 Einfluss der Ionenstärke und des Caseingehaltes auf die Labgelbildungseigenschaften erhitzter Caseinlösungen	33

<b>3.3</b>	<b>Effekt des UHT-Erhitzungsverfahrens auf die Proteolyse in Käse aus molkenproteinfreier Milch</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Der Einfluss der Molkenproteine auf die Labgelbungseigenschaften bzw. auf die Käse- und Käseerzeugnisseigenschaften der erhitzten UF- bzw. MF-Retentate</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Fazit über die Caseinmodelle</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>46</b>
	Publikationen	51
<b>6</b>	<b>APPENDIX</b>	<b>56</b>
	Lebenslauf	

## 1 EINLEITUNG UND AUFGABE

Die Hitzebehandlung ist aufgrund der technologischen und hygienischen Aspekte ein notwendiger Grundprozess bei der Herstellung von Milch und Milchprodukten. Je nach Produktart und Beschaffenheit wird die Milch bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzt. Käse wird normalerweise aus roher oder pasteurisierter Milch hergestellt. Eine Erhitzung der Käsereimilch im Ultrahochtemperaturbereich ermöglicht die Abtötung der sporenbildenden Mikroorganismen. Für z. B. *Clostridium tyrobutyricum* sind dazu jedoch Temperaturen aus dem Hoherhitzungs- oder Ultrahoherhitzungsbereich notwendig. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass für die Produktion von UHT-Käse die Käsereieignung der Milch trotz Hitzebehandlung erhalten bleiben muss. Problematisch verhalten sich dabei die Molkenproteine, die ab Temperaturen von ca. 70 °C denaturieren [Walstra und Jenness, 1984; Spreer, 1999]. Sie reagieren mit  $\kappa$ -Casein und belegen die Oberfläche der Caseinmicellen, was zu längeren Gerinnungszeiten und zu schwächeren Labgallerten bis hin zum Ausbleiben der Labgelbildung führt [Wilson und Wheelock, 1972; Dalgleish, 1990; Park et al., 1996]. Als Grenzwert für die Labgelbildung wird ein Denaturierungsgrad von etwa 60 % des  $\beta$ -Lg B angesehen, bei höheren Denaturierungsgraden bleibt die Milch trotz Labeinwirkung flüssig [Steffl, 1999]. Um den Einfluss hitzedenaturierter Molkenproteine auf die Labgelbildung auszuschließen, kann die Käsereimilch vor der Erhitzung so diafiltriert werden, dass nur die Molkenproteine, nicht aber andere niedermolekulare Substanzen wie Lactose oder Salze entzogen werden (Bild. 1.1). Dies bedeutet: Fraktionieren der Milchproteine bei gleich bleibender Caseinkonzentration, durch Ausschleusen der Molkenproteine mittels Mikrofiltration über eine Diafiltration mit Ultrafiltration (UF)-Permeat. Die erhaltenen Caseindispersionen gelten nach bisherigen Erkenntnissen als weitaus hitzestabiler als Molkenproteine und können für die Käseproduktion unter Einsatz einer UHT-Behandlung eingesetzt werden. Auf diesem Wege werden die Auswirkungen der Molkenproteindenaturierung auf die Käsereitauglichkeit der Milch ausgeschlossen. Auf der anderen Seite ist es möglich, die Milch durch eine Ultrafiltration aufzukonzentrieren und danach mittels Mikrofiltration / Diafiltration die Molkenproteine zu reduzieren. Die so gewonnenen Casein / Molkenproteinkonzentrate könnten auch nach einer UHT- Erhitzung auf ihre Labgelbildungseigenschaften untersucht werden (Bild 1.1).

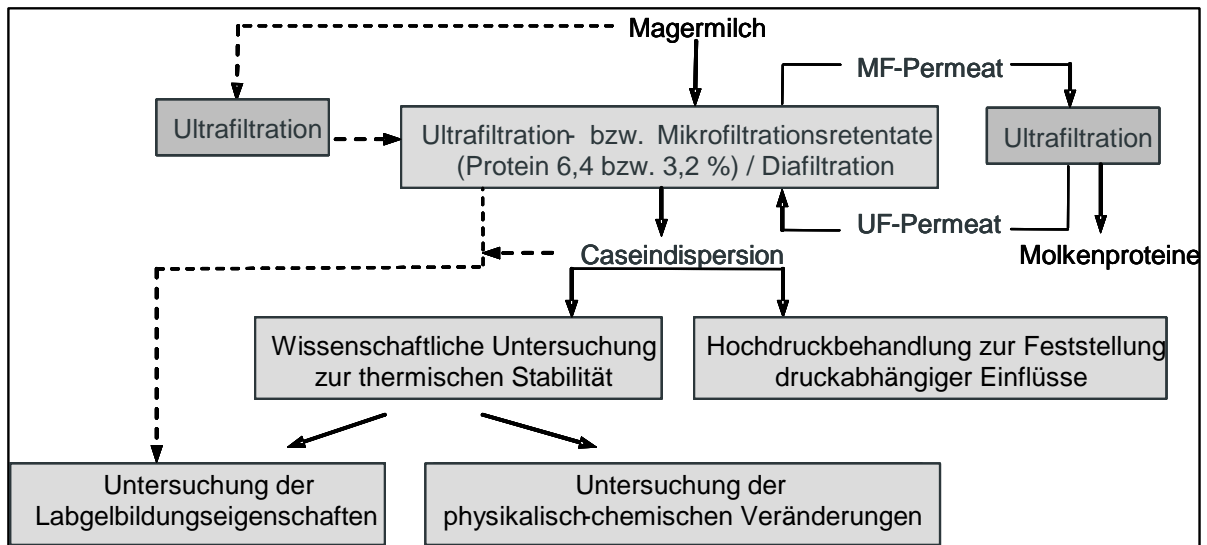


Bild 1.1: Herstellung der reinen Caseindispersionen aus der Milch mittels MF/DF in Kombination mit UF und ihre Untersuchungsfelder

Die molkenproteinfreien Caseinlösungen eignen sich hauptsächlich daher zur Wissenschaftliche Untersuchung zur thermischen Stabilität und Hochdruckbehandlung zur Feststellung druckabhängigen Einflüsse.

Es ist schon bekannt, dass es während der Milcherhitzung über 100 °C zu zahlreichen physikalischen und chemischen Veränderungen der Milchbestandteile sowie an der Caseinmicelle kommt, wodurch auch die rheologischen und Strukturbildungseigenschaften des Produktes beeinflusst werden. Es ist schon aus Arbeiten von Schreiber [2000, 2001] bekannt, dass sich die Labgelbildungseigenschaften von erhitzten molkenproteinfreien Caseinlösungen verschlechtern, wenn die Temperaturen (> 100 °C) und Heißhaltezeiten (ab 300 s) erhöht werden. In der hier vorliegenden Arbeit soll auf die Veränderungen eingegangen werden, die mit den Labgelbildungseigenschaften der Caseinmicellen in engem Zusammenhang stehen.

### Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen neben käse- und technologieigenschaften Eigenschaften der Mikrofiltrationsretentate in Anwesenheit oder Abwesenheit der Molkenproteine die Labgelbildungseigenschaften UHT-erhitzter Caseindispersionen und deren Einflussfaktoren untersucht werden. Die Caseindispersionen sollen dafür aus pasteurisierter Magermilch gewonnen werden, welche durch Mikrofiltration/Diafiltration mit Ultrafiltrationspermeat die Molkenproteine entzogen wurden. Die molkenproteinfreien Caseinlösungen können auf die molekular-strukturellen hitzebedingten Veränderungen an der Caseinmicelle mittels verschiedener Methoden untersucht werden, die mit den Labgelbildungseigenschaften der Micelle im Zusammenhang stehen. Von Interesse waren zunächst die Käse- und technologieigenschaften der Mikrofiltrationsretentate in An- bzw. Abwesenheit der Molkenproteine. Hier sollen die optimalen Casein /Molkenproteinverhältnisse untersucht bzw. optimiert, sowie der Effekt der Diafiltration auf die Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Retentate studiert werden.

Auf der anderen Seite sollen die hitzebedingten molekularen und strukturellen Veränderungen an oder in der Caseinmicellen betrachtet werden, die hauptsächlich die funktionellen Eigenschaften der Caseingele beeinflussen. Obwohl es aus den einigen Arbeiten bereits bekannt ist, welche hitzebedingte Veränderungen an der Caseinmicellen stattfinden, sind jedoch relativ wenige Informationen über das Verhalten einer reinen Caseinlösung im nativen Milchserum bezüglich dieser Reaktionen vorhanden. Diese sollen, wenn möglich, reaktionskinetisch beschrieben werden.



## 2 AKTUELLER STAND DES WISSENS

Die komplexe Struktur der Proteine (Sekundär- und Tertiärstruktur), die eng mit ihrer biologischen Aktivität verbunden ist, wird durch eine Vielzahl chemischer Bindungen zwischen den Untereinheiten eines Proteinmoleküls aufrechterhalten. Zu diesen Bindungen gehören Wasserstoffbrückenbindungen, kolloidales Calciumphosphatbrücken, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Bindungen.

Die Quartärstruktur wird, wie die Tertiärstruktur der Proteine, hauptsächlich durch nicht kovalente Bindungskräfte (hydrophobe Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen) stabilisiert. Diese Bindungen können in einzelnen Fällen am Aufbau der Quartärstruktur in Form von Disulfid-Brückenbindungen (kovalente Bindungen) beteiligt sein.

Im Folgenden wird der Einfluss der einzelnen Kräfte, die für die Stabilisierung der Caseinmicelle verantwortlich sind, diskutiert.

### 2.1 Thermodynamische Kräfte in der Caseinmicelle

#### 2.1.1 Hydrophobe Wechselwirkungen

Aminosäuren haben entweder hydrophobe oder hydrophile Seitenketten. Hydrophobe bzw. Hydrophile haben unter sich Wechselwirkung-Kräfte z. B. hydrophobe ziehen sich einander an und hydrophile stoßen sich ab oder ziehen sich an.

Aminosäuren mit unpolaren Seitengruppen (wie Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionen) sind in allen Milchproteine in großem Maße vorhanden. Somit können hydrophobe Wechselwirkungen in und zwischen allen Caseinfraktionen wirksam werden. Hydrophobe Bindungen gewährleisten den Zusammenhalt der einzelnen Monomeren sowie auch die elektrostatische Wechselwirkungen.

Caseine gehören zu den am stärksten hydrophoben Proteinen und ihre Stabilisation hängt stark von den hydrophoben Wechselwirkungen ab. Wegen des endothermen Charakters dieser Bindungsart nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen mit steigender Temperatur zu. Das Temperaturminimum liegt bei 5 °C, daher tritt bei Lagerung von Milch über mehrere Stunden bei 4-5 °C, monomeres  $\beta$ -Casein aus den Micellen aus [Reimerdes, 1982]. Ali et al. [1980] konnten zeigen, dass Micellen während der Kühlung (4-7 °C) teilweise zu Submicellen dissoziieren und innerhalb von 24 h bis zu 50 % des  $\beta$ -Casein freisetzen. Bei einer Temperaturerhöhung assoziiert  $\beta$ -Casein langsam wieder mit den Micellen. Allerdings ist nicht bekannt, ob es wieder an denselben Stellen eingelagert wird. Der Einsatz von gekühlter Milch bei der Käseherstellung führt zu Verlusten des löslichen Caseins und damit zu einer geringeren Ausbeute. Bei Temperaturerhöhung verringert sich der gelöste Anteil an Casein, der überwiegend aus  $\beta$ -Casein besteht. Abhängig von der thermischen Intensität dissoziiert  $\kappa$ -Casein beim Erhitzen.

Prolin reduziert die Hydrophobizität, wenn es an nichtpolaren Regionen der Proteine gebunden ist und führt zu partieller Dissoziation der Caseinmicelle [Marshall & Green, 1980]. Mit zunehmendem hydrostatischen Druck wird die Struktur der Caseinmicelle zerstört, da die hydrophoben Wechselwirkungen durch Druck geschwächt werden, wodurch die Caseinmicellen in kleinere Untereinheiten zerfallen [Huppertz et al., 2004; Gebhardt et al., 2005, Gebhardt et al., 2006]. Dies konnte schon durch Studien mittels Messung mit Lichtstreuung von Schmidt und Payens [1976] bewiesen werden. Die Bindungsenergie für hydrophobe Wechselwirkungen beträgt 4-12 kJ/mol [Ternes, 1995]. Allgemein ist die Bindungsenergie die Energie, die frei wird, wenn zwei Teilchen einen neuen Komplex bilden. Um beide Teilchen wieder zu trennen, muß die Bindungsenergie wieder aufgebracht werden. Außerdem zerfallen die Micellen auch nach Zusatz von Detergenzien und organischen Solventen wie Harnstoff, SDS, da diese Agentien die hydrophobe Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen lösen [McMahon und Brown, 1984; Ternes, 1995]. Hydrophobe Wechselwirkungen werden im Gegensatz zu Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen bei moderater Erhöhung der Temperatur gestärkt.

### 2.1.2 Elektrostatische Wechselwirkungen

Die elektrostatischen Bindungen können zwischen negativ geladenen Aminosäuren (Aspartin,- Glutaminsäure) und positiv geladenen (Arginin, Lysin, Histidin) Aminosäureresten entstehen. Diese Wechselwirkungen kommen bei speziellen Ionenpaaren vor, z. B. bei Phosphationen, Calciumionen, welche für die Stabilität der Quartärstruktur der Caseinmicelle verantwortlich sind. Die ionischen Bindungen zwischen negativ geladenen Carbonsäuregruppen und positiv geladenen Gruppen tragen zur Stabilität des monomeren Proteins bei. Diese Wechselwirkungen haben eine Bindungsenergie von 42-84 kJ/mol [Ternes, 1995].

Elektrostatische Bindungen können durch die Zugabe von Salzen und Änderung des pH-Wertes aufgehoben werden. Beim physiologischen pH-Wert der Milch sind die Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure negativ geladen. Die Aminogruppe von Lysin, die Imidazolgruppe von Histidin und die Guanidingruppe von Arginin sind dagegen positiv geladen [Belitz und Grosch, 1999]. Bei niedrigeren Ionenstärken führen die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den in Summe negativ geladenen Molekülen zu einer geringeren Verbindung. Bei mittleren Werten der Ionenstärke wird diese Abstoßung geringer und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiven Ende des einen und dem negativen Rest eines anderen Moleküls  $\alpha_{S2}$ -Casein stattfinden. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke schwächt diese Interaktionen und die Assoziation der Moleküle nimmt wieder ab.

Die Rolle der inter- oder intramolekularen ionischen Bindungen für die Stabilisation der Micelle ist noch nicht komplett geklärt. Es gibt eine Vielzahl an potentiellen ionischen Bindungsstellen innerhalb der Caseinmoleküle, welche eine große Rolle für die

Wechselwirkungen in den Subeinheiten spielen. Calcium und Phosphat wirken entscheidend bei der Stabilisierung der Caseinmicelle mit. Die Bindung zwischen kolloidalem Calciumphosphat (CCP) kann elektrostatischer Natur sein, da CCP positiv und die Caseine negativ geladen sind [Schmidt, 1982].

Da mit der Temperaturerhöhung eine Energiezufuhr verbunden ist, werden Bindungen gespalten. Elektrostatische Wechselwirkungen werden mit zunehmender Temperatur schwächer.

### **2.1.3 Wasserstoffbrückenbindungen**

Die Wasserstoffbrückenbindungen können zwischen Caseinmonomeren in der Caseinmicelle auftreten, sowie zwischen den ionisierten Seitenketten oder dem Lösungsmittel, z. B. Wasser. Viele Bioproteine, einschließlich der Molkenproteine, besitzen sekundäre und tertiäre Strukturen in Form von  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblatt-Konfigurationen. Diese Strukturen sind neben dem primären Basisnetz der Proteine durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert. Diese Bindungen haben besondere Wichtigkeit für die Stabilisierung der Sekundärstruktur, aber auch für die Stabilisierung der Quartärstruktur. Die Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindungen beträgt 8-40 kJ/mol [Ternes, 1995]. Wenn die Temperatur erhöht wird, werden die Wasserstoffbrücken genauso wie die elektrostatische Wechselwirkungen schwächer.

Spektrale Untersuchungen mittels Dichroismus oder Infrarotspektroskopie von isolierten Caseinen haben gezeigt, dass diese Proteine eine geringe tertiäre Struktur besitzen. Die vorhandene Sekundärstruktur wird aufgrund des hohen Gehaltes an Prolinresten stark gestört, so dass die Ausbildung von sekundären und tertiären Strukturen erschwert wird. Es ist festgestellt worden, dass mindestens 75 % von  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein in einer aperiodischen Konformation existieren [Farrell, 1988]. Weil wenig periodische Strukturen in den einzelnen Bestandteilen auftreten, ist der Grad der Stabilisation der Micelle durch  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblattstruktur vermutlich ziemlich gering. Mittels Raman-Spektroskopie konnte demonstriert werden, dass 40 % der gesamten Caseine in submicellarer Form eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur haben [Farrell et al., 1990]. Die Rolle von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Caseinkomponenten in der Micelle ist noch unklar.

### **2.1.4 Disulfid-Brückenbindungen**

Als Disulfidbrücken oder Disulfidbrückenbindungen werden als Atombindungen (Elektronenpaarbindung, kovalente Bindung) zwischen zwei Schwefel-Atomen bezeichnet, die in den Aminosäureseitenketten von zwei Cysteinresten vorkommen. Disulfidbrücken formen und stabilisieren die dreidimensionale Proteinstruktur durch die Bildung von Schlaufen innerhalb der Aminosäurekette oder verknüpfen zwei Aminosäureketten zu einem funktionstüchtigen Protein.

Eine räumliche Anordnung (Faltung) der gesamten Polypeptidkette, gegebenenfalls durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen räumlich benachbarten Cysteinen, wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Somit kann ein höherer Anteil an Sekundärstruktur durch Disulfidbrücken für die Caseinfraktionen angenommen werden. In der Tat können nicht identische Polypeptidketten durch Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden. Für das Ausbilden von Disulfid-Bindungen sind Thiolgruppen notwendig, welche nur in der Aminosäure Cystein enthalten sind. Proteine, die die Aminosäure Cystein enthalten, sind grundsätzlich fähig, Disulfid-Bindungen auszubilden. Im Gegensatz zu anderen Bindungen beträgt die Bindungsenergie für die Disulfidbrückenbindungen in einer Größenordnung von 120-400 kJ/mol [Ternes, 1995].

$\kappa$ -Casein und  $\alpha_{S2}$ -Casein enthalten Cystin (oder Cysteine), jedoch ist der Grad der Disulfidquervernetzung, die normalerweise in der Caseinmicelle auftritt, umstritten. In  $\alpha_{S2}$ - und  $\kappa$ -Casein befinden sich jeweils zwei, während  $\alpha_{S1}$  und  $\beta$ -Casein kein Cystein enthalten und somit keine Disulfidbindungen ausbilden können. Es lässt sich folgern, dass Disulfidbrücken für die gesamte Stabilität der Caseinmicellen verantwortlich sind, aber sie sind nicht die Antriebskraft für die Micellenbildung [Walstra, Jenness, 1984].

### 2.1.5 Kolloidales Calciumphosphat

Nach Walstra und Jenness [1984] liegen in Milch ca. 30 mmol/l Calcium vor. Davon sind zwei Drittel micellares Calcium und ein Drittel lösliches Calcium. Calciumphosphat hat in Form von Calciumbrücken einen großen Einfluss auf die Stabilität von Caseinmicellen. Das lösliche Calcium setzt sich aus freien Calciumionen und mit Citrat oder Phosphat verbundenen Calciumionen zusammen. Die Milchsalze stehen untereinander in Lösung, zwischen Lösung und kolloidaler Phase im dynamischen Gleichgewicht. Das Gleichgewicht zwischen Calciumphosphat in der ionogenen Form und in der kolloidalen Form ist temperaturabhängig. Beim Erhitzen fällt Calciumphosphat aus. Bei tiefen Temperaturen dissoziieren Calcium, Phosphat und Citrat aus der Micelle.

Kolloidales Calciumphosphat trägt zur strukturellen Integrität der Micelle bei. Der exakte Mechanismus der Micellstabilisierung durch kolloidales Calciumphosphat ist jedoch noch nicht genau aufgeklärt [Walstra, 1990; Töpel, 1991]. Es gibt zwei verschiedenen Formen, die mit der Caseinmicelle ein äußeres System in Form von geladenen Doppelschichten ausbilden. Kolloidales Calciumphosphat liegt vermutlich in Form von  $Ca_9(PO_4)_6$ -Gruppen vor und bewirkt, dass die Submicellen zu Micellen aggregieren und spielt damit eine sehr wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Integrität der Micellen.

Calciumbrücken werden als bedeutende Bindungen auch zur Stabilisierung der Labgele beschrieben [Walstra und Jenness, 1984; Walstra und Van Vliet, 1986; Dalgleish, 1993; Horne, 1998; Walstra et al., 1999; Udabage et al., 2001; Lucey, 2002].

Da es viele unterschiedliche Aussagen zur Struktur der Caseinmicelle gibt, sollen im Folgenden die verschiedenen Modelle zur Struktur der Caseinmicelle vorgestellt werden.

## 2.2 Unterschiedliche Modelle zur Aufklärung der Caseinstruktur

Es wurden seit 1965 [Waugh & Noble, 1965] viele unterschiedliche Caseinmodelle aufgestellt, jedoch ist die genaue Caseinstruktur noch nicht geklärt. Bisher sind v. a. vier Modelle von übergeordneter Bedeutung zu nennen:

- Coat-Core (Mantel-Kern)
- Internal Structure (Interne Struktur)
- Sub-Micelles (Submicellen)
- Gel-like Aggregates (Gel-ähnliche Aggregate)

### 2.2.1 Coat-Core Modell (Mantel-Kern)

Beim Coat-Core-Modell nach Waugh & Noble [1965] und Waugh & Talbot [1971] besteht das Innere (core) der Micellen aus  $\alpha_s$ - und  $\beta$ -Casein, welche von einem stabilisierenden  $\kappa$ -Casein-Mantel (coat) umgeben sind. Diese äußere Schicht begrenzt das Micellenwachstum, bei dem Calcium keine Bedeutung zugeordnet wurde.

1966 stellte Payens ein vergleichbares Modell auf. Es basiert auf der Assoziation der Caseine und ist in Bild 4.1 dargestellt. Der Micellkern schließt dichte  $\alpha_{S1}$ -Caseinmoleküle ein, welche in einem Netzwerk über  $\beta$ -Casein gebunden ist. Ähnlich wie bei Waugh & Noble [1965] und Waugh & Talbot [1971] ist die Oberfläche der Caseinmicellen mit  $\kappa$ -Casein bedeckt. Im Gegensatz dazu ist das Calciumphosphat im Modell nach Payens [1966] sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren der Caseinmicellen lokalisiert [Rollema, 1992].

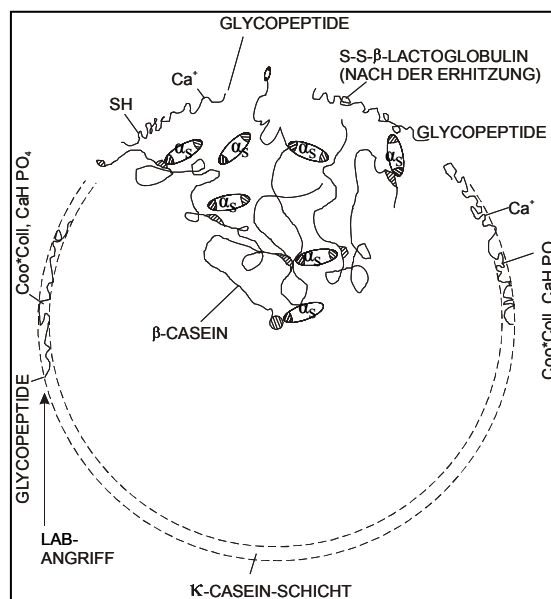


Bild 4.1: Coat-Core-Modell (Mantel-Kern Modell) der Caseinmicelle [Payens, 1966]

Im Coat-Core-Modell bleibt auch außer Acht, dass im Inneren der Micelle etwa 30 % des  $\kappa$ -Caseins liegen und auf der Micellenoberfläche sowohl  $\alpha_s$ - als auch  $\beta$ -Caseinmoleküle vorhanden sind. Es ist anhand dieses Modells zu schwierig zu erklären, warum  $\beta$ -Casein während der Kühlung aus der Micelle dissoziiert.

Parry und Carroll [1969] definierten das Coat-Core-Modell anders, da sie keine  $\kappa$ -Casein-Antigene auf der Micelleoberfläche nachweisen konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen und auf der Größe der lokalisierten  $\kappa$ -Caseinkomplexe stellten Parry und Carroll [1969] fest, dass das  $\kappa$ -Casein als Ausgangspunkt der Kernbildung dienen kann, über das das calciumunlösliche  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein durch kolloidales Calciumphosphat zusammengebunden und nachher stabilisiert wird. Der Labangriff auf die Caseinmicellen wird so erklärt, dass Serum- $\kappa$ -Casein an der Koagulationsreaktion teilnehmen kann und bei der Ausbildung der Brücken zwischen den Micellen eine große Rolle spielt. Ihrer Meinung nach sind  $\alpha_s$ - und  $\beta$ -Caseine außen liegend miteinander durch Calciumphosphat verbunden, während  $\kappa$ -Casein im Inneren der Micelle sowie im Serum vorhanden ist (Bild 4.2).

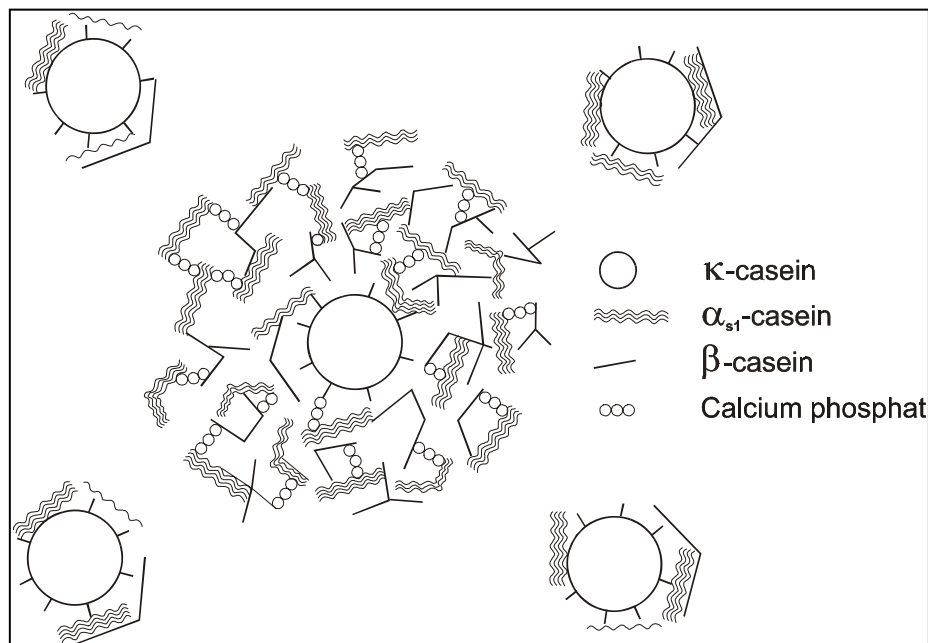


Bild 4.2: Caseinmicellen-Modell aufgestellt durch Parry und Carroll [1969]

Zuletzt wurde von Paquin und seinen Mitarbeitern [1987] ein vergleichbares Modell aufgestellt, wobei der Micellkern als Gerüst aus  $\alpha_{s1}$ -Caseinen und kolloidalem Calciumphosphat beschrieben wird und die  $\beta$ -Caseine durch hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind. Der Micellkern besteht aus  $\alpha_{s1}$ -Caseinen und vergleichsweise hohen Anteilen aus  $\kappa$ -Caseinen [Rollema, 1992].

### 2.2.2 Internal Structure (Innere Struktur)

Das erste Internal-Structure-Modell wurde von Rose im Jahr 1969 (Bild 4.3) aufgestellt. Rose hat die endotherme Polymerisation von  $\beta$ -Casein als Basis für seine Micellenstruktur verwendet. Dieses geht von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Caseinen aus.

Demnach bilden sich durch Aneinanderreihung von  $\beta$ -Caseinmolekülen Ketten aus, an die sich  $\alpha_S$ -Caseine binden.  $\kappa$ -Caseine lagern sich an die  $\alpha_S$ -Caseinmoleküle an und befinden sich am Rand der Micelle. Bei der Entstehung der Micellenstruktur spielt kolloidales Calciumphosphat als stabilisierender Bestandteil durch die Bildung eines Crosslink-Netzwerkes eine Rolle.

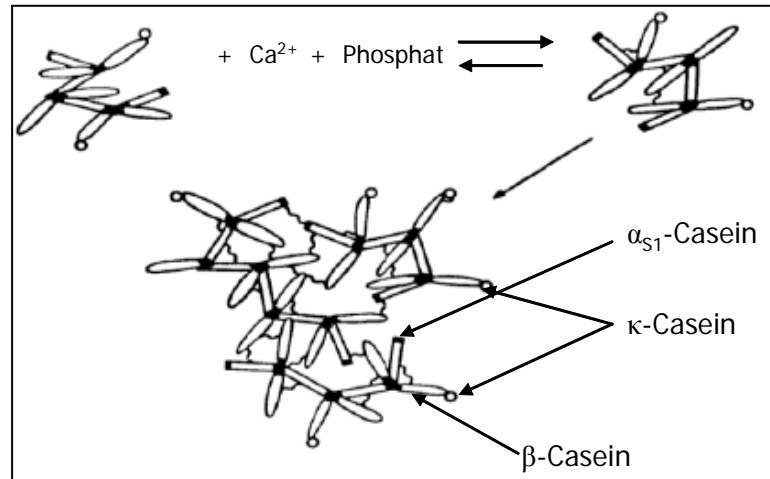


Bild 4.3: Schematische Darstellung der Bildung einer Caseinmicelle nach Rose [1969]

Nach Garnier & Ribadeau-Dumas [1970] bildet trimeres  $\kappa$ -Casein eine Verzweigungsstelle, an der die anderen Caseine anknüpfen, so dass auf diese Weise ein poröses Netzwerk entsteht. Alle Assoziationen zwischen den Submicellen sind durch nicht kovalente Bindungen verknüpft. Das Labenzym kann in die lose Caseinstruktur eindringen und mit dem  $\kappa$ -Casein reagieren. In diesem Modell wird Calciumphosphat keine entscheidende Rolle zugeordnet [Wong, 1988; Rollema, 1992] (Bild 4.4). Die verschiedenen Caseine sind beim Internal-Structure-Modell gleichmäßiger über die ganze Micelle verteilt als beim Coat-Core-Modell. Es besteht aus einer durchschnittlichen, sich wiederholenden Maßeinheit von  $1\kappa$ -,  $2\alpha_{S1}$ - und  $2\beta$ -Caseinuntereinheiten, die in einem dreidimensionalen fadigen Netzwerk zusammengebaut sind oder als Polymere aus 130-130000 Monomeren bestehen, in denen die Trimere des  $\kappa$ -Caseins Knoten bilden und darin sind  $\alpha_{S1}$ - und  $\beta$ -Casein in Vierer- oder Achtergruppen eingelagert. Trimere des  $\kappa$ -Caseins dienen als Nullpunkte und werden mit drei verketteten Zweige aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein verbunden. In diesem Modell hat das kolloidale Calciumphosphat keine wichtige Rolle.

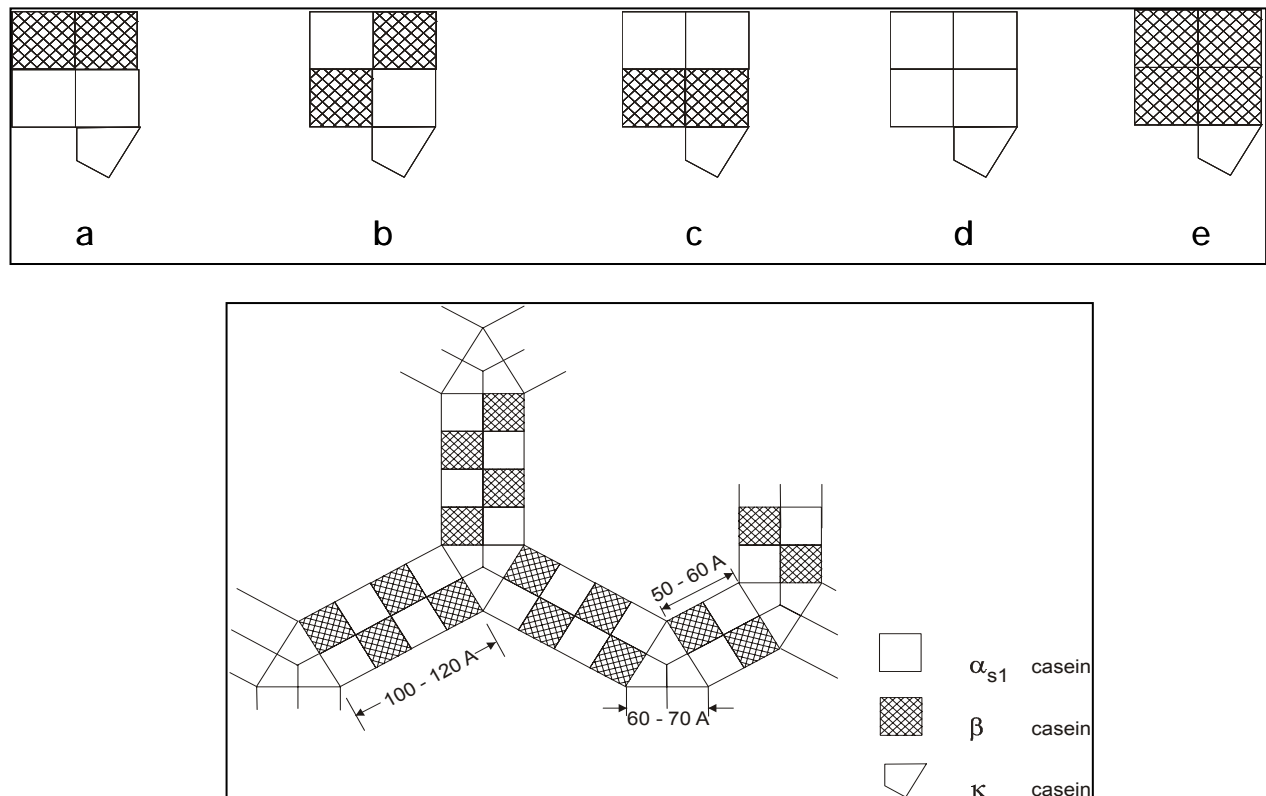


Bild 4.4: Teil der Wiederholungseinheiten des Protein-Netzwerkes in der Caseinmicelle aufgestellt durch Garnier und Ribadeau-Dumas [1970]. a) –e) verschiedene Typen möglicher Tetramere von  $\alpha_{S1}$ - und  $\beta$ -Caseine, d) und e) entspricht tetramere von nur  $\alpha_{S1}$ - oder  $\beta$ -Caseine.

### 2.2.3 Submicellen-Modelle

Morr [1967] vertrat als erster das Modell der Submicellen. Er machte Calcium für den Zusammenhalt der Submicellen verantwortlich und konnte damit die Beobachtung erklären, dass beim Entfernen von Calcium mittels Dialyse die Micellen zerfallen. Seiner Ansicht nach sind alle Submicellen gleich aufgebaut. Daher müssten sich die Micellen wiederum zu größeren Aggregaten zusammenlagern, weil ihr Wachstum nicht begrenzt wird. Da Submicellen durch Dialyse nicht weiter gespalten werden, ging Morr [1967] davon aus, dass starke Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Caseinmolekülen in den Submicellen bestehen. Die Submicellen werden durch hydrophobe Bindungen und Calciumcaseinatbrücken stabilisiert und bilden über kolloidale Calciumphosphatbrücken die Micellenstruktur aus, wobei  $\alpha_{S1}$ - und  $\kappa$ -Casein-Komplexe die Micellenoberfläche bedecken (Bild 4.5) [Rollema, 1992].



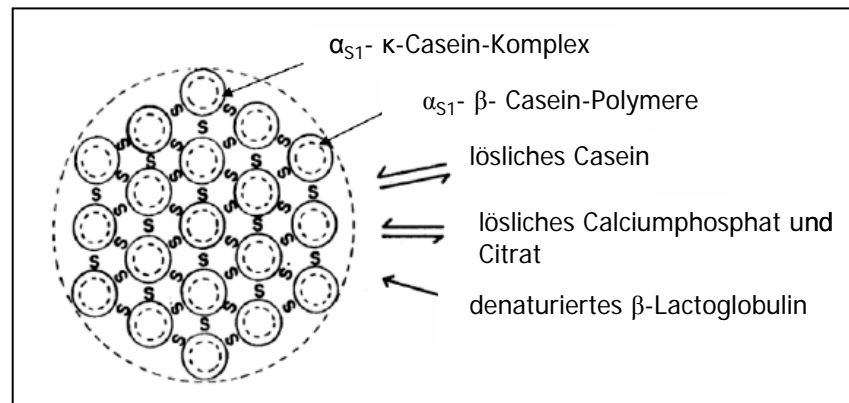


Bild 4.5: Caseinmicellen-Struktur aufgestellt durch Morr [1967] mit assoziierten Submicellen mit gleichmäßiger Zusammensetzung aus  $\alpha_{S1}$ - und  $\beta$ -Casein-Polymeren, bedeckt mit  $\alpha_{S1}$ - und  $\kappa$ -Casein Komplexen, S symbolisiert kolloidales Calciumphosphat

Slattery und Evard [1973] entwickelten dieses Modell weiter. Demnach besteht eine Caseinmicelle aus einzelnen, etwa 10-20 nm großen Untereinheiten, den sogenannten Submicellen, die wiederum aus 15-30 monomeren Caseinmolekülen aufgebaut sind.  $\kappa$ -Caseinmoleküle sind auf Teilen der Submicellenoberfläche in der Weise angeordnet, dass bei der Aggregation der Submicellen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bei der neu entstehenden Micelle die Oberfläche völlig mit  $\kappa$ -Caseinmolekülen bedeckt ist. Bei hohem  $\kappa$ -Caseingehalt ist das „Micellenwachstum“ nach einer kleinen Anzahl von Submicellen beendet, da dann bereits die Micellenoberfläche mit  $\kappa$ -Caseinmolekülen bedeckt ist.

Im Jahr 1976 haben Schmidt und Payens ein Modell aufgestellt, welches ebenfalls zu diesem Modell der Submicellen gehört. Sie vermuteten, dass die Submicellen durch Calciumphosphat in Verbindung stehen und der Kern der Submicellen durch die polaren und hydrophoben Regionen der Proteine gebildet wird. Die Zusammensetzung der Proteine in den Submicellen wurde nicht näher identifiziert, aber es wurde vermutet, dass die  $\kappa$ -Caseine auf der Oberfläche der Caseinmicelle lokalisiert sind. 1980 hat Schmidt das Konzept von Slattery und Evard [1973] adaptiert, wobei bei ihm die Submicellen aus variablen Proteinen zusammengesetzt sind und nur Calciumphosphat für die Bindung der Submicellen zuständig ist (siehe Bild 4.6). Submicellen mit niedrigem  $\kappa$ -Caseingehalt oder mit keinem  $\kappa$ -Caseingehalt sind im Inneren der Caseinmicelle verdeckt. Micellares Wachstum würde zu einem Ende kommen, sobald die Oberfläche vollständig aus  $\kappa$ -Casein besteht.

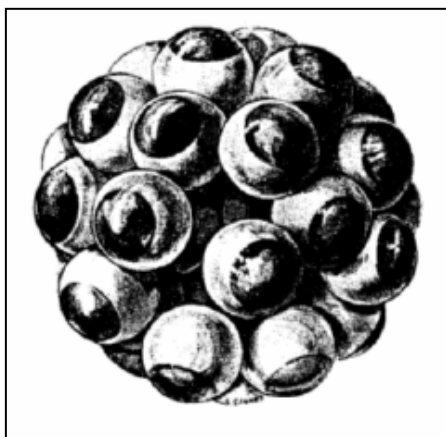


Bild 4.6: Strukturmodell einer Caseinmicelle von Slattery und Evard [1973]. Die helle Oberfläche stellt  $\alpha_{s1}$ - und  $\beta$ -Casein-Polymere (hydrophobe Region) dar. Die dunkle Fläche (20 % der Oberfläche) zeigt die assoziierten  $\kappa$ -Caseinpolymere (hydrophile Region) [Brunner, 1977; Rollema, 1992].

In den Studien von Ono und Obata [1989] wurden „künstlichen“ Micellen aus den Proteinfractionen vorbereitet, welche durch Gelchromatographie aus calciumarmen Micellen erhalten wurde. In diesem Model, stellen die Proteinfractionen die Bausteine der Micellen dar. Der Kern der Micelle besteht aus Aggregaten von  $\alpha_s$ - und  $\beta$ -Casein, während der Mantel aus den Partikeln der äquimolaren Menge von  $\alpha_s$ - und  $\kappa$ -Casein entsteht. Zwei Typen von Aggregaten sind durch Calciumphosphat verknüpft. In den Mantelpartikeln ist  $\kappa$ -Casein nach außen gerichtet, wohingegen  $\alpha_s$ - Casein für die Bindung der Kern-Subeinheiten verantwortlich ist, und nach innen zeigt (siehe Bild 4.7).

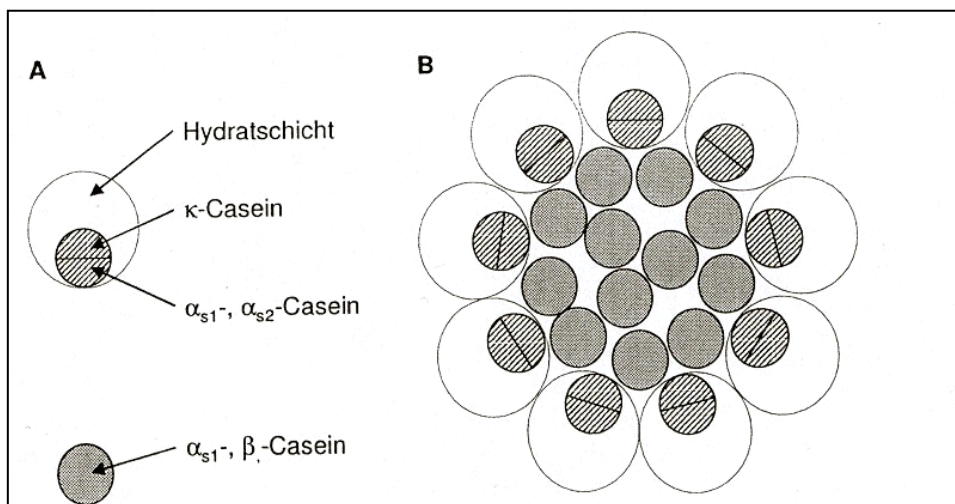


Bild 4.7: Schematische Darstellung der Struktur der Submicellen (A) und der Caseinmicelle (B) [Ono und Obata, 1989]

Während eine Submicelle durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Caseinmolekülen stabilisiert wird [Schmidt, 1982], erfolgt der Zusammenhalt der Submicellen untereinander durch Calciumphosphat [Walstra, 1990]. Somit sind die Micellen stabil und flocken nicht aus. An die Phosphoserreste der Caseine werden Calciumionen und Calciumphosphat gebunden und so die Caseinmoleküle der Submicellen miteinander

verbunden [Dalglish, 1992; Walstra, 1999; Walstra et al. 1999] (siehe Bild 4.8). Die Caseinmicellen enthalten die verschiedenen Monomere in unterschiedlichen Konzentrationen.

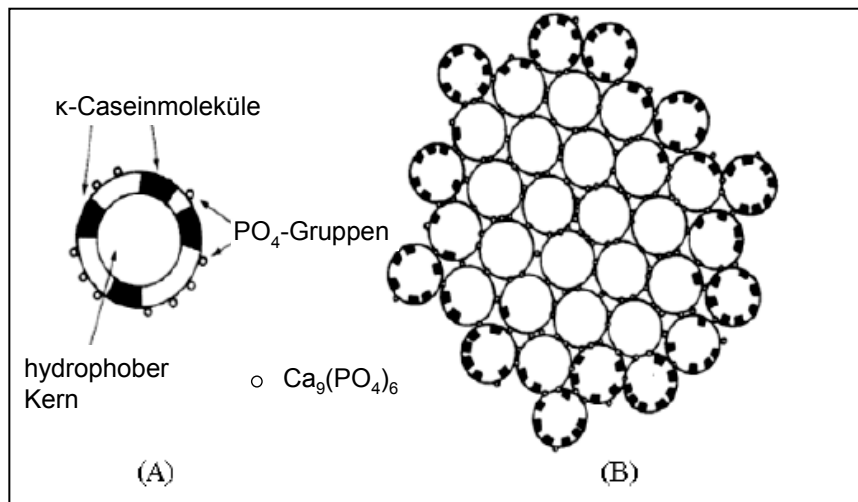


Bild 4.8: Casein-Submicellen-Modell nach Schmidt [1982]. Schematische Darstellung (A) einer Submicelle und (B) einer Caseinmicelle zusammengesetzt aus Submicellen [Wong, 1988; Rollema, 1992].

Das am meisten akzeptierte Modell in der Submicellen-Modell-Kategorie, die durch das Slattery-und-Evard-Modell [1973] bestätigt wurde, wurde nach ca. 11 Jahren durch Walstra und Jenness [1984] aufgestellt. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass die Caseinmicellen aus kugelförmigen Subeinheiten bzw. Submicellen aufgebaut sind. Die Zusammensetzung der Submicellen ist variabel, jede Submicelle besteht aus 20-25 Caseinmolekülen und besitzt eine Größe von 12-15 nm. Die Submicellen werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Calciumphosphat-Verbindungen zusammengehalten (siehe Bild 4.9). Das Micellenwachstum wird dann gestoppt, wenn die gesamte Micellenoberfläche von κ-Casein-haltigen Submicellen besetzt ist. Der stark hydrophile Teil des κ-Caseins, der mit einem Saccharidrest verknüpft ist, ragt wahrscheinlich als ein „flexibles Haar“, das mehr oder weniger wahllos aufgewickelt ist, in das umgebende Medium.

Eine Submicelle mit κ-Casein weist zumindest partiell sterische Abstoßungskräfte auf, so dass eine Aggregation an der betreffenden Seite behindert oder sogar verhindert wird. Das bedeutet jedoch nicht, dass auf der Oberfläche einer Caseinmicelle nur κ-Casein vorhanden ist.

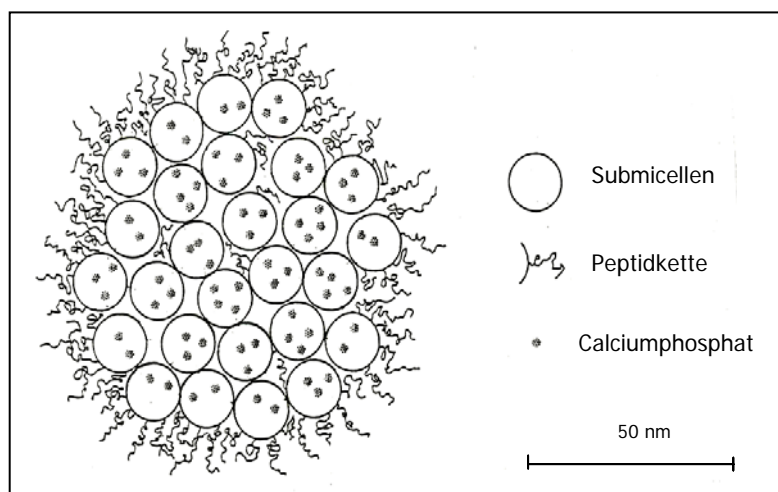


Bild 4.9: Schematisierte Darstellung einer Caseinmicelle im Querschnitt nach Walstra und Jenness [1984].

#### 2.2.4 Gel-like Aggregates (Gel-ähnliche Aggregate)

Holt beschreibt [1992], dass die Caseinmicelle als ungeordnete Matrix aus flexiblen Caseinnetzwerken als eine gelähnliche Struktur mit Mikrokörnchen aus CCP und Caseinophosphat im Zentrum gesehen werden kann und  $\kappa$ -Casein kommt an der Oberfläche der Kugeln vor und führt zu der sogenannten „haarigen Schicht“. De Kruif [1999] stützt diese Struktur der Caseinmicelle, wie sie durch Holt [1992, 1994] bildlich dargestellt wurde (Bild 4.10) und beschreibt das Verhalten sowie die Eigenschaften der Micellen im Bezug auf adhäsiv harte Kugeln. Caseinmicellen werden durch zwei Faktoren stabilisiert, das Oberflächenpotential von ca. -20 mV bei pH 6,7 und die sterische Stabilisation durch die herausragende  $\kappa$ -Caseinschicht Gel-ähnliche Struktur in welche die Mikrokörnchen von CCP und von der Oberfläche von welche die C-Terminal Region von  $\kappa$ -Casein in der Form Haarigerschicht ausgedehnt sind. Diese zwei Modelle enthalten zwei Schlüsseleigenschaften des Submicellen-Modells, die Bindungsrolle von CCP und die überwiegende Oberflächenlokalisierung und micellen-stabilisierende Rolle des  $\kappa$ -Caseins. Sie unterscheiden sich hauptsächlich bei der inneren Struktur der Micelle.  $\alpha_{S2}$ -Casein hat zwei hydrophobe und zwei Phosphoserylgruppen und kann über jede funktionelle Gruppe weitere Caseine binden und dadurch verlängert sich das Netzwerk. Nach dem dual binding Modell von Horne [1998, 2002] (Bild 4.10) wird behauptet, dass die Proteine in den Caseinmicellen durch zwei verschiedene Bindungstypen verbunden sind, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Hydrophobe Wechselwirkungen stellen die Antriebskraft für die Bildung von Caseinmicellen dar, während elektrostatische Wechselwirkungen das Wachstum von Polymeren limitieren bzw. die Größe der Polymerisation definieren. Nach diesem Modell [Horne, 1998, 2002] ist es wichtig, dass in den Micellen hydrophile und hydrophobe Regionen von Caseinen vorliegen. Die hydrophilen Regionen der  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\beta$ -Caseine sind reich an Phosphoserin, woran kolloidale Calciumphosphat Partikeln gebunden ist. Die hydrophoben Regionen verbinden und stabilisieren den Kern der Micelle. Visser [1992]

schlug vor, dass die Micellen kugelförmige Gemische der Caseinmoleküle sind, die zufällig teils durch Salzbrücken in der Form des amorphen Calciumphosphats aggregiert und teils durch andere Kräfte und zusammengehalten sind (hydrophobe Wechselwirkungen).

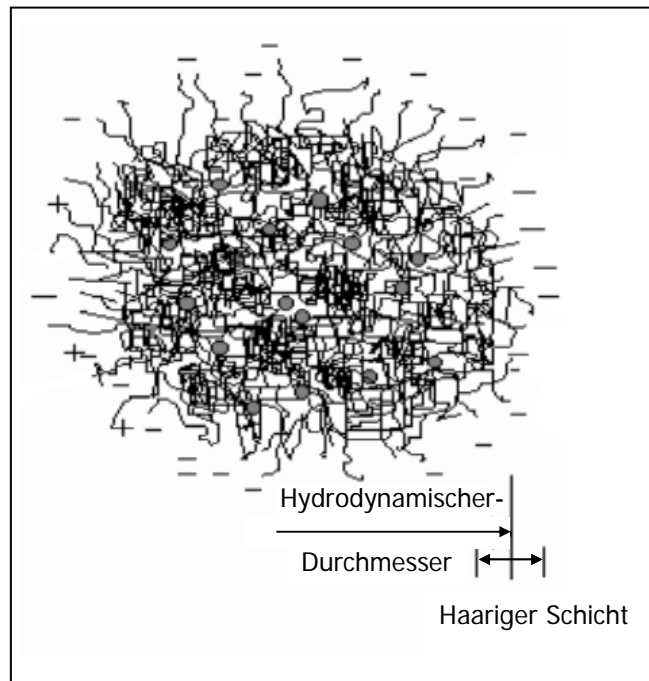


Bild 4.10: Caseinmicellen-Modell durch Holt [1992]. Die grauen Kreise zeigen die Calciumphosphat-Nanocluster. Das Modell wurde von Horne [1998] weiter ausgearbeitet

Eine Bindung zwischen den Caseinen findet zuerst in den hydrophoben Regionen statt, wie im Bild 4.11 als rechteckige Stäbe die Verbindung zwischen CCP (kolloidales Calciumphosphat) und auch Phosphoserineüberreste der Caseinmoleküle gezeigt wird.  $\kappa$ -Caseine, die als  $\kappa$  gekennzeichnet wurden, begrenzen das weitere Wachstum der Micelle.

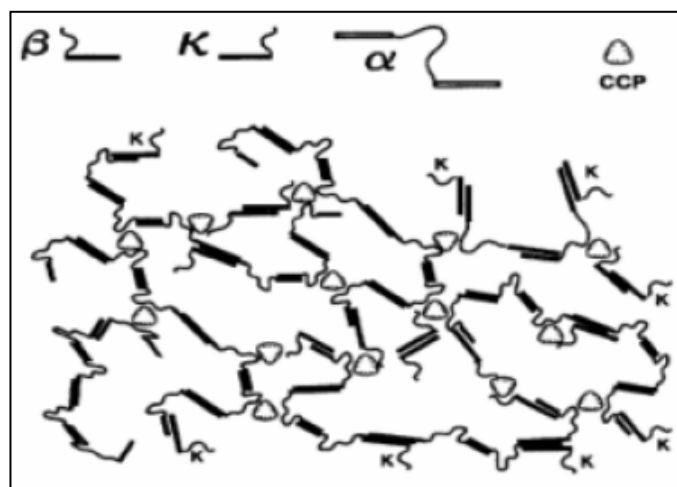


Bild 4.11: Das dual-binding Modell für die Caseinmicellestruktur mit  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -Casein. [Horne, 1998]

Von Dalgleish et al. [2004] wurden die Caseinmicellen mittels Feld-Emission-Rasterelektronenmikroskopie (Bild 4.12) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Partikel mit Durchmessern im Bereich von 300-500 nm im Allgemeinen größer als bisher angenommen die durchschnittlichen Micellen sind. Die Oberfläche scheint aus zylinder- oder röhrenförmigen Strukturen mit Durchmessern von 10 und 20 nm aufgebaut zu sein. Diese Ausstülpungen können den Eindruck der klassischen Submicellen, d.h. das himbeerartige Aussehen wiedergeben, das bisher für die Micelle angenommen worden ist. Und welches verwendet wurde, um die submicellaren Modelle zu stützen [Rollema, 1992; Kalab et al., 1982]. Jedoch zeigte sich, dass die Strukturen der Micelle nicht kugelförmig sind. In der Tat erscheinen sie als Schläuche oder Zylinder mit halbkugelförmigen Kappen an ihren Enden. Entsprechend diesen Mikrographen ist die micellare Oberfläche beträchtlich komplizierter als die sogenannten „Haare“ auf der Micellenoberfläche. Es ist nicht einfach, die Länge der Ausstülpungen anzugeben. Man geht von einer Länge von 40 nm aus, wobei dies sehr viel länger als die bisherigen Vorschläge für die Tiefe der haarigen Schicht ist. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass dieses Bild durch die Probenpräparation (Fixierung mittels Glutaraldehyd) beeinflusst wurde und daher ebenfalls nicht als „Beweis“ für die tatsächliche Struktur der Caseinmicelle angesehen werden kann.

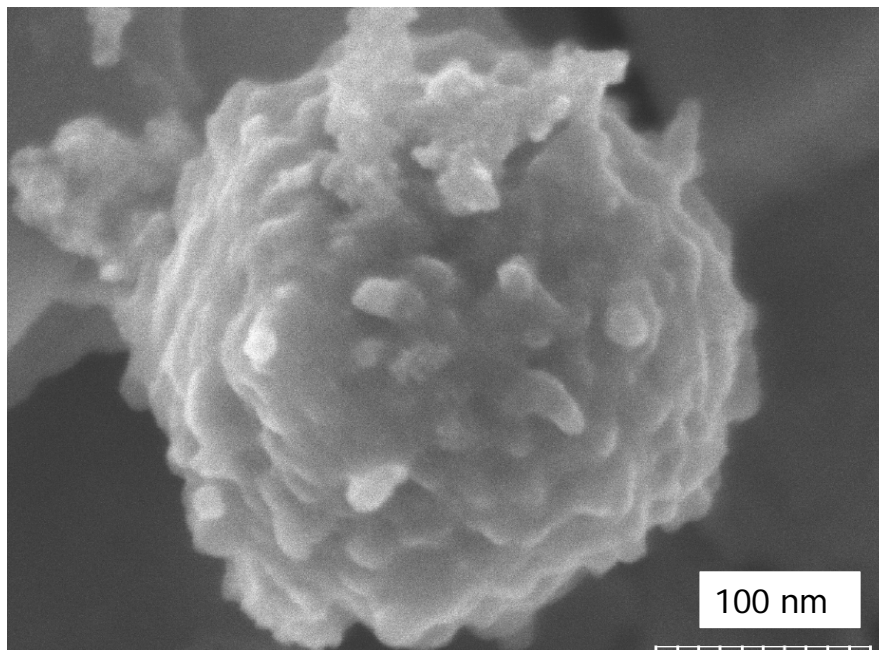


Bild 4.12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Caseinmicelle nach Dalgleish et al. [2004]

Bislang konnte man sich nicht auf ein allgemeingültiges Modell einigen, welches alle bisher bekannten Eigenschaften der Caseine erklärt. Für jedes der vorgestellten Modelle existieren Erkenntnisse, welche den jeweils anderen widersprechen. McMahon und McMaunus [1998] haben z.B. keinen Beweis gefunden, um das submicellare Modell zu stützen. Sie stellten fest, wenn die Micellen aus Submicellen bestehen, müssen diese kleiner als 20 nm sein oder

weniger dicht gepackt als angenommen, damit in den Mikrographen die konstituierenden Proteine der Submicellen als einzelne Proteine erscheinen. Die TEM-Mikrographen sehen dem Modell sehr ähnlich, das durch Holt [1994] vorgeschlagen wurde. Walstra [1999] schlägt vor, dass die Caseinmicellen aus einer gut definierten Substruktur von 20 nm bestehen und dass diese Einheiten, die durch kleine Calciumphosphatbrücken verbunden sind, während andere Modelle das Bestehen der Casein-Submicellen bestreiten und Calciumphosphatbrücken für Kern des Micellewachstums halten [Holt et al., 2003]. Alle Modelle gehen davon aus, dass sich die  $\kappa$ -Caseine an der Micelloberfläche befinden und dort mit ihren Glykanen eine haarige Schicht bilden.

Trotz vielfacher Überlegungen und Bemühungen des experimentellen Nachweises konnte bisher kein Beweis oder eine abgesicherte Hypothese für die Struktur der Caseinmicelle gefunden werden. Abgesehen von den oben diskutierten Modellen, welche alle von einem statischen Ansatz ausgehen, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Caseinmicelle um ein dynamisches System handelt, was wiederum von einer Reihe von Wissenschaftlern propagiert wird. Es bleibt also festzustellen, dass es sich lediglich um Modelle handelt, die Ansätze zum besseren Verständnis bieten und dass die wahre Struktur bisher noch nicht geklärt werden konnte.

Daraus ergibt sich, dass der Ausgangspunkt zu dieser Arbeit in Bezug auf die Caseinmicellstruktur keineswegs festgelegt war. Möglicherweise waren bisherige Ansätze, die Caseinmicellstruktur zu beweisen, dadurch gehandicapt, dass man kaum Untersuchungen zu ihrer thermischen Reaktivität, und zwar in Abwesenheit von Molkenproteinen, durchgeführt hat.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, weitere Aufschlüsse zur Caseinmicelle zu erarbeiten, indem von einer reinen Caseinmicelldispersion ausgegangen wurde, die zuvor mittels Membrantrenntechnik mehr oder weniger vollständig von den wesentlich hitzelabileren Molkenproteinen befreit wurde. Bei Erhitzungsexperimenten konnte danach die tatsächliche thermische Sensibilität der Caseinmicelle untersucht werden, ohne dass dies von störenden Effekten durch Reaktionen der Molkenproteine überlagert wurde.

Neben ergänzenden Erkenntnissen zur Caseinmicelle an sich haben die daraus ableitbaren Schlussfolgerungen eine hohe technologische Relevanz, in dem neue Wege zur Herstellung von Käse aus erhitzter Milch eröffnet werden. Dies war bisher nicht möglich, so dass sporenbildende Mikroorganismen kaum oder gegebenenfalls durch Zusatz von Nitrat unterdrückt werden konnten bzw. mussten.

### **2.3 Die Interaktionen zwischen Molkenproteinen und Caseinen während der Erhitzung der Milch und Lösungswege zur Optimierung der Labgelbildungseigenschaften von UF- bzw. MF-Retentate**

Wie schon bekannt, denaturieren die Molkenproteine während der Erhitzung und bilden mit dem  $\kappa$ -Casein Komplexe, welche die Koagulationszeit der Milch und die Gelfestigkeit der Milch verhindern. Nach Dalgleish [1990] erhöht sich die Koagulationzeit der erhitzten Milch bereits bei geringer Molkeproteindenaturierung. Wenn die Molkenproteine zu über 50 % denaturiert vorliegen, erhöht sich die Koagulationzeit erheblich. Studien von Ghosh et al. [1996] haben gezeigt, daß die Labgelkoagulationszeit von erhitzter Milch linear zunimmt, wenn eine Molkenproteindenaturierung zwischen 20 bis 99 % vorliegt. Nach Steffl [1999] wird die Labgelbildung vollständig verhindert, wenn die Gele mehr als 60 % denaturierte Molkenproteine enthalten. Corredig und Dalgleish [1996] stellten dar, dass ungefähr 60 % des  $\kappa$ -Caseins von  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) abgeschirmt werden, wenn die Milch zwischen 120-140 °C für 4 s erhitzt wird, während nur 15 % des  $\kappa$ -Caseins von  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La) blockiert werden. Abgesehen von der Molkenproteindenaturierung können andere physikalisch-chemische Veränderungen an oder in der Caseinmicelle vorkommen, wie im Salzgleichgewicht, wodurch besonders die Aggregationsphase beeinflusst wird [Hooydonk et al., 1987]. Die Änderungen der Labgelkoagulationszeit und die Gelfestigkeit der Labgele, die aus erhitzter Milch hergestellt wurden, können durch Säure- oder Calciumzugabe vor der Erhitzung [Singh und Waungana, 2001; Marshall, 1986; Banks et al., 1987; Lucey et al., 1993] verhindert werden. Es wurde schon festgestellt, dass die Erhitzung zur Präzipitation von Calciumphosphat und weiter zur Abnahme des löslichen Calciums führt. Daher ist eine bestimmte Calciumkonzentration notwendig, um die Ausbildung von Labgelen [Dalgleish, 1983; Nakamura und Niki, 1993] zu ermöglichen. Jedoch weder eine Säure- noch eine Calciumzugabe kann die ursprünglichen Labgelbildungseigenschaften insbesondere die Gelfestigkeit, der erhitzten Milch auf das Maß zurücksetzen, welches in unerhitzter Milch erreicht wird [Lucey et al., 1993]. Das heißt, die meisten mit der Erhitzung in Verbindung stehenden Veränderungen müssen den Interaktionen zwischen den Molkeproteinen und  $\kappa$ -Caseinen zugewiesen werden.

Um den Inhibierungseffekt von denaturierten Molkenproteine auf die Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Milch zu vermeiden und die Herstellung von halbfesten oder Hartkäsen aus erhitzter Milch zu ermöglichen, können folgende zwei Strategien verfolgt werden [Schreiber & Hinrichs, 2000]:

- 1 Konzentrierung des Gesamtproteingehalts von Magermilch durch Ultrafiltration (UF)
- 2 Entfernung von Molkenproteinen aus Magermilch durch Mikrofiltration (MF).



Diese zwei Verfahren vor der Erhitzung ermöglichen die gleiche Labgelkoagulationszeit und die gleiche Labgelfestigkeit nach 60 Minuten (von der Zugabe des Labenzym) wie in pasteurisierter Magermilch.

Bei der ersten Strategie können die Labgelbildungseigenschaften erhitzter Milch durch vorherige UF und damit durch Aufkonzentrierung der Gesamtmilchproteine verbessert werden. [Maubois & Mocqout, 1974; Mistry & Maubois, 1993; Schreiber, 2000]. Durch die Erhöhung der Caseinkonzentration könnte die hohe Molkenproteindenaturierung toleriert werden.

Um den negativen Einfluss der Hoherhitzung auf die Labgelbildungseigenschaften zu verhindern, kann die Mikrofiltration eingesetzt werden, um den Molkenproteingehalt zu reduzieren. Diese zweite Strategie erlaubt, die Molkenproteine aus der Milch vollständig zu entfernen und eine Caseinmicelllösung herzustellen, die in ihrer Zusammensetzung bis auf die Molkenproteine identisch mit Rohmilch ist [Punidadas & Rizvi, 1998; Saboya & Maubois, 2000; Kulozik & Kersten, 2002]. Caseinmicellen sind nach bisherigem Wissenstand hitzestabiler als die Molkenproteine. Aber auch bei den Caseinen entstehen ab 110 °C zeitabhängig zahlreiche chemische und physikalische Veränderungen an oder in den Caseinmicellen. Dazu zählen die folgenden Veränderungen: Proteolyse und Dissoziation der Caseinmicelle, Aggregation der Caseinmicellen und Hitzekoagulation, Bildung kovalenter Bindungen, Hydratation, Veränderungen des Zeta-Potential und hitze-induzierte Veränderungen der Milchsätze (Dephosphorylierung, Calcium-Präzipitation) [Fox, 1982; O'Connell und Fox, 2003]. Diese physikalisch chemischen Veränderungen (wie Dissoziation der Caseinmicellefraktionen aus der Caseinmicelle, Bildung von Quervernetzungsreaktionen, Zunahme des Serumbindevermögens, Zunahme der Voluminosität usw.) sind bisher kaum quantifiziert wurden, sollen in dieser Arbeit ausführlich untersucht werden.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, auf einer Seite die Untersuchung der hitzebedingten Veränderungen an den Caseinmicellen und auf der anderen Seite die käseereitechnologischen Eigenschaften anhand der Labgelbildungseigenschaften der Mikrofiltrationsretentate (Proteinkonzentration 3,2 %) bzw. Ultrafiltrationsretentate (Proteinkonzentration 6,4 %) sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit der Molkenproteine in Abhängigkeit von den Erhitzungsbedingungen sowie unterschiedlichen Casein / Molkenproteinverhältnissen zu untersuchen. Im ersten Abschnitt der Arbeit wird auf den Einfluss der UHT-Erhitzung auf die Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Mikrofiltrationsretentate ohne Molkenproteine eingegangen.

#### 3.1 Hitzestabilität der Caseinlösungen

Die rheologischen Eigenschaften der Milchgele sind die wichtigsten Kriterien zur Charakterisierung der Gele. Dynamische Messmethoden sind am besten geeignet, um die viskoelastischen Eigenschaften zu charakterisieren. Während des Labgelbildungsprozesses der Milch werden 3 wichtige Messgrößen, der Speichermodul ( $G'$ : Elastizität), Verlustmodul ( $G''$ : Viskosität) und Phasenverschiebungswinkel ( $\delta$ : Umwandlung einer Flüssigkeit zu einem Gel) ermittelt.

Mittels Oszillationsrheologie ist es möglich, sowohl die Gerinnungszeit als auch die Gelfestigkeit eines Labgeles gleichzeitig zu erfassen. Zur Ermittlung der Koagulationszeit wurde bei den durchgeführten Versuchen in Anlehnung an Untersuchungen von Walsh-O'Grady et al. [2001], Srinivasan et al. [2002] und Lucey [2002] die Zeit berechnet, bei der der Speichermodul  $G' > 1$  Pa erreichte. Die Gelfestigkeit wurde dabei über die Oszillationszeit des Speichermoduls nach 60 min ermittelt.

In Bild 3.1 ist die Gerinnungszeit der Caseindispersion (3 % Casein) in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit bei 120 °C dargestellt. Bei dieser Temperatur ist schon nach kurzen Haltezeiten ein extremer Anstieg der Gerinnungszeit zu sehen. Für Erhitzungszeit von 150 s der Anstieg der Gerinnungszeit ist erheblich höher.

Die Festigkeit der Labgallerten nimmt trotz Abwesenheit von Molkenproteinen ab, wie schon in der Arbeit von Schreiber [2000, 2001] festgestellt wurde. Die Abnahme der Gelfestigkeit war umso ausgeprägter, je länger die Erhitzungszeit war. So lag bei 120 °C für 150 s Haltezeit eine Labgelfestigkeit von 35 Pa vor, während das Speichermodul bei nicht erhitzten Caseinlösungen bei 150 Pa liegt.

Aus diesen Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass es sich um Veränderungen der Labgelbildungseigenschaften handelt, denn die Molkenproteine waren zuvor abgetrennt worden. Sie kommen also nicht als Erklärungsansatz für die Beobachtungen in Frage.

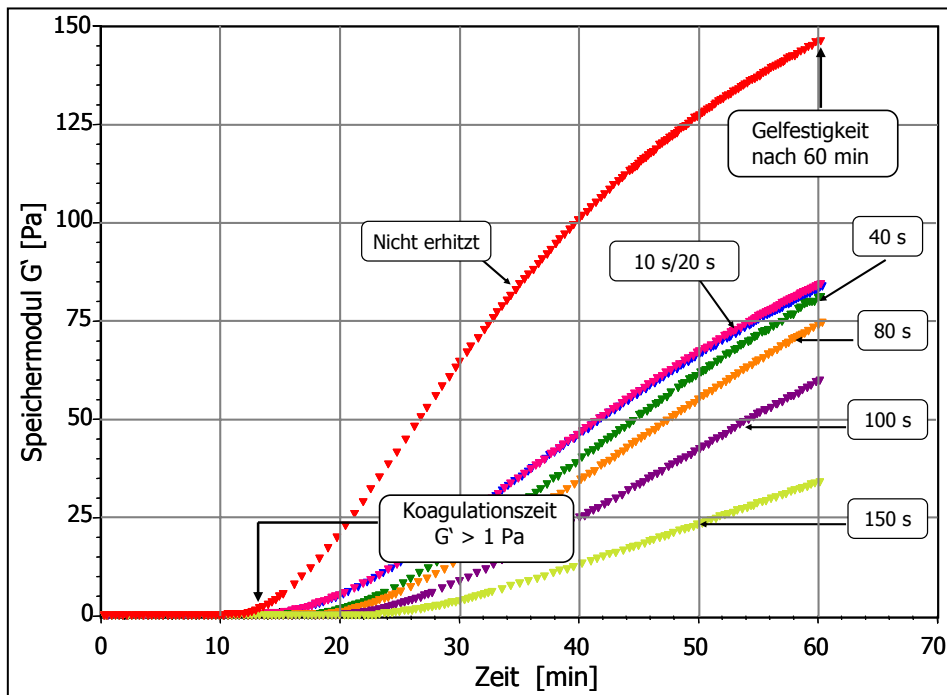


Bild 3.1: Verlauf des Speichermoduls  $G'$  eingelabter Caseinlösungen (3 % Protein) nach einer Hitzebehandlung bei 120 °C bei unterschiedlichen Haltezeiten.

Die kinetischen Untersuchungen der Labgelbildungseigenschaften der Labgele (Koagulationszeit und Gelfestigkeit) aus erhitzten Caseinlösungen haben gezeigt, dass es sich um eine Aktivierungsenergie von 143 kJ/mol für relative Gerinnungszeit und eine  $E_A$  von 68,6 kJ/mol für die relative Gelfestigkeit handelt, was ein Hinweis auf chemische Reaktionen ist, die offenbar die Veränderungen herbeiführen.

Diese Beobachtungen sind ausführlich in der Publikation Wang, Bulca und Kulozik [2007] im Anhang dargestellt.

### 3.2 Untersuchung der hitzebedingten Veränderungen an oder in der Caseinmicellen

Wie oben dargestellt verschlechtern sich die Labgelbildungseigenschaften erhitzter Caseinlösungen auch bei vollständiger Entfernung der Molkenproteine. Daher wurde in dieser Arbeit weiter mit molkenproteinfreien Caseinlösungen gearbeitet und der Einfluss der Erhitzung auf der Caseinmicellen untersucht. Anhand der strukturellen und molekularen Untersuchungen sollten diejenigen thermischen Veränderungen in oder auf den Caseinmicellen identifiziert werden, die mit dem Labgelbildungsmechanismus in Verbindung stehen können. Es wurden folgende chemisch-physikalischen Nachweismethoden eingesetzt: Ultraschall, NMR (nuclear magnetic resonance), Gelpermeationschromatographie, SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis), Analyse der Oberflächenhydrophobizität mittels ANS (1-Anilino-8-Naphtalene-Sulfonate), Analyse des Serumbindevermögens und der Voluminosität der Caseinmicellen. Zusätzlich wurden die käsereitechnologischen Eigenschaften des Produktes untersucht, die mit den Labgelbildungseigenschaften der Caseinmicellen in engem Zusammenhang stehen. Es wurden

die Labgelbildungseigenschaften der Mikrofiltrationsretentate bzw. Ultrafiltrationsretentate infolge einer Erhitzung studiert.

### 3.2.1 Untersuchung der Veränderungen in der Calciumverteilung

Calcium kommt in Milch in unterschiedlichen Formen vor. Calcium liegt in der Milch bei 20 °C zu etwa 60 % kolloidal dispergiert an Proteine gebunden und zu 40 % echt gelöst in ionischer und komplexierter Form vor. Bei 4 °C beträgt das Verhältnis von kolloidalem zu echt gelöstem Calcium etwa 1:1 [Schlimme, 1990]. Die Wechselwirkungen zwischen Casein und Calciumionen bzw. Calciumsalzen wie Calciumphosphat und -citrat sind für die Bildung und Stabilität der Caseinmicellen von Bedeutung. Calcium bindet vor allem an den Phosphoserinresten der Caseine [Swaisgood, 1993]. Die Aggregation von kolloidalem Calciumphosphat wird als ein wichtiger Stabilitätsfaktor der Caseinmicellen der Milch angesehen.

Die wichtigste Reaktion während der Erhitzung ist, dass gelöstes Calcium und Phosphat teilweise in eine unlösliche Form als Präzipitat oder Hydroxylapatit umgewandelt werden und diese zu einem großen Teil mit den Caseinmicellen assoziieren. Gleichung 1 und 2 zeigen den Reaktionsverlauf zur Bildung von kolloidalem Calciumphosphat, welcher bei der Erhitzung von Milch stattfindet [Walstra, 1999]. Dabei werden Wasserstoffionen frei, die den pH-Wert der Milch absenken [Mohammad und Fox, 1987].



Es wurde die Calciumverteilung der Caseinmicellsuspension nach der Erhitzung betrachtet. Die Caseindispersionen wurden nach der Hitzebehandlung 110 bis 140 °C bei unterschiedlichen Haltezeiten bei 100.000 g, 20 °C und 1 Stunde ultrazentrifugiert. Danach wurde der Calciumgehalt in der Serumphase mittels Flammenphotometer gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass bei Erhitzungstemperaturen von 140 °C und Haltezeiten bis zu 10 min keine Veränderungen in der Calciumverteilung zu bestimmen waren. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schreiber [2000], die auch bei 140 °C nach 5 Minuten keine Veränderungen in der Calciumverteilung festgestellt hat. Wurden jedoch die Untersuchungen in caseinmicellenfreiem UF-Permeat durchgeführt, so zeigte sich eine signifikante Abnahme des löslichen Calciums mit steigender Hitzeintensität. Nach Schreiber [2000] finden offenbar Austauschvorgänge des Calciums zwischen dem Serum und der micellaren Phase statt. Diese Vorgänge führen zwar zu einer unveränderten Konzentration an löslichem Calcium, beeinflussen jedoch entscheidend die strukturelle Integrität der Caseinmicelle und damit auch deren Fähigkeit zur Labgelbildung. Neben diesen Ergebnissen können die folgende Effekte auch auf die Labgelbildung der erhitzten Caseinlösungen Einwirkungen haben: Quervernetzungsreaktionen zwischen der Caseinfraktionen, hitzebedingte Dissoziation der Caseinfraktionen, Veränderungen der

Oberflächenhydrophobizität, Veränderungen des Serumbindevermögens, Veränderungen der Voluminosität.

### **3.2.2 Untersuchungen mit niederenergetischem Ultraschall**

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die niederenergetische Ultraschalltechnik ergänzend zu etablierten Verfahren zur Untersuchung der Labgelbildung eignet. Niederenergetischer Ultraschall zeichnet sich als eine zerstörungsfreie Messmethode zur Charakterisierung der Produkteigenschaften aus. Es ist möglich, die enzymatischen Reaktionen über die Zunahme der Schallgeschwindigkeit- und Schalldämpfungsdifferenz genau zu verfolgen. Sowohl die Ergebnisse der Ultraschallmessmethode als auch die Ergebnisse der Oszillationsrheologie zeigen, dass eine UHT-Erhitzung den Koagulationprozeß verzögert und die Gelfestigkeit verringert. Im Gegensatz zu der rheologischen Methode, die nicht ausreichend empfindlich ist, um die enzymatische Abspaltung von Caseinomacropeptid (CMP) am  $\kappa$ -Casein zu detektieren, kann die Ultraschallmethode sowohl die enzymatische Phase als auch die Aggregationsphase hervorragend verfolgen. Eine lineare Korrelation besteht zwischen den Messungen der Koagulationszeiten, die durch die Oszillationsrheologie und Ultraschall festgestellt wird. Jedoch sind die Koagulationszeiten unterschiedlich, die durch diese zwei Methoden gemessen wurden. Das Wachstum der Aggregate zu einem dreidimensionalen Caseinnetzwerk kann durch Kompressionsultraschall schwer ermittelt werden. Im Gegensatz zu Aggregation es ist nicht möglich, mittels Ultraschall die Gelfestigkeit genau zu bestimmen, weil die Phasenumwandlung von Sol zu Gel (Aggregate zu Netzwerk) nur zu sehr geringer Veränderungen in der Schallgeschwindigkeit im Vergleich zu der enzymatischen Spaltung und der Aggregation zu größeren Partikeln führt. Für die Charakterisierung des gebildeten Gels sind die rheologischen Messungen empfindlicher als die Ultraschall-Messungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Ultraschall eine geeignete Methode ist, um den gesamten Labgelbildungsprozess zu charakterisieren. Wegen seiner on-line-Anwendbarkeit hat die Ultraschallmethode ein hohes Potential, um den Labgelbildungsprozess während der Käseherstellung zu kontrollieren.

Diese Beobachtungen sind ausführlich in der Publikation Wang, Bulca und Kulozik [2007] im Anhang dargestellt.

### **3.2.3 Untersuchungen mit NMR (Nuclear Magnetic Resonance) zur Wassermobilität**

Die Auswirkungen der UHT-Erhitzung auf die Wasserbindungsverhältnisse wurden durch Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung) erfasst. Die Versuche wurden durchgeführt, um herauszufinden wie sich das Serumbindevermögen bzw. Wassermobilität im Labgel, die aus erhitzten Caseinlösungen hergestellt wurden und in fermentierten Milchprodukten, z. B. Joghurt, ändern. Es wurde festgestellt, dass deutliche Veränderungen in der Wasser-Mobilität bei der Säurebildung bzw. Fermentation stattfinden, wohingegen keine Veränderungen in der

Wasser-Mobilität bei der Labgelbildung der aus erhitzter Caseinlösungen gewonnene Labgelen beobachtet wurden. Das könnte durch den unterschiedlichen Koagulationsmechanismus während der Labgelbildung oder Säure bildenden Fermentation erklärt werden.

Die Ergebnisse dazu sind in der Publikation Hinrichs, Bulca und Kulozik [2007] im Anhang dargestellt.

### 3.2.4 Untersuchung des Polymerisationsgrads zwischen der Caseinfraktionen

In diesem Teil der Arbeit wurden hitzeinduzierte Polymerisationsreaktionen (Quervernetzungsreaktionen) zwischen den Caseinfraktionen untersucht. Die Hypothese ist, dass zwischen den Caseinfraktionen durch Erhitzung auftretende Polymerisationsreaktionen und daraus entstehende Polymersationsprodukte eine sterische oder elektrostatische Barriere während des Labgelbildungsprozesses darstellen können, welche zur Verlängerung der Koagulationszeit und zur abnehmenden Gelfestigkeit führen. In Bild 3.2 ist zu erkennen, dass sich mit steigender Temperatur und Heißhaltezeit mehr Dimere, Trimere und Oligomere bilden. Im Bild 3.3 ist der Polymerisationsgrad von Caseinlösungen (3 % Protein) dargestellt. Abhängig von der Erhitzungsintensität nimmt der Polymerisationsgrad von 6-7 % der bei der nicht erhitzten Probe bis auf 54 % nach einer Erhitzung bei 145 °C für 200 s Haltezeit zu. Es handelt sich dabei um eine lineare Zunahme der Polymerisationsprodukte mit steigender Temperaturintensität. Bei konstanter Gesamtfläche erlauben die Chromatogramme über die Abnahme der relativen Flächen des Monomeren eine Aussage über den Polymerisationsgrad. Die Berechnung des Polymerisationsgrads erfolgte nach der Gleichung 3.

$$PG[\%] = \frac{\sum A[\text{Dimere, Trimere, Polymere}]}{\sum A[\text{Monomere, Dimere, Trimere, Polymere}]} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 3}$$

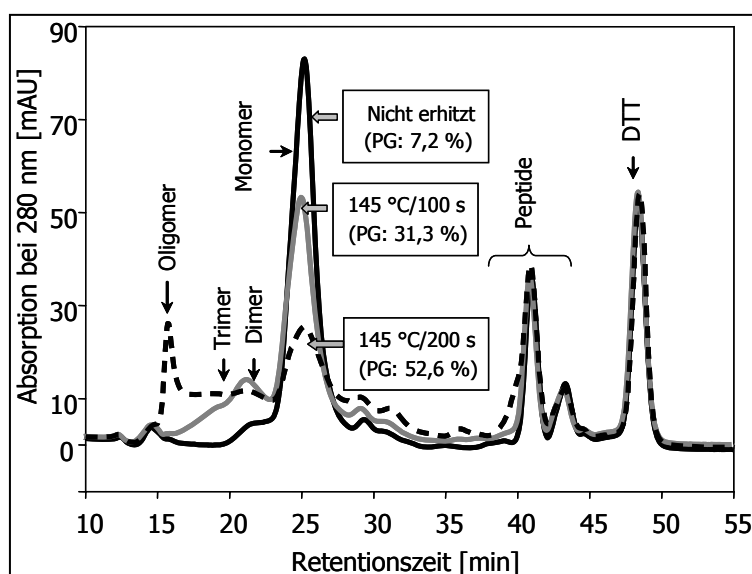


Bild 3.2: Gelpermeationschromatographie der erhitzten und nicht erhitzten Caseinlösungen

In seinen Untersuchungen konnte Walter [1995] zeigen, dass eine hitzeinduzierte Bildung von Polymerisationsprodukten (LAL und HAL in  $\beta$ -Caseinlösungen) fast ausschließlich intermolekular abläuft. Diese Ergebnisse können für Anwendungen von UHT-behandelten Caseinlösungen Konsequenzen haben. Wenn man sie von der Seite des Labelbildungsprozesses her betrachtet, könnten diese Produkte eine sterische oder elektrostatische Barriere während der Labelbildungsphase darstellen. Das bedeutet, dass diese entstandenen Polymerisationsprodukte die Aggregation sowie enzymatische Abspaltungsphase oder die beiden Phasen verlängern. Anhand der Ergebnisse konnte eine Korrelation zwischen Koagulationszeit und dem Polymerisationsgrad von 83 % sowie zwischen der Gelfestigkeit und dem Polymerisationsgrad von 93 % festgestellt werden. So konnte erklärt werden, dass der steigende Polymerisationsgrad für die Verschlechterung der Labelbildungseigenschaften verantwortlich sein kann.

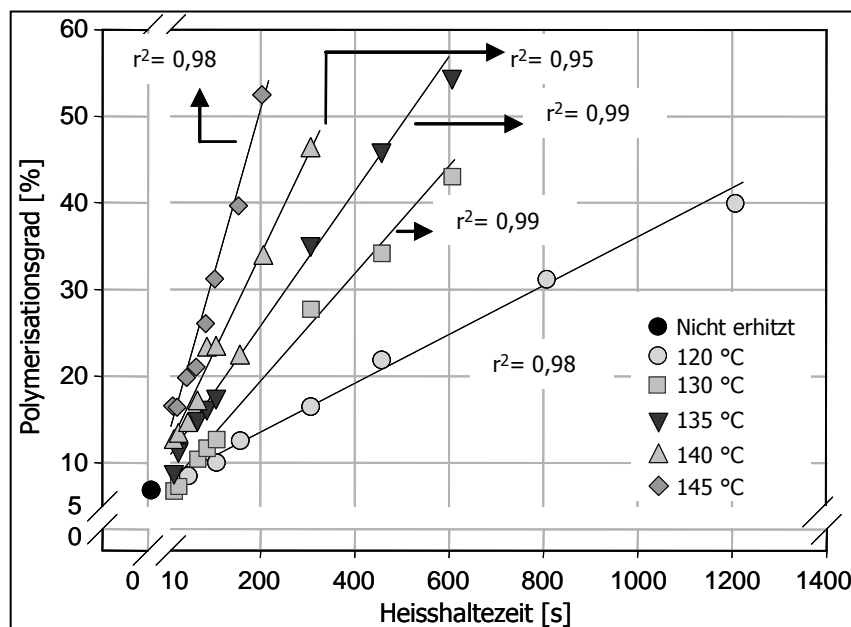


Bild 3.3: Polymerisationsgrad erhitzter Caseinlösung mit 3 % Proteinkonzentration in Abhängigkeit von Erhitzungsbedingungen

Diese Beobachtungen sind ausführlich in der Publikation Bulca, Tolkach, Leder und Kulozik im Anhang dargestellt.

### 3.2.5 Hitzebedingte Dissoziation von Caseinfraktionen

Trotz der Stabilität der Caseinmicelle finden auch hitzebedingte Dissoziationsreaktionen statt. Bei ihren Untersuchungen haben Aoki et al. [1974], Kudo [1980] und Singh und Fox [1985] festgestellt, dass eine Erhitzung auf Temperaturen über 100 °C zur  $\kappa$ -Casein-Dissoziation der Milch führt. Unkonzentrierte Milch bei pH 6,7 kann einer Erhitzung von 140 °C bis zu 20 min ausgesetzt werden, bis sie koaguliert [Singh und Fox, 1989]. Wie Tomotada et al. [1999] berichten, werden 4 % der micellaren Proteine freigesetzt, wenn die Caseine bei 120 °C erhitzt werden. Die freigesetzten Proteine wurden als  $\beta$ -,  $\alpha_S$ - und  $\kappa$ -Caseine

identifiziert. Abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, dem Gehalt an  $\beta$ -LG, der Ionenstärke und der Konzentration an löslichem Calcium und Phosphat dissoziiert vor allem  $\kappa$ -Casein aus der Micelle [Singh, 1995].

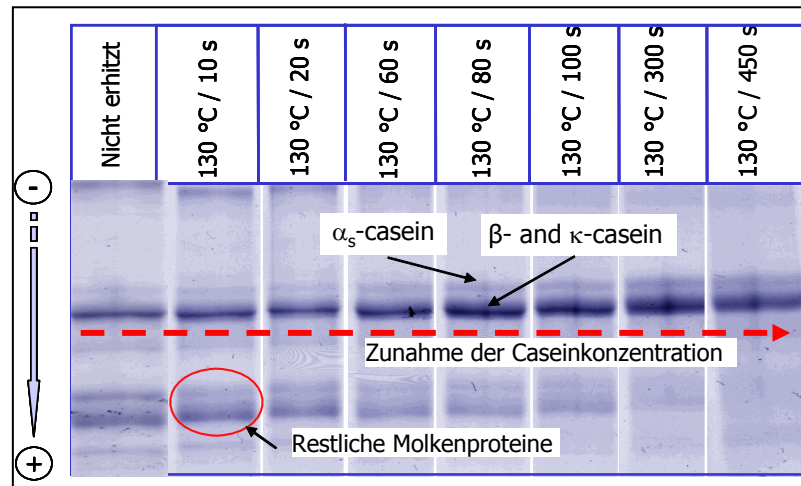


Bild 3.4: Gelelektrophorese Gel zur Identifizierung der dissoziierten Caseinfraktionen (Die Restmenge der Molkenproteine lag bei 0,02 %, war also um 96 % reduziert)

Es ist aus der SDS-PAGE zu entnehmen, dass die Konzentration bzw. die Intensität der einzelnen Banden ( $\alpha$ - $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein) zunimmt, je höher die Heißhaltezeit ist. Das bedeutet, dass während der Erhitzung die einzelnen Caseinfraktionen aus der Caseinmicellen in die Serumphase dissoziieren. In Bild 3.5 sind die relativen Gehalte der  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein-Dissoziationen dargestellt. Es wurde dabei die optische Dichte der Banden auf dem Gel der in die Serumphase dissoziierten erhitzten Caseinlösungen durch die optische Dichte der in die Serumphase dissoziierten nativen Caseinlösungen dividiert. Wie zu sehen ist, steigt die Menge der genannten Caseinfraktionen bis auf das 27-28 fache an.

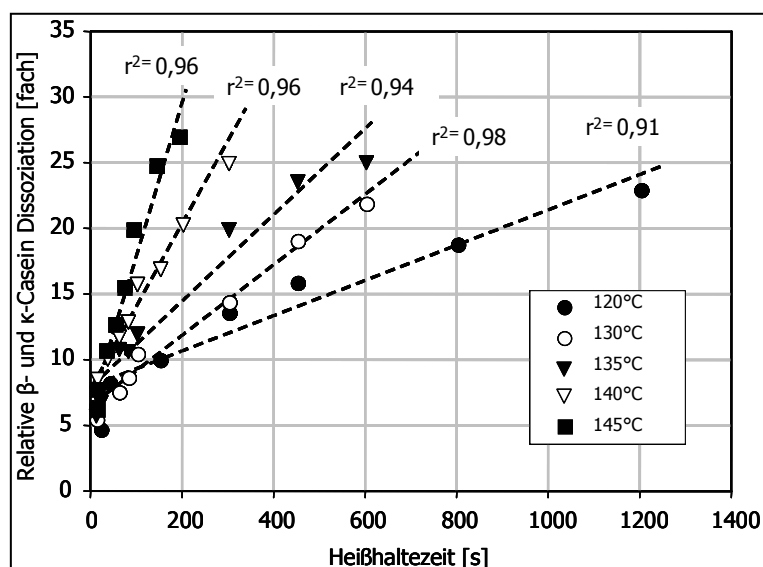


Bild 3.5: Relative  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein-Dissoziation aus der Micelle in die Serumphase bei der Hitzebehandlung zwischen 120 und 145 °C bei verschiedenen Haltezeiten.



Auf gleiche Weise wurde die Dissoziation von  $\alpha_S$ -Casein aus der SDS-PAGE Bildern ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass die  $\alpha_S$ -Casein-Dissoziation von 7 bis auf das 35 fache zunimmt.

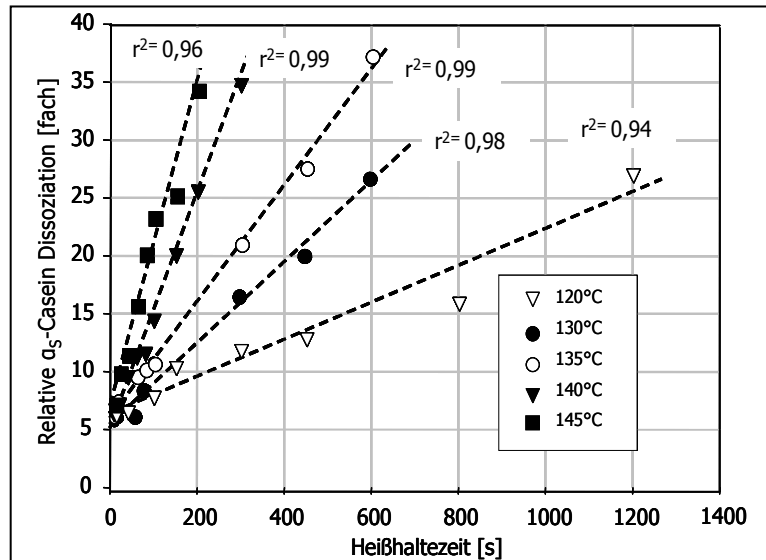


Bild 3.6: Relative  $\alpha_S$ -Casein-Dissoziation aus der Micelle in die Serumphase bei der Hitzebehandlung zwischen 120 und 145 °C bei verschiedenen Haltezeiten.

Aus diesen Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass eine Erhitzung zur Zunahme des Caseingehaltes in der Serumphase führt. Mit steigender Temperaturintensität steigt die Zunahme der dissoziierten Caseinfractionen in die Serumphase an. Auf diese Weise kann die Micellenzusammensetzung stark beeinflusst werden, welche nicht mehr im nativen kolloidalen Zustand mehr vorliegt. Wie schon bekannt, ist  $\kappa$ -Casein prinzipiell ein stabilisierender Faktor der Caseinmicelle und verantwortlich für die kolloidale Stabilität. Wenn eine 25%’ige Konzentration an  $\kappa$ -Casein in die Serumphase dissoziiert, geht die Schutzwirkung des  $\kappa$ -Caseins für die der Caseinmicelle verloren. Das bedeutet, dass die Caseinmicelle destabilisiert wird. Die micellare Struktur kann nach Hitzebehandlung gelöst werden. Die Erhitzung der Milch schwächt anscheinend die Wechselwirkungen zwischen Caseinfractionen sich aus dem Micellengerüst lösen können. Auf der anderen Seite haben Storry et al. [1983] und Van Hekken & Holsinger [2000] beobachtet, dass die Labelbildungseigenschaften nicht nur von der Caseinkonzentration, aber auch von dem Anteil des  $\alpha_S$ - bzw.  $\beta$ -Caseins in der Milch abhängig sind. Dies bedeutet, dass die genannten Caseinfractionen sowohl für den Zusammenhalt der Micelle als auch für die Labelbildungseigenschaften genauso wichtig sind wie  $\kappa$ -Casein.

Auf diese Ergebnisse hin wurde die Frage gestellt werden, ob eine Korrelation zwischen der Casein-Dissoziation und Labelbildungseigenschaften der erhitzten Caseinlösungen besteht. Es konnte festgestellt werden, dass eine niedrige, aber signifikante Korrelation (ca. 70 %) zwischen den Labelbildungseigenschaften der Caseinlösungen und der Dissoziation der

einzelnen Micellen besteht. Das bedeutet, dass für die Verschlechterung der Labgelbildungseigenschaften der Caseinmicellen nicht nur die Dissoziation, sondern weitere, unten genannte hitzebedingte Veränderungen verantwortlich sein müssen.

### 3.2.6 Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität

Nach Cheftel et al. [1992] besitzen Caseine eine hohe Gesamthydrophobizität. Weiter wird angenommen, dass die hydrophilen und hydrophoben Bereiche in der Aminosäuresequenz deutlich getrennt voneinander vorliegen. Nach dem von Horne [1998] entwickelten Caseinmodell werden die Micellen durch zwei Bindungsmechanismen stabilisiert. Die Oberflächenhydrophobizität stellt als potentieller Indikator für strukturelle Veränderungen an micellarem Casein dar. Diese sind zum einen hydrophobe Wechselwirkungen und zum anderen kolloidale Calciumphosphat-Brücken. Untersuchungen von Van Vliet et al. [1989] bestätigen, dass hydrophobe Interaktionen für den hydrophoben Charakter der Caseinmoleküle verantwortlich und diese Interaktionen auch in Labcaseingelen als dominierende Kräfte anzusehen sind. Guo et al. [1996] haben in ihren Untersuchungen Natrium-Caseinat Hitze behandelt und eine Abnahme der Oberflächenhydrophobizität festgestellt. Sie behaupten, dass aufgrund der Zerstörung der hydrophoben Aminosäurereste (z. B. Tryptophan mit ihren aromatischen Seitenketten relativ unpolar und hydrophob) durch Erhitzung die Bildung der hydrophilen Gruppen ( $-NH_3^+$ ,  $-COO^-$ ), eine hitzeinduzierte Proteinhydrolyse und die Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Stellen der Aminosäuren gefördert wird. Das verursacht aufgrund der strukturellen Veränderungen während der Erhitzung eine schwache Affinität zu ANS.

Von diesem Hintergrund war Ziel dieser Untersuchung, Veränderungen der Oberflächenhydrophobizität von Caseinmicellen als Folge von Hitzebehandlung zu detektieren und zu klären, inwiefern dies den Koagulationsmechanismus beeinflussen kann. Die Oberflächenhydrophobizität stellt ein Maß dafür dar, wie die strukturelle Stabilität der Konformation durch Hitze verändert wird. Durch die Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität könnten mögliche irreversible Veränderungen in der sekundären oder tertiären Struktur der Caseinmicelle festgestellt werden.

Zur Untersuchung der Caseinmicelle wurde die Methode von Nakai und Li-Chan [1988] angewandt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche mit dem fluoreszierenden Farbstoff ANS (1-Anilino-8-Naphtalene-Sulfonate) bedeckt werden und anschließend die Fluoreszenz der Proteinlösung mittels Fluoreszenzspektrometer gemessen wird.

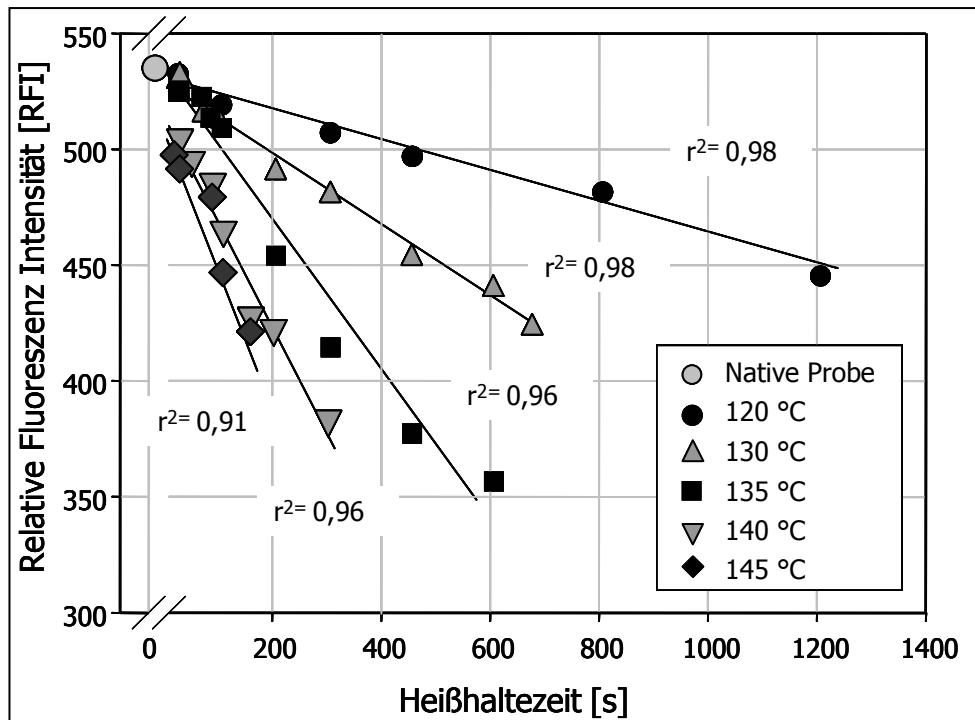


Bild 3.7: Oberflächenhydrophobizität der Caseinmicelle in Abhängigkeit von Erhitzungsbedingungen

Aus Bild 3.7 ist zu entnehmen, dass bei der nativen Probe die Fluoreszenzintensität  $S_0$  bei einem Wert von  $RFI=540$  liegt. Mit steigender Temperatur bei  $120\text{ °C}$  nach einer Haltezeit von  $1200\text{ s}$  sinkt diese auf  $RFI=450$  bzw. bei  $145\text{ °C}$  nach einer Heißhaltezeit  $300\text{ s}$  auf  $RFI=380$  ab. Dies deutet klar auf eine Abnahme der Oberflächenhydrophobizität der Caseinmicelle hin. Diese Abnahme der Oberflächenhydrophobizität infolge einer Erhitzung kann die Labgeigenschaften der Caseinmicelle beeinflussen.

Allerdings besteht eine Korrelation zwischen Labgelbildungseigenschaften und Veränderung der Oberflächenhydrophobizität von weniger als  $44\%$ . Für die Verschlechterung der Labgelbildungseigenschaften der Caseinmicellen kann also nicht die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität allein, sondern weitere, unten genannte hitzebedingte Veränderungen verantwortlich sein.

### 3.2.7 Analyse des Serumbindevermögens

Um den Einfluss der Erhitzung auf die Caseinmicellen zu untersuchen, wurde das Serumbindevermögen von Labgelen, die aus erhitzten und nicht erhitzten Caseindispersionen hergestellt wurden, miteinander verglichen. Dabei wurden die Erhitzungsbedingungen bewusst hoch gewählt, um eventuelle Effekte, die eine Veränderung des Serumbindevermögens induzieren zu können, deutlich werden zu lassen. Bei der Beurteilung der Labgelbildungseigenschaften des Labgeles spielt Wasser eine wichtige Rolle und beeinflusst während des Käseherstellungsprozesses die Eigenschaften wie Feuchtigkeitsgehalt und strukturelle Attribute des Käses. Eine gezielte Kontrolle des Feuchtigkeitsgehaltes von

Käse ist erforderlich, um gewünschte Eigenschaften (Festigkeit des Käses sowie rheologische Eigenschaften) im Käse herzustellen.

Im Rahmen dieses Versuches sollten zunächst die strukturellen Veränderungen der Caseinmicellen nach der UHT-Erhitzung hinsichtlich des Serumbindevermögens untersucht werden, also unabhängig von der Käsematrix.

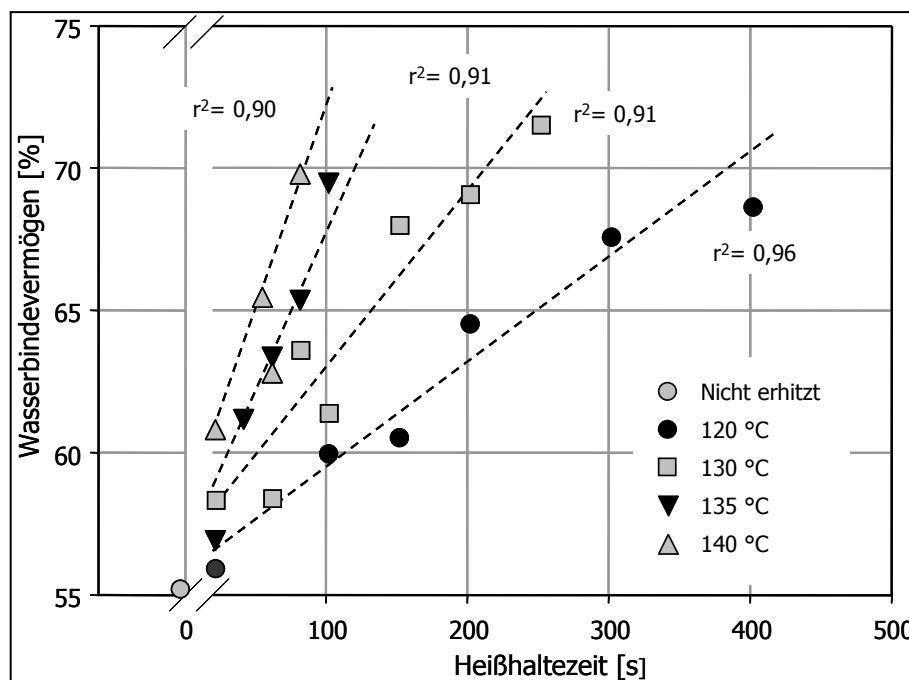


Bild 3.8: Das Serumbindevermögen erhitzter Caseinsuspensionen in Abhängigkeit von Temperatur und Heißhaltezeit

Im Bild 3.8 ist das Serumbindevermögen der aus Caseinlösungen hergestellten Labgelwürfel in Abhängigkeit von der Heißhaltezeit der Caseinausgangslösung vor der Labzugabe aufgetragen. Die Untersuchungen wurden nach der Methode Huber et al. [2001] durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass das Serumbindevermögen umso größer ist, je höher die Erhitzungstemperaturen und je länger die Heißhaltezeiten waren. Das Labgel, das aus nicht erhitzten Caseinlösungen hergestellt wurde (Blindprobe), weist ein Serumbindevermögen von 55 % auf, während bei einer Erhitzung bei 120 °C für 450 s Heißhaltezeit ein Serumbindevermögen des Labgels von 68 % erreicht wird. Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn die Labgele aus bei 140 °C für 80 s erhitzten Caseinlösungen hergestellt wurden. Auch hier wird ein erhöhtes Serumbindevermögen von bis zu 70 % erzielt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Oberflächenhydrophobizität und Zunahme des Serumbindevermögens gibt. Durch die Erhitzung werden die hydrophoben Aminosäuren hydrophiler, welche zur Zunahme des Serumbindevermögens führt.

Die Wassermobilität der Labgele aus erhitzten Caseinlösungen wurde von Hinrichs et al. [2007] mittels NMR (Kernspinresonanz) gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass es

bezüglich der Wassermobilität keinen Unterschied zwischen den Labgelen gibt, die aus erhitzter und nicht erhitzter Caseinlösungen hergestellt sind.

Die komplette Arbeit ist in der Publikation Hinrichs, Bulca, Kulozik [2007] im Anhang dargestellt.

Aus den Ergebnissen lässt sich eine Korrelation zwischen Labgelbildungseigenschaften und Serumbindevermögen weniger als 50 % ableiten.

Bis jetzt wurde gezeigt, dass die native Micellenstruktur durch Dissoziation, d.h. durch Freisetzung von Caseinmonomeren, aber auch durch intrazelluläre Polymerisationsreaktionen, Abnahme der Oberflächenhydrophobizität, Zunahme des Serumbindevermögens sowie eine starke veränderte Labgelfähigkeit auf eine komplexe Weise reagiert. Weiterführend wurde untersucht, ob sich eine thermische Behandlung auf das Volumen der Caseinmicelle auswirkt, um mittels eines weiteren chemisch-physikalischen Kriteriums das veränderte technologische Verhalten der Caseinmicellen zu erklären. Daher wurde die Veränderungen der Viskosität bzw. Voluminosität der Caseinmicellen mittels Kapillarviskosimeter untersucht.

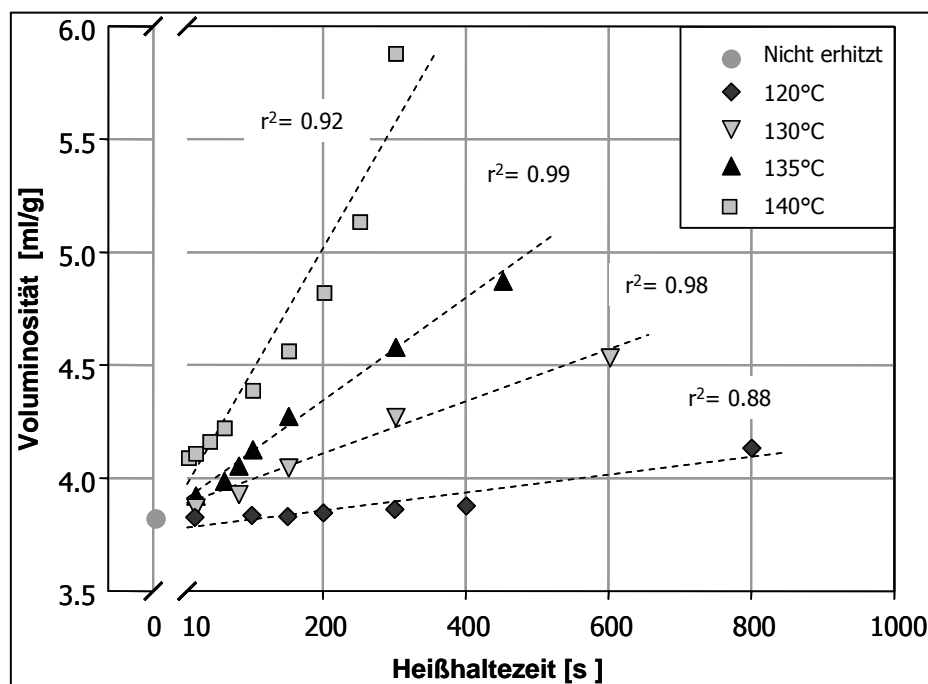


Bild 3.9: Die Veränderung der Voluminosität nach der Hitzebehandlung der Caseinlösungen Heißhaltezeit

In Bild 3.9 ist die Voluminosität der Caseinmicellen gegen Heißhaltezeit aufgetragen. Wie aus dem Bild zu entnehmen ist, dass die Voluminosität der Caseinmicelle in Abhängigkeit von den  $v/t$ -Bedingungen, die auf die Micelle eingewirkt haben, zunimmt. Wie zu erkennen, steigt die Voluminosität im Vergleich zur nativen Micelle an. Das Ausmaß des Ausstiegs ist umso größer, je länger die Erhitzungszeit und je höher die Temperatur waren.

Aus dieser Untersuchung ergibt sich ein weiterer Beleg für die Hitzeinstabilität der Caseinmicelle im Hoherhitzungs- bzw. UHT-Bereich. Eine 60%ige Korrelation besteht

zwischen der Labgelbildungseigenschaften und der Veränderungen der Voluminosität. Es konnte schlussfolgern, dass nicht die eine einzelne Veränderung an der Caseinmicelle sondern eine Kombination der mehreren Veränderungen für die Verschlechterung der Labgelbildungseigenschaften verantwortlich sein kann

Dies kann im Kontext mit bereits genannten Untersuchungsdaten zum Einfluss thermisch-bedingter Reaktionen auf die Caseinmicelle dazu genutzt werden, um technologisch relevante Veränderungen wie Labgelfähigkeit oder Gelbildungsverhalten ursächlich zu deuten bzw. zu erklären.

Im Vergleich zu früheren Erkenntnissen aus den Jahren 1980-1990, die sich aus Arbeiten mit Milch ergaben, gelten die hier dargestellten Ergebnisse für die native Caseinmicelle, dem zuvor die überaus hitzesensitiven Molkenproteine entzogen wurden. Eine Überlagerung von Effekten aus den verschiedenen Hauptfraktionen ist also ausgeschlossen.

### **3.2.8 Einfluss der Ionenstärke und des Caseingehaltes auf die Labgelbildungseigenschaften erhitzter Caseinlösungen**

Die Labkoagulation der Milch wird nicht nur durch die  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe, sondern auch durch Phosphatzugabe, pH, ionische Stärke und Temperatur beeinflusst [Zittle et al. 1970, Yamauchi et al. 1977]. Wie schon erklärt, sinkt die Ionenstärke im Milchserum während der Erhitzung durch die Ausfällung von Calciumphosphat und es steht nicht mehr ausreichend Calcium für die Vernetzung eines Labgels zur Verfügung. Eine NaCl-Zugabe in Milch führt zu einem verstärkten Übergang des Calciums und Phosphates [Grufferty et al. 1985; Van Hooydonk et al. 1986; Zoon et al. 1989, Aoki et al. 1999] von der kolloidalen Phase in die Serumphase. Dadurch wird die Ionenstärke erhöht und das Calcium durch Natriumionen ersetzt.

In der Praxis wird eine Zugabe von NaCl im Nahen Osten und in den Mittelmeer-Ländern bei der Herstellung von Domiatikäse angewendet, um den mikrobiellen und enzymatischen Verderb zu vermeiden. In der Regel wird dabei zwischen 6 und 15 % Natriumchlorid der Milch zugegeben [Ghaleb und Rashed, 1983]. In der Arbeit von Ghaleb und Rashad [1983] wurden verschiedene Methoden des Salzens bei der Herstellung von Domiati Käse untersucht. Ebenfalls haben Ramet et al. [1983] bei ihren Untersuchungen dargestellt, dass eine Zugabe von Natriumchlorid zur Milch vor der Labzugabe zu einer niedrigeren Wasseraktivität führt und somit mikrobielles Wachstum sowie auch enzymatische Proteolyse und Lipolyse inhibiert werden können.

Um den Einfluss von NaCl auf die Koagulationseigenschaften in reinen Caseinlösungen genau zu untersuchen, wurden für den Caseingehalt 2,6 bis 6,5 % und für den NaCl-Konzentrationsbereich 0,05-0,2 M festgelegt [Patel et al., 1985; Famelart et al., 1999; Gaucheron et al., 2000]. Nach der Erhitzung bei 140 °C / 10 s wurden die Caseinlösungen mit NaCl versetzt, bei 30 °C, für 1 h inkubiert und auf die Koagulationseigenschaften untersucht.

Es sollte geprüft werden, ob die Labgelbildungseigenschaften UHT-erhitzter Caseinlösungen durch NaCl-Zugabe verbessert werden können. Zu überprüfen war, ob eventuell die Ionenstärke allein einen signifikanten Effekt hat.

In Bild 3.10 sind die Linien gleicher Effekte für die relative Koagulationszeit dargestellt. Die relative Gerinnungszeit liegt bei nahezu allen Faktorkombinationen aus NaCl-Konzentration und Caseingehalt oberhalb von 1. Je höher die NaCl- und je geringer die Caseinkonzentration wird, desto länger dauert die Gerinnung. Optimal für die Labgelbildung ist eine hohe Caseinkonzentration in Kombination mit einer geringen bzw. ohne NaCl-Zugabe.

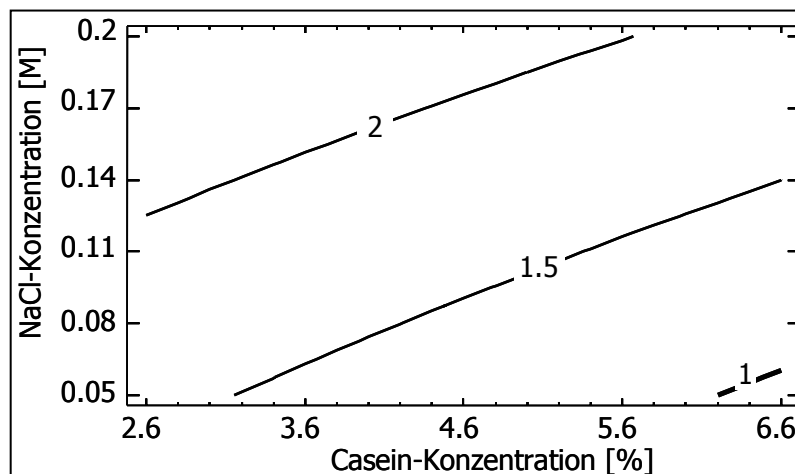


Bild 3.10: Linien gleichen Effekte der relativen Koagulationszeit erhitzter Caseindispersionen als Funktion der Casein- und NaCl-Konzentration

Die Beurteilung von Gelfestigkeit ist das zweite wichtige Beurteilungskriterium. In Bild 3.11 ist dargestellt, dass die relative Gelfestigkeit umso höher ist, je höher der Caseingehalt und je geringer die NaCl-Konzentration ist. Mit einem Caseingehalt 2,6 % entsteht unabhängig von der NaCl-Konzentration kein Gel. Im Gegensatz dazu liegt die relative Gelfestigkeit bei einer Kombination von höherem Caseingehalt und verschiedener NaCl-Konzentration zum Teil weit oberhalb von 1. Es lässt sich erkennen, dass die mittlere Caseinkonzentrationen von 4,55 % mit mittlerem NaCl-Zusatz von 0,125 M sowie hohe Caseinkonzentrationen von 6 % mit hoher NaCl-Zugabe von 0,2 M zu relativen Gelfestigkeiten von ca. 1 führten.

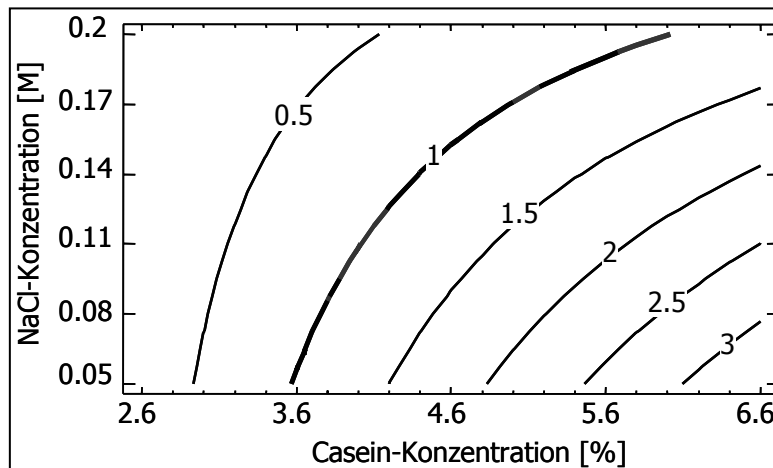


Bild 3.11: Linien gleichen Effektes für die relative Gelfestigkeit der erhitzten Caseindispersionen als Funktion der Casein- und NaCl-Konzentration

Zum Vergleich der Einflussnahme der Faktoren Caseingehalt und NaCl-Zugabe können mittels statistischer Versuchsauswertung erstellte Pareto-Diagramme herangezogen werden, welche die betrachteten Faktoren nach ihrem Einfluss ordnen (Bild 3.12). Das Diagramm sagt aus, welche Einflussfaktoren auf die Labgeleigenschaften einen signifikanten Einfluss haben sowie welche Faktoren in Wechselwirkungen stehen.

Aus Bild 3.12 geht hervor, dass für die Gerinnungszeit in erster Linie die NaCl-Konzentration und in zweiter Linie der Caseingehalt von Bedeutung ist. Dabei sind die Wechselwirkungen der beiden Faktoren (AB) eher gering. Die Gelfestigkeit hingegen ist in erster Linie vom Caseingehalt und in zweiter Linie vom NaCl-Gehalt abhängig. Allerdings sind in diesem Fall Wechselwirkungen der beiden Faktoren stärker von Bedeutung.

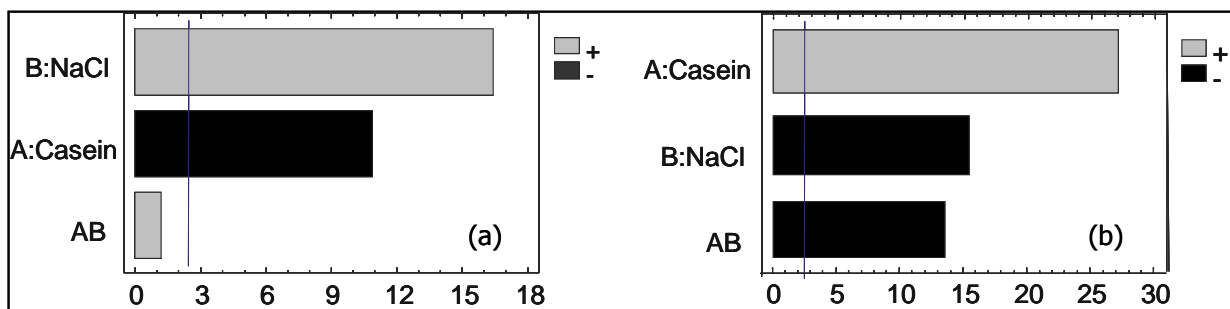


Bild 3.12: Pareto-Diagramme für die relativen Labgelbildungseigenschaften (a: relative Gerinnungszeit; b: relative Gelfestigkeit) der MF- Retentate: Einfluss von Casein- und NaCl-Konzentration

### Zusammenfassung

- Trotz der vollständigen Entfernung der Molkenproteine aus der Milch verschlechtern sich die Labgelbildungseigenschaften der Caseinmicellen unter UHT-Bedingungen
- Es wurde festgestellt, dass sich hitzesensitivitätsabhängig die molekularen und strukturellen Eigenschaften der Caseinmicellen verändern. Dadurch verändern sich die Labgelbildungseigenschaften.



- Es wurden verschiedene chemisch-physikalischen Nachweismethoden zur Untersuchungen einbezogen Ultraschall, NMR, Gelpermeationschromatographie, SDS-PAGE, Oberflächenhydrophobizität, Wasserbindevermögen und Voluminosität der Caseinmicellen. Es wurde festgestellt, dass die Polymerisationsreaktionen während der UHT-Erhitzung der Caseinmicellen auftreten, die während der Labgelbildung als eine sterische oder elektrostatische Barriere angesehen werden können. Neben Polymerisationsreaktionen dissoziieren die Caseinfraktionen aus der Micellen bei der Erhitzung in die Serumphase. Aus den Ergebnissen von Oberflächenhydrophobizität, Veränderung der Voluminosität und Veränderungen des Wasserbindevermögens konnte festgestellt werden, dass es zwischen diesen Eigenschaften ein sehr enger Zusammenhang besteht, die anschließend die Labgelbildungseigenschaften aus der erhitzten Caseinlösungen beeinflussen können. Eine Abnahme der Oberflächenhydrophobizität bedeutet, dass das Wasserbindevermögen der Labgele erhöht wird. Daraus ergibt sich, dass diese Labgele, die aus erhitzten Caseinlösungen hergestellt sind, mehr oder länger gepresst werden müssen, damit sie auch den gleichen bzw. ähnlichen Feuchtigkeitsgehalt besitzen wie die Labgele, die aus nicht erhitzter Caseinlösungen hergestellt sind.
- Eine hohe Caseinkonzentration in Kombination mit einer geringen bzw. ohne NaCl-Zugabe führt zur Verbesserung bzw. zum Erhalt der Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Caseinlösungen.

### **3.3 Effekt des UHT-Erhitzungsverfahrens auf die Proteolyse des Käses hergestellt aus molkenproteinfreier Milch**

Das Ziel dieses Versuches war es, den Effekt der unterschiedlichen UHT-Erhitzungsmethoden auf den Reifungsverlauf des daraus hergestellten Käses zu untersuchen. Die Caseinlösungen wurden direkt mit Dampf oder indirekt mit einem Röhrchen-Wärmeaustauscher bei 140 °C für 10 s erhitzt. Nach der Erhitzung wurde Käse Typ Edamer hergestellt. Die Käse wurden bei 15 °C für 28 Tage gereift. Dabei wurde der Reifungsverlauf untersucht. Mittels RP-HPLC wurden die Reifung über die Abnahme  $\beta$ - und  $\alpha_S$ -Casein analysiert.

#### **Relativer $\beta$ -Caseingehalt**

In Bild 3.13 ist der Verlauf des  $\beta$ -Caseingehalt gegen die Reifungszeit aufgetragen. Zu Beginn der Reifung gibt es keine Unterschiede zwischen den Erhitzungsverfahren nach der direkten und indirekten Methode auf die Käsereifung. Nach 5 Tagen des Reifens konnten große Unterschiede zwischen der Proteolyse der Käse, die aus direkt bzw. indirekt erhitzter Caseindispersion hergestellt wurden, beobachtet werden. Bei längerer Reifungszeit werden die Unterschiede der  $\beta$ -Casein Abbau erheblich. Nach 28 Tagen der Reifung ist der Caseinabbau in Käse, der entsprechend direkter Methode hergestellt wurde, um etwa 50 % des  $\beta$ -Casein proteolysiert, während bei der indirekten Methode um etwa 30 % des  $\beta$ -Caseins abgebaut war. Offenbar führt die Verwendung unterschiedlicher Erhitzungsverfahren zu

unterschiedlichen Abbaugraden des milcheigenen Enzyms Plasmin, welches in der Käsureifung eine wichtige Rolle spielt.

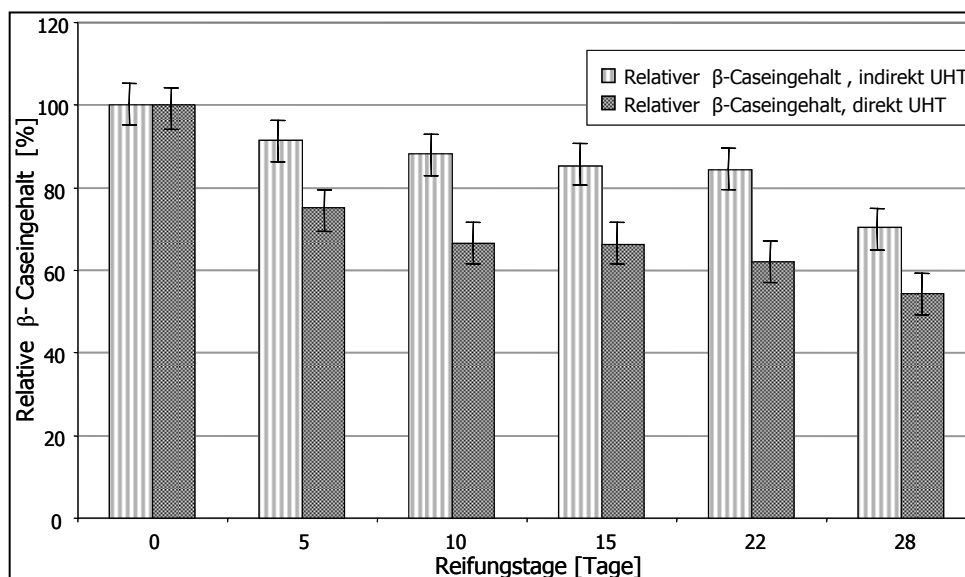


Bild 3.13: Der relative  $\beta$ -Caseingehalt während des Verlaufs der Käsureifung (Typ Edamer) hergestellt aus erhitzten Caseindispersionen bei 140 °C / 5 s Heißhaltezeit nach der indirekten und direkten Methode

### Relativer $\alpha_{S1}$ -Caseingehalt

Im Bild 3.14 ist der relative  $\alpha_S$ -Caseingehalt gegen die Reifungszeit aufgetragen. Zu Beginn der Untersuchungen gab es keine Unterschiede bezüglich des  $\alpha_S$ -Caseinabbau zwischen den beiden Methoden. Fünf Tage nach Produktion des Käses konnte ein Unterschied festgestellt werden. Nach 28 Tagen Reifungszeit wurde im Käse, dessen Ausgangsmilch direkt erhitzt wurde, 63 % des  $\alpha_S$ -Caseins abgebaut, während im Käse, welcher nach der indirekten Erhitzung hergestellt wurde, um etwa 60 % des  $\alpha_S$ -Caseins abgebaut waren. Zwischen den Beobachtungen zur Reifung von Schreiber [2000] und dieser Arbeit besteht grundsätzlich Übereinstimmung. Schreiber [2000] fand, dass nach 28 Tagen des gesamten  $\alpha_S$ -Caseins um etwa 63-65 % hydrolysiert wurde, in unseren Untersuchungen waren dies 60-63 %. Auch konnte bestätigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Erhitzungsmethoden in Bezug auf den Abbau des  $\alpha_S$ -Caseingehaltes festzustellen war.

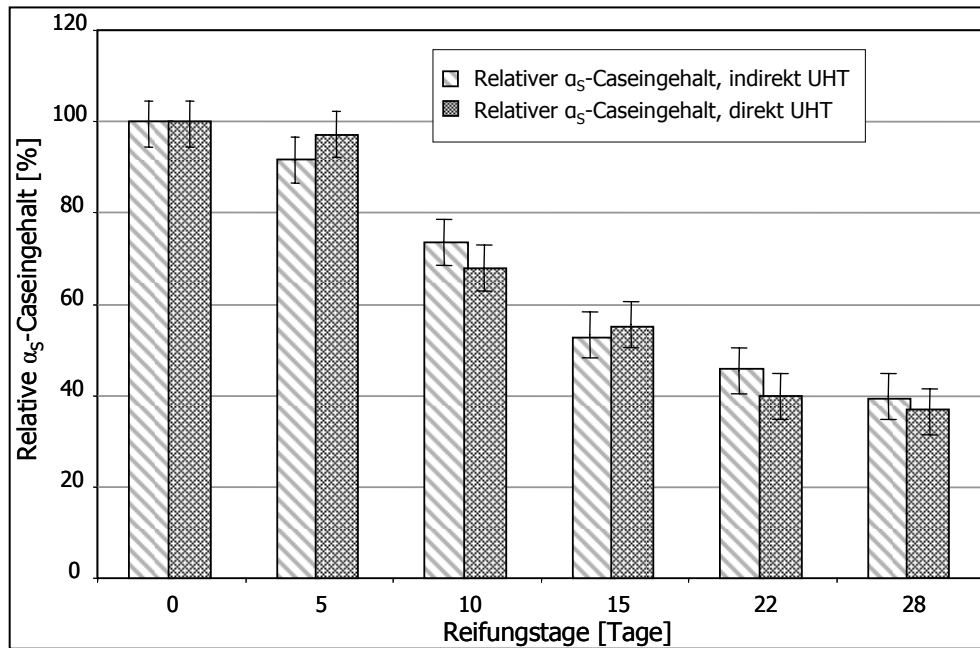


Bild 3.14: Der relative  $\alpha_S$ -Caseingehalt während des Reifungsverlaufs der Käsureifung (Typ Edamer) hergestellt aus erhitzten Caseindispersionen bei 140 °C / 5 s Heißhaltezeit nach der indirekten und direkten Methode

Wenn der Abbau  $\alpha_{S1}$ - und  $\beta$ -Casein miteinander verglichen wird, konnte festgestellt werden dass der Abbau von  $\alpha_{S1}$ -Casein schneller abläuft als von  $\beta$ -Casein. Das wurde auch von Visser und De Groot-Mostert [1977] nachgewiesen. In holländischen Käsesorten war innerhalb eines Monats etwa 80 % des  $\alpha_{S1}$ -Caseins abgebaut, während  $\beta$ -Casein wesentlich langsamer hydrolysiert, so dass nach 6 Monaten noch etwa 50 % intaktes  $\beta$ -Casein vorliegt.

#### Zusammenfassung

- Da die UHT-Erhitzungsmethode die mikrobiologische Qualität der Milch stark beeinflussen kann, wurde in diesem Abschnitt der Einfluss der UHT-Erhitzungsmethode auf die Caseinproteolyse untersucht. Es war schon aus der Literatur bekannt, dass eine direkte UHT-Erhitzung eine produktschonendere Methode als indirekte UHT-Erhitzung darstellt. Das bedeutet, dass proteolytische Enzyme bei der direkten Methode, aufgrund des schnelleren Aufwärmens und des Abkühlens sowie wegen der Verdünnung durch Kondensat aktiver blieben als nach der indirekten Methode.

### 3.4 Der Einfluss der Molkenproteine auf die Labelbildungseigenschaften bzw. auf die Käsureitechnologischen Eigenschaften der erhitzten UF- bzw. MF-Retentate

Um den Einfluss der Molkenproteine auf die Labelbildungseigenschaften der MF- bzw. UF-Retentate zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Versuche durchgeführt. Beim ersten Versuch wurde der Einfluss einer UHT- oder Hoherhitzung auf die Labelbildung von Milch mit unterschiedlichen Molkenproteinkonzentrationen untersucht. Dabei wurde mittels Mikrofiltration (MF) und Ultrafiltration (UF) im Diafiltration (DF)-Modus die Molkenproteinkonzentration in Milch bei konstanter Caseinkonzentration reduziert. Die MF-

Retentate wurden zwischen 110 und 140 °C erhitzt. Ziel der Arbeit war, den Effekt der Hitzebehandlung auf die Labgelbildung bei unterschiedlichen Molkenproteinkonzentrationen zu bestimmen. Je höher der Restmolkenproteingehalt und die Erhitzungstemperatur sind, desto stärker wird die Labgelbildung der Käseemilch beeinträchtigt. Jedoch kann eine Standardlabgelbildung trotz eines hohen Restmolkenproteingehaltes erreicht werden, wenn die Erhitzungstemperatur im Vergleich zu UHT-Bedingungen reduziert wird. Durch eine Entfernung der Molkenproteine um 82 %, welche bei einer 3-fachen Diafiltration erreicht wurde, können die MF-Retentate bei 120 °C erhitzt werden, während eine 4-fache Diafiltration eine Erhitzung bis zu 130 °C erlaubt. MF-Retentate können bis auf 140 °C erhitzt werden, wenn eine Entfernung der Molkenproteine um 96 % vorliegt.

Beim zweiten Versuch wurden die Labgelbildungseigenschaften der durch Ultrafiltration Mikrofiltration / Diafiltration eingestellte Retentate nach der Erhitzung bei 140 °C für 10 s untersucht. Die Labgelbildungseigenschaften der erhitzter Milch sind abhängig von der Intensität der Erhitzung sowie von der Menge der einzelnen Proteinfractionen, die an der Komplexbildung zwischen den Molkenproteine und Caseine beteiligt sind. Folglich können die Labgelbildungseigenschaften UHT-erhitzter Milch entweder durch das Entfernen der Molkeproteine oder durch die Erhöhung der Caseinkonzentration in der Käseemilch mittels der Ultrafiltration, Mikrofiltration oder durch eine Kombination beider Prozesse in einem Diafiltrationsmodus verändert werden. Der Unterschied zum ersten Versuch ist, dass es bei diesem Versuch mit einem Ultrafiltrationsretentate mit einem Konzentrationsgrad,  $i=2$  gearbeitet wurde, während beim ersten Versuch Magermilch eingesetzt wurde. Das Ziel war, den Effekt der unterschiedlichen Verhältnisse des Caseins/Molkenprotein auf die Käseereigenschaften der UHT-behandelten Magermilch (140 °C für 10 s) zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde der Casein- und Molkenproteingehalt zwischen 3,0 und 6,4 % beziehungsweise 0,02 und 0,65 %, verändert. Die Labgelkoagulationszeit und die Gelfestigkeit nach 60 Minuten wurden als Beurteilungskriterium festgesetzt.

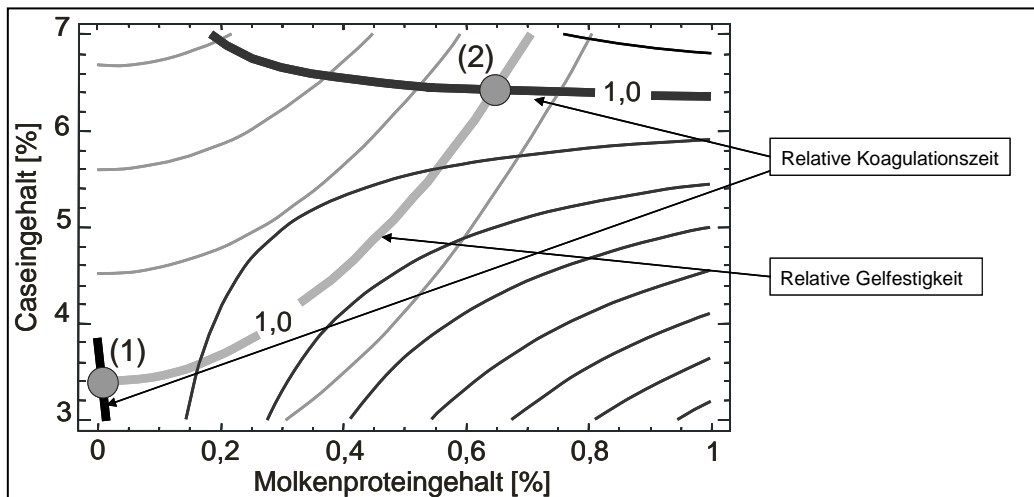


Bild 3.15: Linien gleichen Effekte der Koagulationszeit und Gelfestigkeit der UHT-behandelten Käsereimilch

Die Ergebnisse zeigen starke Interaktionen zwischen Casein- bzw. Molkenproteingehalten, die bezüglich der Labgelbildungseigenschaften der Milchkonzentrate. Diese Faktoren erlauben die Ermittlung der optimalen Zusammensetzung bezüglich des Casein / Molkenprotein-Verhältnisses, die die gleichen Labgelbildungseigenschaften bezüglich Koagulationszeit und Gelfestigkeit haben wie pasteurisierte Magermilch. Zwei diskrete Punkte (siehe Bild 3.15) bezüglich der Casein- und Molkenproteinkonzentration konnten ermittelt werden. Es handelt sich um ein Casein / Molkenproteinverhältnis von 3,4 % zu 0,01 % sowie von 6,4 % Casein zu 0,65 % Molkenproteinen. Diese Konzentrationsverhältnisse sind geeignet für die Herstellung von Käse aus UHT-erhitzter Milch.

Die kompletten Arbeiten sind in den Publikationen Bulca, Leder und Kulozik [2004] und Bulca, Tolkach, Leder, Kulozik (Journal of Food Engineering eingereicht) im Anhang dargestellt.

### 3.5 Fazit zur Hitzesensitivität der Caseinmicelle

Aus dem Stand des Wissens sowie den eigenen Arbeiten zur Stabilität der Caseinmicelle ergibt sich, dass diese zum Einen strukturell noch nicht vollständig verstanden ist, zum Anderen auf jeden Fall aber eine deutlich höhere Hitzeempfindlichkeit hat als bisher angenommen.

Damit bestätigen sich auch Annahmen von Dannenberg [1986], der feststellte, dass in Milch oberhalb von 120 °C im UHT-Bereich Veränderungen in der Caseinmicelle angenommen werden müssen, die er aber nicht belegen konnte, da dies in Gegenwart von Molkenproteinen nicht möglich war.

Wie aus dem Bild 3.16 zu entnehmen ist, Joghurt, dessen Ausgangsmilch bei Temperaturen  $\geq 120$  °C erhitzt wurde, zeigt insbesondere bei hohen Denaturierungsraten bzw. langen

Haltezeiten eine deutliche Verschlechterung der Gelfestigkeit gegenüber Joghurt, der aus Milch hergestellt wurde, welche bei niedrigen Temperaturen, aber mit gleicher resultierender Denaturierungsrate wärmebehandelt wurde. Diese Arbeit bestätigt auch, dass durch die Hitze die Struktur der Caseinmicelle beeinflusst wird, die während der Joghurtproduktion zu sehen ist.

Diese Arbeit hat damit einen bedeutenden Beitrag geleistet, um weiterführende Arbeiten zur Strukturaufklärung und zur Technologie der Caseinmicelle zielgerichtet zu induzieren.

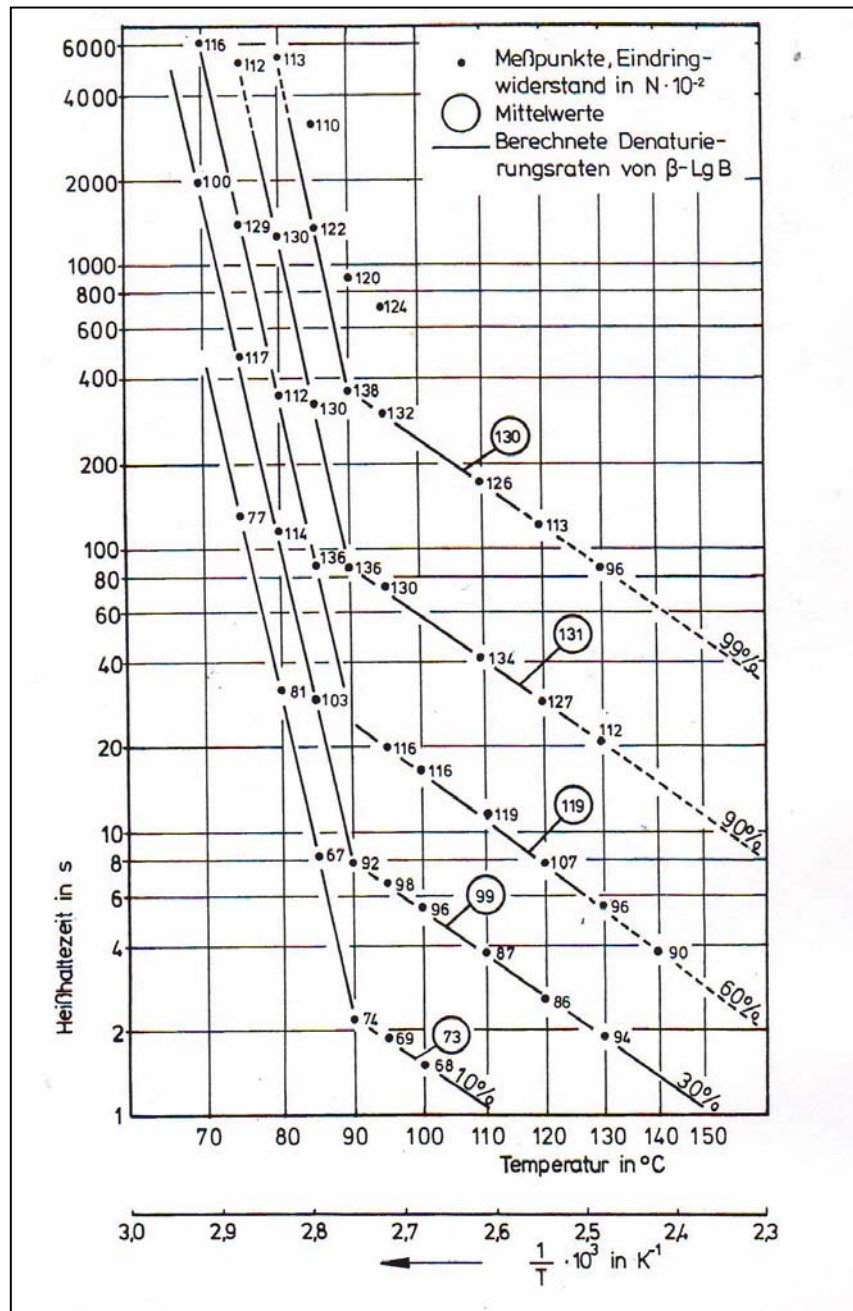


Bild 3.16: Linien gleicher Denaturierungsrate von  $\beta$ -Lg und Eindringwiderstand (Prüfkörper: Zylinder) in Abhängigkeit von der Temperatur / Zeit-Belastung in Joghurtmilch

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

In UHT-erhitzter Milch wurde die Beeinträchtigung der Labgelbildungseigenschaften in An- und Abwesenheit der Molkenproteine untersucht. Wie schon bekannt, führt die Erhitzung der Milch bei Temperaturen über 70 °C zur Denaturierung der Molkenproteine, indem insbesondere  $\beta$ -Lactoglobulin mit anderen Molkenproteinen oder  $\kappa$ -Casein aggregiert. Dieser Effekt wirkt sich in dem Verkäsungsprozess negativ aus, da sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatische Phase der Labgelbildung verzögert werden. Um dies zu verhindern, wurden die Milchproteine mittels Membrantrennverfahren (Mikrofiltration/Diafiltration & Ultrafiltration) vor der Erhitzung in die Proteinfractionen Caseine und Molkenproteine fraktioniert. Es war das Ziel der Arbeit, neben den käseereitechnologischen, anwendungsbezogenen Untersuchungen auch Untersuchungen zu den physikalisch-chemischen Veränderungen an oder in den Caseinmicellen durchzuführen.

Aus käseereitechnologischer Sicht wurde der Effekt der Hitzebehandlung auf die Labgelbildung bei unterschiedlichen Molkenproteinkonzentrationen bestimmt. Je höher der Restmolkenproteingehalt und die Erhitzungstemperatur sind, desto stärker wird die Labgelbildung der Käseemilch beeinträchtigt. Jedoch kann eine Standardlabgelbildung d.h. im Gegensatz zu Magermilch trotz eines hohen Restmolkenproteingehaltes erreicht werden, wenn die Erhitzungstemperatur im Vergleich zu UHT-Bedingungen reduziert wird. Es konnte in dieser Studie auch festgestellt werden, dass die Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Caseinlösungen in Abhängigkeit von Erhitzungstemperatur und Heißhaltezeit trotz der vollständigen Entfernung der Molkenproteine beeinträchtigt werden.

Weiter wurde der Einfluss des unterschiedlichen Casein und Molkenproteinverhältnisse untersucht, um herauszufinden, bei welchen Proteinkonzentrationen sich die Labgelbildungseigenschaften der bei 140 °C für 10 s erhitzten Konzentrate optimal verhalten. Es wurden dabei zwei Optionen festgestellt. Die erste Option entspricht einer Caseinkonzentration von 3,4 % und einem Molkenproteingehalt von 0,01 %, die zweite Wahl lässt bei einem Caseingehalt von 6,4 % zu und einen Molkenproteingehalt von 0,65 % zu. Diese Bedingungen ermöglichen zwei Strategien, ein Labgel mit Standardlabgelbildungseigenschaften aus UHT-behandelter Milch zu erhalten: Entweder die Molkenproteine müssen vor der UHT-Erhitzung der Milch entfernt werden oder der negative Effekt der Molkenproteindenaturierung kann durch eine Erhöhung der Konzentration der Caseinmicellen gegenüber der Molkenproteinkonzentrationen ausgeglichen werden.

Diese Ergebnisse können für den praktischen Einsatz des Verfahrens von großer Bedeutung sein. Dabei geht es bei dem Verfahren um die Herstellung von Käse aus UHT-erhitzter Milch. Dieses Verfahren erlaubt das Herstellen des Käses ohne Zugabe von mikrobiziden Zusätzen (z.B. Nitrat).

Nachdem festgestellt wurde, dass die Labgelbildungseigenschaften der Labgele, die aus erhitzten Caseinlösungen hergestellt wurden, sich mit steigender Temperaturintensität verschlechtern [Schreiber, 2000, 2001], wurde im Folgenden auf die hitzebedingten Veränderungen an oder in der Caseinmicellen, die mit der Labgelbildungseigenschaften im engen Zusammenhang stehen, eingegangen. Daher wurden die unterschiedlich chemisch-physikalischen Methoden zur Identifizierung dieser Veränderungen einbezogen. In diesem Zusammenhang wurde mit GPC, SDS-PAGE, Kapillarviskosimeter, HPLC, Fluoreszenzspektrometer, NMR usw. gearbeitet. Es wurde festgestellt, dass die Caseine nicht so hitzestabil sind, wie bis jetzt angenommen wurde.

Mittels Gelpermeationschromatographie wurde der Polymerisationsgrad der Caseinfraktionen festgestellt und dabei wurde herausgefunden, dass der Polymerisationsgrad der Caseine linear mit steigender Temperatur und Heißhaltezeit zugenommen hat. Das heißt, dass diese durch Erhitzung entstandenen Polymerisationsprodukte eine sterische oder elektrostatische Barriere während der Labgelbildung darstellen können.

Mit SDS-PAGE wurde die hitzebedingte Dissoziation der  $\alpha_S$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Caseine von der Micelle in die Serumphase festgestellt. Je höher die Temperaturen und Heißhaltezeiten, desto mehr dissoziieren die  $\kappa$ -,  $\beta$ - und  $\alpha_S$ -Casein aus der Micelle in die Serumphase. Das bedeutet, dass das kolloidale System der Caseinmicelle durch Erhitzung beeinträchtigt wird und die Caseinmicellen nicht mehr im originellen Zustand vorliegen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Voluminosität der Caseinmicellen mit steigender Temperatur und Haltezeit ansteigt. Dies könnte durch hitzeinduzierte Präzipitation von Calcium und Phosphat oder durch Entstehung der Polymerisationsprodukte zwischen den Aminosäuren erklärt werden.

Als eine wichtige Eigenschaft zur Stabilisierung der Caseinmicelle kann die Oberflächenhydrophobizität angesehen werden. Bei den Untersuchungen zur Oberflächenhydrophobizität wurde festgestellt, dass die Oberflächenhydrophobizität der Caseinmicelle mit zunehmender Temperatur und Heißhaltezeit linear abnimmt. Das bedeutet, dass die Caseinmicelle während der UHT-Erhitzung ihre Struktur verändert, so dass insgesamt das Wasserbindevermögen zunimmt.

Das Serumbindevermögen der Labgele aus den erhitzten Caseinlösungen wurde mittels Synärese-Methode, die nach einem dynamischen System funktioniert, untersucht. Es wurde herausgefunden, dass das Serumbindevermögen der Labgele, die aus erhitzten Caseinlösungen hergestellt wurden, mit steigender Temperatur und Haltezeit zunimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weiter Untersuchungen mittels NMR durchgeführt, um aufzuklären, wie sich die Mobilität des Wassers in erhitzten Caseinlösungen verhält. Hier konnte allerdings kein Unterschied zwischen den aus nicht erhitzten Caseinlösungen



gewonnenen und aus erhitzten Caseinlösungen hergestellten Labgele bezüglich der Wassermobilität festgestellt werden.

Um die hitzebedingten Einflüsse auf die Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Caseinlösungen zu verbessern, wurde weiter die Auswirkung der Ionenstärke durch Zugabe von NaCl untersucht. Es wurde festgestellt, dass je höher die NaCl- und je geringer die Caseinkonzentration wird, desto länger dauert die Gerinnungszeit. Optimal für die Labgelbildung ist eine hohe Caseinkonzentration in Kombination mit einer geringen oder keiner NaCl-Zugabe.

Durch die mehr oder weniger hohe Korrelation zwischen den Labgelbildungseigenschaften der erhitzten Caseinlösungen und diesen Veränderungen konnte erklärt werden, dass entweder eine Veränderung oder eine Kombination der mehreren Veränderungen für die Verschlechterung der Labgelbildungseigenschaften der Labgele verantwortlich sein kann.

Während der Erhitzung der Milch treten je nach Erhitzungsverfahren unterschiedliche Veränderungen des Produktes auf. Mit einer kontinuierlichen Erhitzung kann man die Aufheizzeit wesentlich besser steuern und optimieren, man erhält ein nahezu ideales Temperaturprofil. Deswegen wurden im nächsten Teil der Arbeit auf diese UHT-Erhitzungsverfahren eingegangen. Die Caseinlösungen wurden direkt mit dem Dampf und indirekt mit einem statischen Röhren-Wärmeaustauscher erhitzt. Nach der Erhitzung wurden Käse vom Typ Edamer hergestellt. Die Käse wurden bei 15°C für 28 Tage gereift und der Reifungsverlauf untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Reifungsverlauf je nach Erhitzungsmethode unterschiedlich war. Es konnte festgestellt werden, dass der Reifungsverlauf (insbesondere der Abbau des  $\beta$ -Caseins) des Käses, deren Ausgangsmilch nach direktem Verfahren erhitzt wurde, schneller war als beim indirekten Verfahren. Das lässt sich dadurch erklären, dass während der direkten Erhitzung mehr proteolytische Enzyme in der Milch bleiben als bei der indirekten Methode, welche nachher den Reifungsprozess des Käses beschleunigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich die hitzebedingten Einflüsse an der Caseinmicellen erforscht und als praxisbezogene Anwendung wurde die Labgelbildungseigenschaften der aus UHT-erhitzter Caseinlösungen betrachtet. Sicherlich können diese hitzebedingten Veränderungen an der Caseinmicellen bei der Entwicklung und Forschung bzw. beim Einsatz in verschiedenen Milchprodukten ein anderes Anwendungsgebiet finden. Möglicherweise wäre eine Kombination der hitzebedingten Veränderungen an der Caseinmicellen mit der Hochdrucktechnologie und deren Applikation in verschiedenen Bereichen in der Lebensmittelindustrie eine Möglichkeit. Außerdem lassen sich aus dem Wissen über die hitzebedingten Veränderungen an der Caseinmicelle Hinweise auf die Struktur der Caseinmicellen ableiten. Die Feststellung dieser Veränderungen

ermöglicht die Umsetzung von praxisrelevanten Problemen oder einen Einsatz in der Prozesssteuerung und mit den gewonnenen Erkenntnissen ein Verbessern und Entwickeln neuer Prozesse in der Lebensmittelverfahrenstechnik.

**5 LITERATURVERZEICHNIS**

- 1 ALI, A. E., ANDREWS, A. T., CHEESEMANN, G. C. [1980]: Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. *Journal of Dairy Research*, 46: 215-218
- 2 AOKI, T., UMEDA, T., NAKANO, T. [1999]: Effect of sodium chloride on the properties of casein micelles. *Milchwissenschaft*, 54: 91-93
- 3 BELITZ, H.-D., GROSCH, W. [1999]: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- 4 BRUNNER, J. R., [1977]: Milk proteins, In *Food proteins* [ed. J. R. Whitaker and S. R. Tannenbaum], AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, pp: 175-208
- 5 BULCA, S., LEDER, J., KULOZIK, U. [2004]: Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein contents. *Milchwissenschaft*, 59-590-593
- 6 BULCA, S., TOLKACH, A., LEDER, J., KULOZIK, U.: Impact of casein and whey protein content on the renneting properties of UHT-treated microfiltered milk concentrates. *Journal of Food Engineering (submitted)*
- 7 CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L., LORIENT, D. [1992]: *Lebensmittelpoteine- Biochemie, Funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, Chemische Modifizierung*. Behr's Verlag, Hamburg
- 8 DALGLEISH, D. G. [1983]: Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 50: 331-340
- 9 DALGLEISH, D. G. [1992]: Sedimentation of casein micelles during the storage of ultra-high temperature milk products-a calculation. *Journal of Dairy Science*, 75: 371-379
- 10 DALGLEISH, D. G. [1993]: The enzymatic coagulation of milk, In: Fox, P. F. (Ed.), *Cheese Chemistry, physics and microbiology*, Vol 1: General Aspects, Chapman & Hall, London, 2. Auflage, 69-100
- 11 DALGLEISH, D. G., SPAGNUOLO, P. A., GOFF, D. H. [2004]: A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14: 1025-1031
- 12 DANNENBERG, F. [1986]: *Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung*, Dissertation, TU München, Freising-Weihenstephan
- 13 FAMELART, M.H., LE GRAET, Y., RAULOT, K. [1999]: Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl<sub>2</sub>: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 9: 293-297
- 14 FARRELL, H. M. JR. [1988]: Physical equilibria: proteins. In N. P. Wong, R. Jenness, M. Keeney and E. H. Marth, *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 1. Proteins, 3<sup>rd</sup> edit., pp: 461-510. Van Nostrand Reinhold, New York
- 15 FARRELL, H. M., JR, PESSEN, H., BROWN, E. M., KUMOSINSKI, T. F. [1990]: Structural insights into the bovine casein micelle: small angle X-ray scattering studies and correlations with spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 73: 3592-3601
- 16 FOX, P. F. [1982] Heat-induced coagulation of milk. In *Developments in dairy chemistry. I. Proteins*. 189-228

- 
- 17 GARNIER, J., RIBADEAU DUMAS, B. [1970]: Structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Research*, 37: 493-504
  - 18 GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., BRIARD, V. [2000]: Effect of NaCl addition on the mineral equilibrium of concentrated and acidified casein micelles. *Milchwissenschaft* 55: 84-86
  - 19 GEBHARDT, R., DOSTER, W., FRIEDRICH, J., KULOZIK, U. [2006]: Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal*, 35: 503-509
  - 20 GEBHARDT, R., DOSTER, W., KULOZIK, U. [2005]: Pressure-induced dissociation of casein micelles: size distribution and effect of temperature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 1209-1214
  - 21 GHALEB, H. M., RASHED, M. A. [1983]: Expanded trials to modify Domiati cheese salting. *Journal of Agricultural Research- Tanta University*, 9: 649-659
  - 22 GRUFFERTY, M. B., FOX, P. F. [1985]: Effect of added NaCl on some physicochemical properties of milk. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 9: 1-9
  - 23 GUO, M. R., FOX, P. F., FLYNN, A., KINDSTEDT, P. S. [1996]: Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 6: 473-483
  - 24 HEKKEN, D. L. VAN, HOLSINGER, V. H. [2000]: Use of cold microfiltration to produce unique beta-casein enriched milk gels. *Lait*, 80: 69-76
  - 25 HINRICHS, R., BULCA, S., KULOZIK, U. [2007]: Water mobility during renneting and acid coagulation of casein solutions: a differentiated low-resolution nuclear magnetic resonance analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 37-43
  - 26 HOLT, C. [1992]: Structure and stability of bovine casein micelles, *Advances in Protein Chemistry*, 43: 63-151
  - 27 HOLT, C. [1994]: The biological function of casein, in *Yearbook 1994*, The Hannah Research Institute, Ayr, Scotland, pp: 60-68
  - 28 HOLT, C. DE KRUIF, C. G., TUNIER, R., TIMMINS, P. A. [2003]: Substructure of bovine casein micelles by small angle and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A*, 213: 275-284
  - 29 HOOYDONK, A. C. M. VAN., HAGEDOORN, H. G., BOERRIGTER, I. J. [1986]: The effect of various cations on the renneting of milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 40: 369-390
  - 30 HORNE, D. S. [1998]: Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8: 171-177
  - 31 HORNE, D. S. [2002]: Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloidal and Interface Science*, 7: 456-461
  - 32 HUBER, P., FERTSCH, B., SCHREIBER, R., HINRICHS, J. [2001]. Dynamic model system to study the kinetics of thermally-induced syneresis of cheese curd grains, *Milchwissenschaft*, 56[10], 549-552
  - 33 HUPPERTZ, T., FOX, P. F., KELLY, A. L. [2004]: Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*, 14: 675-680
  - 34 KALAB, M., PHIBBS-TODD, B. E., ALLAN-WOJTAS, P. [1982]: Milk gel structure XIII. Rotary shadowing of casein micelles for electron microscopy. *Milchwissenschaft*, 37: 513-518

- 35 KIRCHMEIER, O. [1973]: Arrangement of components, electric charge and interaction energies of casein particles. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27: 191-198
- 36 KLAUS, B. [2005]: *Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*. Herausgeber: Tetra Pak, Verlag, Th. Mann GmbH & Co. KG
- 37 KNOOP, A. M., PETERS, K. H. [1975]: Structural changes of rennet coagulation during ageing. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 27: 315-329
- 38 KUDO, S. [1980]: The heat stability of milk: formation of soluble proteins and protein-depleted casein micelles at high temperatures. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 255-263
- 39 LUCEY, J. A. [2002]: Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85: 281-294
- 40 MARSHALL, R. J., GREEN, M. L. [1980]: The effect of the chemical structure of additives on the coagulation of casein micelle suspensions by rennet. *Journal of Dairy Research*, 47: 359-369
- 41 MCMAHON D. J., BROWN R. J. [1984]: Composition, structure, and integrity of casein micelles: a Review. *Journal of Dairy Science*, 67: 499-512
- 42 MCMAHON, D. J., MCMAUNUS, W. R.. [1998]: Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 81: 2985-2993
- 43 MOHAMMAD, K. S., FOX, P. F. [1987]: Heat-induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 22: 191-203
- 44 MORR, C. V. [1967]: Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 50: 1744-1751
- 45 NAKAI, S., LI-CHAN, E. [1988]: *Hydrophobic interactions in food systems*. Page: 192. Boca Raton, USA
- 46 O'CONNELL, J. E., FOX, P. F. [2003]: Heat-induced coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, Proteins, 3<sup>rd</sup> Edition, Part B*, Edited by Fox und Mcsweeney
- 47 ONO, T., OBATA, T. [1989]: A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, 56: 453-461
- 48 PAQUIN, P., BRITTEN, M., LALIBERTE, M.-F., BOULET, M. [1987]: Interfacial properties of milk casein proteins. Pages: 677-686 in *Proteins at Interfaces*. J. L. Brash und T. A. Horbett, ed. American Chemical Society, Washington, DC.
- 49 PARK, S-Y.; NAKAMURA, K. und NIKI, R. (1996): Effects of  $\beta$ -lactoglobulin on the rheological properties of casein micelle rennet gels. *Journal of Dairy Science* 79: 2137-2145
- 50 PARRY, R. M., CARROLL, R. J. [1969]: Location of  $\kappa$ -casein in milk micelles. *Biochimica et Biophysica Acta [BBA]-Protein Structure*, 194: 138-150
- 51 PATEL, R. S., REUTER, H. [1985]: Fouling of hollow fibre membrane during ultrafiltration of skim milk. *Milchwissenschaft*, 40: 731-733
- 52 PAYENS, T. A. J. [1966]: Association of caseins and their possible relation to the structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 49: 1317-1324
- 53 RAMET, J. P., EL-MAYDA, E., WEBER, F. [1983]: Influence of salting of reconstituted milk on curdling by rennet. *Journal of Texture Studies*, 14: 11-19
- 54 REIMERDES, E. H. [1982]: Changes in the proteins of raw milk during storage 1982, pp: 271-288. 127 ref. In 'Developments in dairy chemistry. I. Proteins'

- 
- 55 ROLLEMA, H. S. [1992]: Casein association and micelle formation, in *Advanced Dairy Chemistry 1 Proteins* [P. F. Fox, Ed.] Elsevier Applied Science, London, pp: 111-140
- 56 ROSE, D. [1969]: A proposed model of micelle structure in bovine milk. *Dairy Science Abstracts*, 31: 171-175
- 57 SCHLIMME E., BUCHHEIM, W., [1999]: *Milch und ihre Inhaltsstoffe*. 2. Auflage, Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann
- 58 SCHMIDT, D. G. [1982]: Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox, P. F. [Hrsg]: *Developments in Dairy Chemistry*. Vol 1. London and New York: Applied Science Publishers, S. 63-110
- 59 SCHMIDT, D. G., PAYENS, T. A. J. [1976]: Micellar aspects of casein In: E. Matizevic [Editor], *Surface & Colloidal Science-Volume 9*. John Wiley & Sons, New York, pp. 165-229
- 60 SCHREIBER, R. [2000]: Funktionalität und Labgelbildung hochehitzter Caseinmicell-suspensionen-Modellierung von Prozessparametern zur sicheren Käseherstellung. *Fortsch. Ber. VDI, Reihe 3, Nr. 644*, Düsseldorf, VDI-Verlag
- 61 SINGH, H. [1995]: Heat-induced changes in caseins including interactions with whey proteins. Heat-induced changes in Milk, (P. F. Fox) Special Issue 9501, International Dairy Federation, Brussels, pp. 86-104
- 62 SINGH, H., FOX, P. F. [1985]: Heat stability of milk: pH dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -Casein on heating milk at ultra high temperatures. *Journal of Dairy Research*, 52: 529-538
- 63 SINGH, H., FOX, P. F. [1989]: Heat-induced changes in casein. In: *Heat-induced Changes in Milk*. International Dairy Federation Bulletin 238: 24-30
- 64 SLATTERY, C. W, EVARD, R. [1973]: A Model for formation and structure of casein micelles from Subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 317, 529-538
- 65 SPREER, E. [1999]: *Technologie der Milchverarbeitung*. Behr's Verlag GmbH, Hamburg
- 66 STORRY, J. E., GRANDISON, A. S., MILLARD, D., OWEN, A. J., FORD, G. D. [1983]: Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research*, 50: 215-229
- 67 SWAISGOOD, H. E. [1993]: Symposium: Genetic perspectives on milk proteins. Comparative studies and nomenclature. *Journal of Dairy Science*, 76:3054-3061
- 68 TERNES, W. [1995]: *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*. Behr's Verlag, 2. Neubearbeitete Auflage.
- 69 TOMOTADA, O., MIYUKI, Y., HIROSHI, T., HIDEAKI, O. [1999]: Changes in casein micelle size induced by heating. *International Dairy Journal*, 9: 405-406
- 70 TÖPEL, A. [1991]: *Physik und Chemie der Milch*. VEB Fachbuch Verlag Leipzig
- 71 UDABAGE, P. M., MCKINNON, I. R., AUGUSTIN, M. A. [2001]: Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of rennet skim milk. *Journal of Dairy Science*, 84: 1569-1575
- 72 VISSER, F. M. W., GROOT-MOSTERT, E. A. DE [1977]: Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. IV. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31: 247-264

- 73 VISSER, H. [1992]: A new casein model and its consequences for pH and temperature effects on the properties of milk. In Protein Interactions, Visser, H. ed., VHC, Weinheim, pp. 135-165
- 74 VLIET, T. VAN, ROEFFS, S. P. F., ZOON, P., WALSTRA, P. [1989]: Rheological properties of casein gels. *Journal of Dairy Research*, 56: 529-534
- 75 WALSTRA P. [1999]: Casein submicelles: do they exist? *International Dairy Science*, 9: 189-192
- 76 WALSTRA, P. [1990]: On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science* 73: 1965-1979
- 77 WALSTRA, P., JENNESS, R. [1984]: Dairy chemistry and physics, New York, USA; John Wiley & Sons Price
- 78 WALSTRA, P., VLIET, T. VAN., [1986]: The physical chemistry of curd making. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 40: 241-259
- 79 WANG, Q., BULCA, S., KULOZIK, U. [2007]: A comparison of low-intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT heat pre-treatment. *International Dairy Journal*, 17: 50-58
- 80 WAUGH, D. F., NOBLE, R. W. [1965]: Casein micelles. II. Formation and structure. *Journal of the American Chemical Society*, 87: 2246-2257
- 81 WAUGH, D. F., TALBOT, B. [1971]: Equilibrium casein micelle systems. *Biochemistry*, 10: 4153-41621
- 82 WILSON, G. A., WHEELOCK, J. V. [1972]. Factors affecting the action of rennet in heated milk. *Journal of Dairy Research*, 39, 413-419
- 83 WONG, N. P., JENNESS, R., KEENEY, M., MARTH, E. H. [1988]: *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 481-492
- 84 YAMAUCHI, K., YONEDA, Y. [1977]: Effect of some treatments of milk on the exchangeability of colloidal calcium in milk with soluble calcium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41: 2395-2399
- 85 ZITTLE, C. A. [1970]: Influence of phosphate and the other factors on the rennin gel obtained with whole casein and with kappa-casein in the presence of calcium salts. *Journal of Dairy Science*, 53: 1013-1017
- 86 ZOON, P., VLIET, T. VAN. WALSTRA, P. [1989]: Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. IV. The effect of pH and NaCl. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 43: 17-34

**Vorträge**

- 1 Bulca, S.  
„Einsatz von Membrantrennverfahren in der Käseertechnologie-Herstellung von Käse aus UHT-Milch“, AiF-Workshop, Freising-Weihenstephan, 20.07.2001
- 2 Bulca, S., Kulozik, U.  
„Auswirkungen einer UHT-Behandlung auf die Labgelbildung durch Milch und Milchkonzentrate“, Milchkonferenz 2001 der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft, 20./21.09.2001, Berlin, Deutschland
- 3 Bulca, S., Leder, J.  
"Technologien für Käse aus ultrahocherhitzter Milch-Erhöhte Produktsicherheit ohne mikrobizide Zusätze. " AiF-Workshop, 05.07.2002, Freising-Weihenstephan, Deutschland
- 4 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Fractionation of milk proteins by microfiltration and structure formation in cheese from UHT-treated cheese Milk." Design of Nano- and Microstructures in Food and Pharmaceutical Systems, 7./8.10.2002, Freising, Deutschland
- 5 Bulca, S.  
"Variation des Casein/Molkenprotein-Verhältnisses mittels Membrantrennverfahren bei der UHT-Käseherstellung." Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung, 10./11.10.2002, Freising-Weihenstephan, Deutschland
- 6 Bulca, S.  
"Fraktionierung von Milchproteinen durch Mikrofiltration und Strukturbildung in Käse aus UHT-behandelter Käsereimilch." Nano- und Mikrostrukturen in Lebensmitteln und Pharmazeutika, 14./15.10.2002, Freising, Deutschland
- 7 Bulca, S.  
"Technologien für Käse aus ultrahocherhitzter Milch-Erhöhte Produktsicherheit ohne mikrobizide Zusätze. " AiF-Workshop, 24.01.2003, Freising-Weihenstephan, Deutschland
- 8 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Thermisch bedingte Veränderungen an der Caseinmicelle und Einflüsse auf rheologische-strukturelle Eigenschaften am Beispiel der Labgelherstellung", GVC-Fachausschusses Lebensmittelverfahrenstechnik, 12./14.03.2003, Freising-Weihenstephan, Deutschland
- 9 Bulca, S., Kulozik, U.  
"UHT-Behandlung von Käsereimilch", Anuga FoodTec-DLG FoodTec Forum, Fortschritte bei der Hitzebehandlung von Lebensmitteln, 8./11.04.2003, Köln, Deutschland



- 10 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Heat induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration", International Dairy Federation (IDF) World Dairy Summit & Centenary, Advances in Fractionation and Separation-Processes for Novel Dairy Applications, 8./12.09.2003, Bruges, Belgium
- 11 Bulca, S., Tolkach, A., Kulozik, U.  
"Kinetik von thermisch bedingten Veränderungen an der Caseinmicelle und deren Bezug zur Labgelbildung", Milchkonferenz 2003 der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft, 18. / 19. September 2003, Osnabrück, Deutschland
- 12 Bulca, S.  
"Hitzeinduzierte Veränderungen an der Caseinmicelle im UHT-Bereich", Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung 2003, 09./10.10.2003, Freising-Weihenstephan, Deutschland
- 13 Bulca, S., Tolkach, A.  
"Effect of UHT-conditions on changes in casein micelles: kinetics of dissociation and crosslinking reactions of casein fractions and its influence on renneting properties. Novel Technologies to obtain and to optimise the functionality of proteins from milk, whey and egg. 1./2.07.2004, Freising, Deutschland.

### **Kurzberichte, Veröffentlichte Publikationen, Conference Proceedings**

#### **Kurzberichte**

- 1 Bulca, S. (2000)  
Einfluss des Calciumgleichgewichts auf die Labgelbildungseigenschaften bei UHT-erhitzter Milch und Milchkonzentraten - Festlegung einer Methode für das Calciumgleichgewicht. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 168-169
- 2 Bulca, S. Kulozik, U. (2001)  
Auswirkung einer Ultrahochtemperaturbehandlung auf die Labgelbildung von Milch und Milchkonzentraten, In: Milchkonferenz 2001, Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Berlin, 20./21.09.2001, Abstractband T20
- 3 Bulca, S. (2001)  
Untersuchungen zu mittels Ultrafiltration, UTP-Mikro-/Diafiltration hergestellten und hitzebehandelten Casein/Molkenproteinkonzentrate für die Käsetechnologie. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 181-182
- 4 Bulca, S., Lange, I. (2002)  
Hitze induzierender Dissoziations-/Aggregationsvorgänge an der Caseinmicelle und Einflüsse auf den Gelbildungsmechanismus von Labgelen. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 183-186.

- 5 Kulozik, U., Kersten, M., Tolkach, A., Thomä, C., Bulca, S. (2002)  
Enrichment of health relevant components from complex systems by membrane fractionation technology. In: GIT-Labor-Fachzeitschrift, 46 (7), S. 790-792
- 6 Bulca, S. (2003)  
Anwendung der Oszillationsrheometer zur Strukturanalyse der Labgele aus erhitzten molkenproteinfreien Caseinlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 127-129
- 7 Bulca, S. (2003)  
Untersuchung der Labgelbildungsphasen auf die Beeinträchtigung des Koagulationsprozesses in erhitzten Caseinlösungen. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 129-130
- 8 Bulca, S. (2003)  
Untersuchung der Labgeleigenschaften von casein dispersionen in Abhängigkeit von den Erhitzungsbedingungen und  $\text{CaCl}_2$ -Zugabezeitpunkt. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 130-1328
- 9 Bulca, S. (2004)  
Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität von thermisch behandelten Caseinmicelle. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 145-147
- 10 Bulca, S. (2005)  
Untersuchungen zur Voluminosität von UHT-erhitzten Caseinmicellen. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 139-141
- 11 Wang, Q., Bulca, S., Kulozik, U. (2005)  
Vergleichende Untersuchung zur Labgelbildung von UHT-behandelten Caseinlösungen mittels Ultraschallmessung und Oszillationsrheologie. Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München: 171-173

### **Veröffentlichte Publikationen**

- 1 Kulozik, U., Tolkach, A., Bulca, S., Hinrichs J. (2003)  
The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production-a survey. International Dairy Journal, 13: 621-630
- 2 Bulca, S., Leder, J., Kulozik, U. (2004)  
Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein content. Milchwissenschaft, 59 (11/12): 590-593

- 3 Wang, Q., Bulca, S., Kulozik, U. (2007)  
A comparison of low intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT-heat pre treatment. *International Dairy Journal*, 17 (1): 50-58
- 4 Hinrichs, R., Bulca, S: Kulozik, U. (2007)  
Water-mobility during renneting and acid coagulation of casein solutions - a differentiated low resolution nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 60 (1): 37-43

### **Publikationen (eingereicht)**

- 1 Bulca, S., Tolkach, A., Leder, J., Kulozik, U.  
Impact of casein and whey protein content on the renneting properties UHT-treated microfiltered milk concentrates, *Journal of Food Engineering*, in review

### **Conference Proceedings**

- 1 Kulozik, U., Tolkach, A., Bulca, S., Rademacher, B., Hinrichs, J. (2002)  
Optimization of heat treatment in dairy processing. 26<sup>th</sup> IDF World Dairy Congress, Congrilaït 2002, 24. /27. 09. 2002, Paris, France
- 2 Bulca, S., Kulozik, U. (2003)  
Heat induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration. IDF Dairy World Summit & Centenary, 7<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> of September 2003, Bruges (Belgium) pp. 95-99
- 3 Bulca, S. (2004)  
Heat induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration. In *Bulletin of International Dairy Federation*, Nr: 389: 36-39

### **Posterpräsentationen**

- 1 Bulca, S.; Leder, J. Kulozik, U.:  
„Nitratfreier Käse durch UHT-Behandlung der Käsereimilch“  
Wissenschaftstagung „Lebensmittel und Gesundheit“, 26.02.2002, Freising-Weihenstephan, Germany
- 2 Bulca, S.; Leder, J.; Kulozik, U.:  
„Investigation of heated casein / whey protein concentrates produced by means of ultra- and microfiltration for cheese manufacturing“  
Congrilaït - 26th IDF World Dairy Congress, 24.-27.09.2002, Paris, France
- 3 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Investigations of heat-induced changes in casein solution produced by means of microfiltration/diafiltration for the cheese manufacturing".

- 4<sup>th</sup> International Symposium on Industrial Proteins, 15.-16.05.2003, Ede-Wageningen, The Netherlands
- 4 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Heat-induced dissociation/aggregation processes on casein micelles and influences on the gel formation mechanism of the rennet casein gels"  
3<sup>rd</sup> International Nizo Dairy Conference- Dynamics of Texture, Process and Perception, 11-13 June 2003, Papendal, The Netherlands
- 5 Bulca, S., Kulozik, U.  
"Heat-induced dissociation/aggregation processes on casein micelles and influences on the gel formation mechanism of the rennet casein gels" GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie , 25.-27.09.03, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland
- 6 Bulca, S., Kulozik, U.  
Kinetic description of heat-induced polymerisation and dissociation reactions of whey protein-free casein dispersions, Gesellschaft für Lebensmittelverfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (GVC), Fachausschusses Lebensmittelverfahrenstechnik, 22./25. 03.2004, Baden-Baden, Deutschland
- 7 Wang, Q., Bulca, S., Kulozik, U.  
Vergleichende Untersuchung zur Labgelbildung von UHT-behandelten Caseinlösungen mittels Ultraschallmessung und Oszillationsrheologie, GVC-Tagung Berlin, 07./09.03.2005

## **Erschienene Publikationen**

1. Kulozik, U., Tolkach, A., Bulca, S., Hinrichs J. (2003)  
The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production-a survey. *International Dairy Journal*, 13: 621-630
2. Bulca, S., Leder, J., Kulozik, U. (2004)  
Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein content. *Milchwissenschaft*, 59: 590-593
3. Wang, Q., Bulca, S., Kulozik, U. (2007)  
A comparison of low intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT-heat pre treatment. *International Dairy Journal*, 17:50-58
4. Hinrichs, R., Bulca, S: Kulozik, U. (2007)  
Water-mobility during renneting and acid coagulation of casein solutions - a differentiated low resolution nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 37-43

Review

# The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production—a survey

U. Kulozik<sup>a,\*</sup>, A. Tolkach<sup>a</sup>, S. Bulca<sup>a</sup>, J. Hinrichs<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Technische Universität München, Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany*

<sup>b</sup> *Universität Hohenheim, Institute for Food Technology, D-70599 Stuttgart, Germany*

Received 6 January 2003; accepted 4 June 2003

## Abstract

New options to process dairy products by means of new single unit operations or combinations thereof are presented. The innovative possibilities discussed in this paper mainly refer to novel ways of influencing product microstructures or textures as perceived during consumption, by means of contributions of single molecule fractions of complex systems derived from membrane fractionation techniques. In addition, options to integrate physiologically active components which also have a structure forming effect in fermented or other dairy products are highlighted. Alternatives derived from thermal, mechanical and enzymatic processing and from fractionation techniques by means of membranes are presented which can be exploited for fractionation and compositional matrix design of dairy products.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Microstructure; Thermal processing; Ultrahigh pressure; Membrane filtration; Enzyme technology

## Contents

1. Introduction . . . . .	622
2. Thermal processing technology . . . . .	622
2.1. Effect of milk pre-heating on the yoghurt texture . . . . .	622
2.2. Whey protein structures through heat induced particulation . . . . .	623
2.3. Thermal fractionation of whey proteins . . . . .	624
3. Ultrahigh pressure technology . . . . .	624
4. Enzyme technology . . . . .	626
4.1. Enzymatic protein crosslinking by transglutaminase . . . . .	626
4.2. Enzymatic lactose hydrolysis post-fermentation . . . . .	626
5. Membrane technology . . . . .	627
6. New technologies for new nutritional concepts . . . . .	628
6.1. Calcium retention in fresh cheese . . . . .	628
6.2. Caseinoglycomacropeptide (CGMP/CMP) . . . . .	629
7. Conclusion and outlook . . . . .	629
References . . . . .	630

\*Corresponding author. Tel.: +49-8161-714205; fax: +49-8161-714384.

E-mail address: [ulrich.kulozik@wzw.tum.de](mailto:ulrich.kulozik@wzw.tum.de) (U. Kulozik).

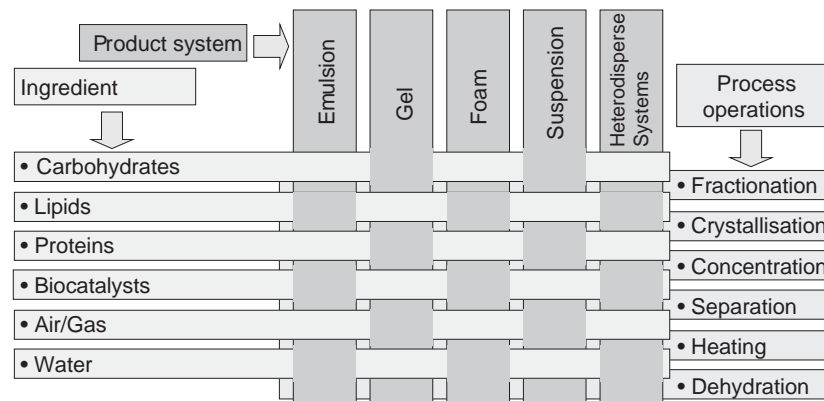


Fig. 1. The roles of ingredients and examples of processing unit operations to design product structures.

## 1. Introduction

Structure is a fundamental variable influencing transport phenomena and physical properties of food products. Perceived quality is impacted by the microstructure in terms of attributes such as mouthfeel and creaminess. Food structure engineering, i.e. food structure design, has therefore become very important to the food scientist and the food engineer as a controlled effort to preserve, modify or create structures by means of processing techniques and matrix composition. Because of the relevance of microstructure the scale of analysis is being shifted from the macro- to the microlevel. Available and novel analytical techniques such as ultrasound spectroscopy are enabling to assess changes on this level and to obtain the information needed to understand the mechanisms in complex food microstructure building.

Milk and dairy products are complex systems with structural properties of either an emulsion, a gel, a foam, a suspension or a combination of these that all depend on the molecular functional properties of both the major and minor ingredients. Their natural functional properties, on the other hand, can be influenced by means of processing techniques such as thermal treatment, membrane separation or other fractionation techniques, only to name a few of the multiple options available, in order to obtain modified or new product properties in a targeted way. As a consequence, a detailed understanding of both the chemical and physical ingredient properties as well as of the technical and processing aspects is required to successfully aim at specific structural objectives. By making use of the functional and technical capabilities of single ingredients or unit operations, and the multiple options derived from their interactions and combinations, a broad range of innovative process and product solutions for not only fermented products can be considered. Focus is set on the role of fractionation of complex systems by various means in order to derive ingredients or systems with new

balances between the ingredients for the optimisation of dairy food microstructures.

Fig. 1 illustrates these aspects in perspective to each other. It is obvious that the various ingredients and processing operations usually work together or are used in combination to achieve certain effects, especially in systems whose structure as a mixed, heterodispersed system relies on different ingredient contributions. Carbohydrates and proteins, for instance, generate networks and provide gelling properties, proteins and lipids together form emulsions, proteins act at the interfaces of gas bubbles to create foams, microorganisms and enzymes biologically modify proteins by hydrolysis, crosslinking or fermentation and, in a product like ice cream, most of these interactions play an important role all together.

The purpose of this paper is to summarise recent findings and new technological options derived from thermal, high pressure treatment, enzymatic and membrane technology which provide platforms to optimise or to create new functional properties of dairy products.

## 2. Thermal processing technology

### 2.1. Effect of milk pre-heating on the yoghurt texture

Fig. 2 depicts a well-known example of the thermal pre-processing of yoghurt milk and the impact thereof on the rheological properties of the finished product. In the left-hand diagram the effect of various temperature ( $\theta$ )/hold time ( $t$ )-conditions on the degree of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) are shown. For a better orientation the different heating regions for pasteurised and UHT milks are included. The so-called flow curves in the right-hand diagram indicate the impact of the degree of  $\beta$ -Lg-denaturation on the rheological properties of the resulting yoghurt gel, i.e. after fermentation. A high degree of denaturation, as found by Dannenberg (1986) and Dannenberg and Kessler (1988), influences

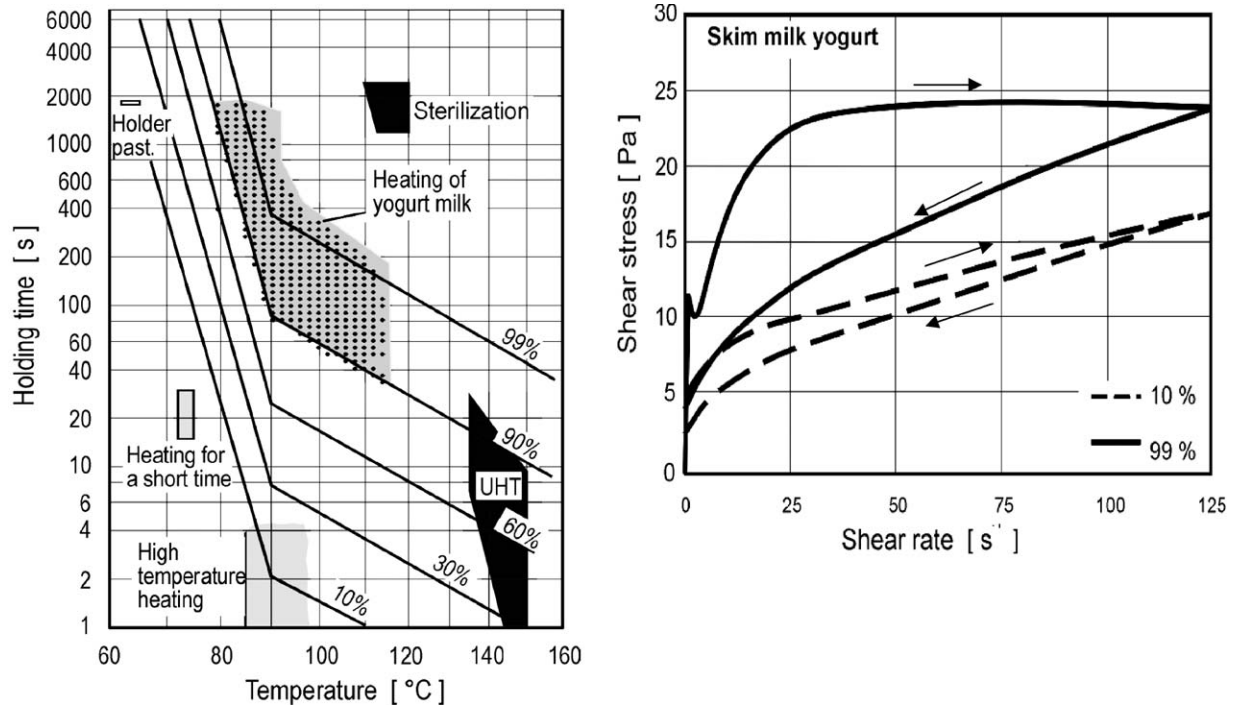


Fig. 2. Temperature–time-conditions for yoghurt milk pre-treatment and rheological profiles of yoghurts from differently heated milks (Dannenberg, 1986).

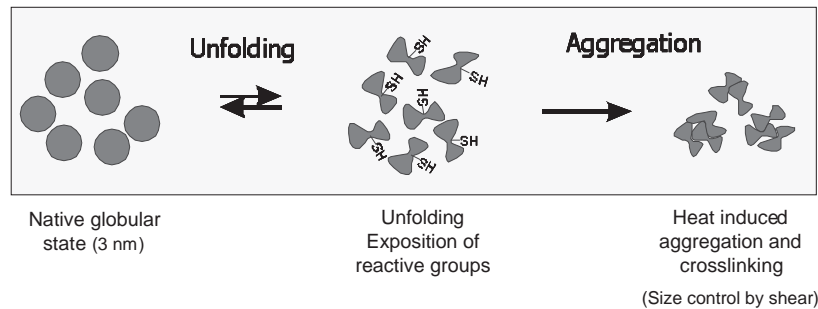


Fig. 3. Unfolding and aggregation of  $\beta$ -Lg in whey under the influence of heat and shear.

the gel firmness and the serum holding capacity in a positive way through the whey protein aggregation on the casein micelle surfaces. This can be exploited to optimise the yoghurt texture. The overall conclusion for the optimal conditions to pre-heat yoghurt milk drawn by Dannenberg (1986) is schematically included in the  $\vartheta/t$ -diagram: Considering a variety of criteria the conditions covered by the grey shaded area, i.e. conditions around  $90^{\circ}\text{C}/300\text{ s}$  (in a range of  $80\text{--}110^{\circ}\text{C}$  at hold times between 40 and 2000 s) result in the highest firmness levels and the lowest serum release values.

2.2. Whey protein structures through heat induced particulation

The reaction of  $\beta$ -Lg upon heat treatment, i.e. the complex unfolding and aggregation reaction of the

native globular protein, can also be induced in whey. In this case, it is not the casein micelle surface providing a reactive partner for the  $\beta$ -Lg molecule. In whey, the whey proteins react amongst themselves and form particulated whey protein aggregates. Depending on the reaction conditions, several options to create whey protein particles (WPP) with novel functional properties exist that go beyond the original approach taken by the Simplesse product. For a better understanding Fig. 3 schematically describes the unfolding reaction of  $\beta$ -Lg and the exposure of reactive SH-groups which subsequently can form aggregates by means of S–S-bridges between molecules. If this thermal reaction is taking place while the product is under shear stress the size of the resulting aggregates can be limited.

However, the resulting size and the inner structure of the whey protein aggregates not only depend on the



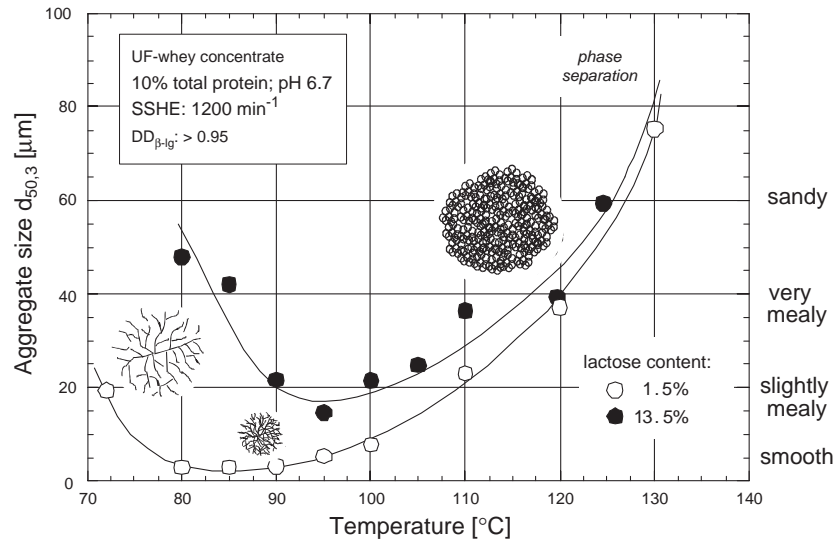


Fig. 4. Whey protein particulation under various temperature conditions and serum compositions (Spiegel, 1999).

application of heat and shear. As shown by Plock (1994) and Spiegel (1999), the lactose content in the serum is of paramount importance to this reaction.

Fig. 4 shows the aggregate size of the WPP, expressed as mean particle diameter  $d_{50,3}$ , as a function of the heating temperature and of the lactose content in the serum. As can be seen the lactose level has a strong impact on the aggregate size which also depends to a very large extent on the heating temperature. As was concluded from supportive serum binding measurements and from image analysis of the particles (not shown), also the internal structure of the particles varies with changing heating conditions and serum compositions. Such WPP can be used to create product textures by making use of the functional properties and the internal structure of the particles as long as they remain in a size range small enough not to be detrimental to the sensorial properties.

### 2.3. Thermal fractionation of whey proteins

Further options for the design of new product matrices from thermal treatments can be derived from the different reactivities of the individual whey proteins to heat. Whey proteins react differently on a heat treatment depending on a variety of milieu factors, such as lactose content, protein concentration, protein composition, pH, ionic environment and a few more medium variables. Fig. 5 depicts the denaturation reaction rate constants of  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La) as a function of the lactose level and of the protein content (Tolkach & Kulozik, 2001). As can be seen,  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -La react differently to these conditions. Depending on the medium composition either one of the proteins can be preferentially denaturated, i.e. aggregated, while the other one mostly remains native

in solution. For instance, the rate constant for  $\alpha$ -La at low lactose and protein contents is low, while under the same conditions  $\beta$ -Lg reacts much faster. For high lactose and protein levels these proteins react reverse. The aggregated protein can be separated easily from the protein mixture. The diagrams also reminds of the typical compositions of whey (low protein level, high lactose level) and different whey derivatives (whey protein concentrate, WPC: high lactose level and high protein level; whey protein isolate, WPI: high protein level, low lactose and, in addition, low mineral level), highlighting the fact that the reactivity of the whey proteins in such products is vastly different. This needs to be taken in account when whey protein products are, motivated by local or seasonal price fluctuations, used for product design in different forms. In conclusion, the variability of commercial whey products can well be explained by the varying serum composition in mixed wheys, thus leading to unexpected surprises when using their functional properties in food design and manufacture.

### 3. Ultrahigh pressure technology

Shear treatment as one of the options to mechanically process dairy systems was briefly mentioned already above as part of the production of WPP. Another, still emerging technology offering alternatives and new ways to influence dairy product properties is ultrahigh pressure (UHP) technology, operating at static pressure levels between 200 and 1000 MPa (2000–10 000 bar). In comparison to homogenisation of milk and cream in a dynamic flow through mode at 2 to maximally 100 MPa the product in the case of UHP is filled into a autoclave, immersed in a liquid and statically pressure treated.

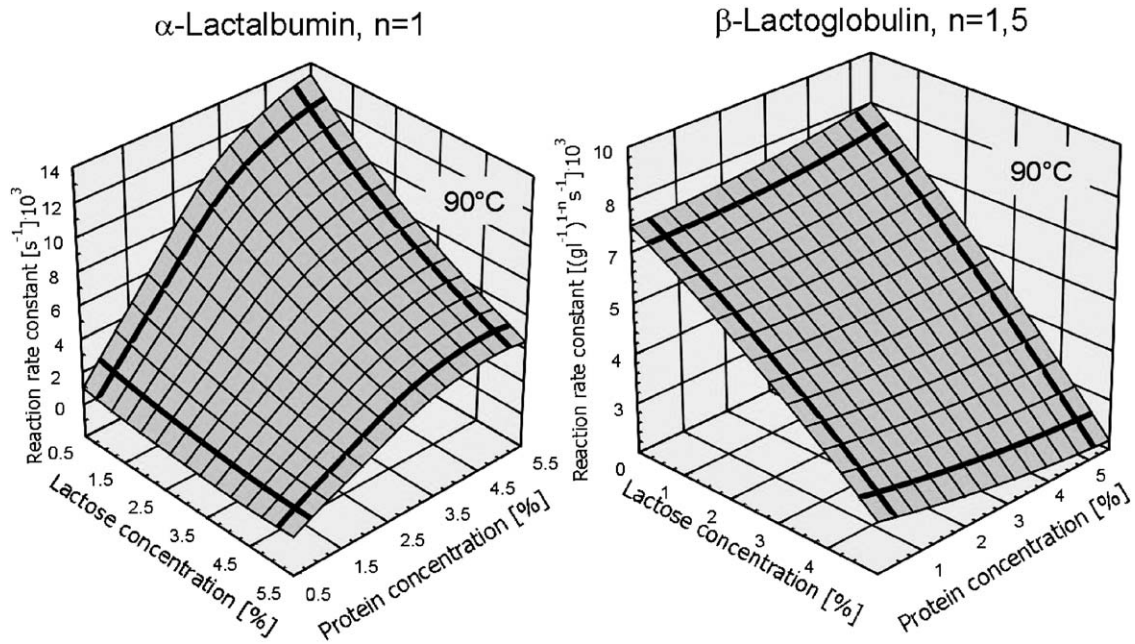


Fig. 5. Reaction rate constants for  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -La under various medium conditions (lactose concentration, total whey protein content) upon heat treatment at  $90^\circ\text{C}$  (Tolkach & Kulozik, 2001).

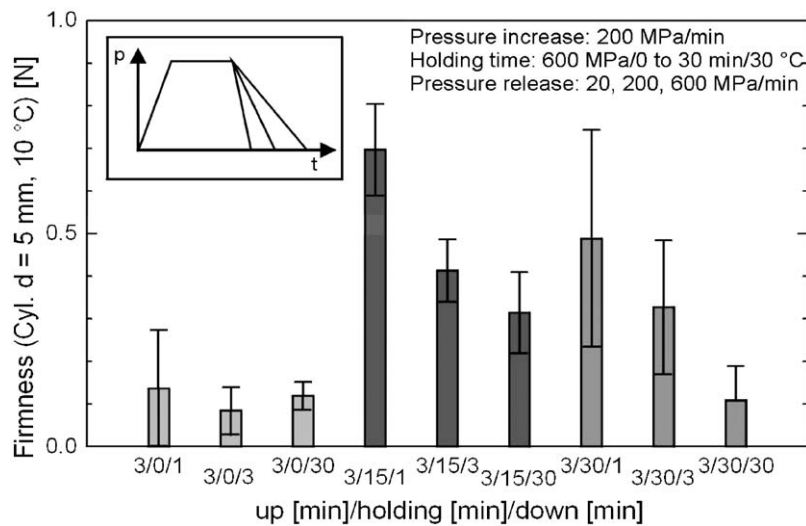


Fig. 6. Gel strengths of casein micelle suspensions after UHP treatment at different hold times and pressure release rates (modified from Fertsch, Hinrichs, & Brummet, 2000).

Under UHP the volume compression effect of the aqueous solution occurs and affects intramolecular chemical bonds. As a result these bonds can either be enforced or weakened such that, for instance, hydrophobic bonds in biological membranes or the tertiary protein structure of enzymes are deteriorated (Hinrichs, 2000). This effect has been investigated by Rademacher (1999) and Rademacher, Werner, and Pehl (2002) in detail for the inactivation of microorganisms and structural effects of biological membranes. Hinrichs (2000) studied the effect of UHP on protein structures that result from treating milk concentrates, WPCs and

the individual milk protein fractions, i.e. pure native casein micelles and whey proteins. As demonstrated by these investigations novel ways to coagulate UF concentrated milk protein concentrates were found which build on using UHP instead of renneting or fermentation. Fig. 6 provides an impression of the impact of UHP on a casein micelle suspension (casein concentration: 10%) at a maximum pressure level of 600 MPa and both at different pressure holding times and pressure release rates. As can be seen gels with variable gel strengths are formed, depending on hold times and downward pressure ramps. For hold times '0'

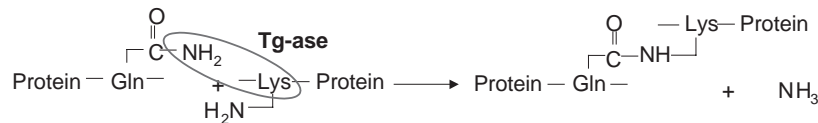


Fig. 7. Transglutaminase induced protein crosslinking reaction between lysin and glutamic acid.

weak gels were detected whereas for hold times of 15 and 30 min firmer gels were found also, again depending on the pressure release rate. Inoculation of the resulting casein gel with *Penicillium candidum* gave a camembert type of cheese very similar to a standard type of product (Hinrichs, 2001).

Whey proteins were identified to react differently on UHP. First, they build different structures depending on the processing conditions and, like upon thermal treatment, the individual whey proteins can be fractionated by selecting the pressure conditions appropriately. Current investigations focus on a deeper understanding of the effect of UHP on the casein micelle structure during and after treatment by means of dynamic light scattering as well as rheological and texture measurements. Despite the fact that UHP is still at the brink of being established in industrial production, although a couple of practical examples are already existing in various countries, it can still be predicted that novel interesting dairy food microstructures can be constructed which are distinctly different to existing products, in particular when combined with specifically composed novel product compositions or enzymatic crosslinking, as described further below.

#### 4. Enzyme technology

##### 4.1. Enzymatic protein crosslinking by transglutaminase

The generation of stable product structures with specific textural attributes can only partially be achieved by means of the native functional properties of proteins or hydrocolloids. Enzymatic crosslinking of proteins by means of transglutaminase (Tg-ase) offers additional means to create protein-based structures. The enzyme Tg-ase catalyses an acyl group transfer between  $\gamma$ -carboxyamide groups of peptide-bound glutamyl residues as acyl donor and the primary amino groups in a variety of amine compounds as acyl acceptor, including peptide-bound  $\epsilon$ -amino groups of lysyl residues as shown in Fig. 7. This key chemical mechanism requires the presence of amino acids in the protein chain which are sensitive to this reaction. Among the milk proteins the casein fraction is the preferred substrate for Tg-ase, because of the amino acid profile that includes glutamic acid and lysin.

The effect of enzymatic crosslinking by Tg-ase is an increased gel strength and can also be rheologically

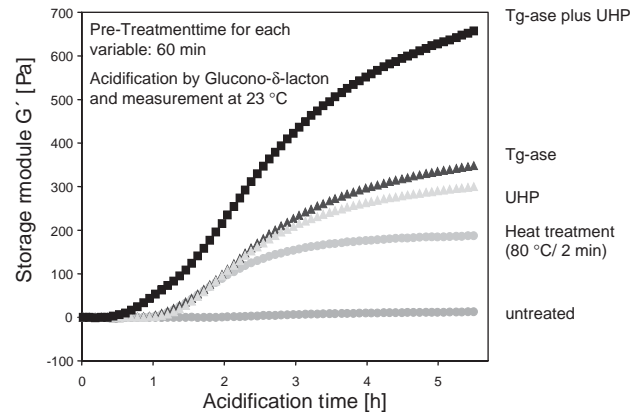


Fig. 8. Storage modulus in skim milk gels as a function of time during direct acidification following various pre-treatments (Lauber, 2002).

measured by the storage modulus  $G'$ , which is a measure for the solid material properties of the structure. In Fig. 8 the storage modulus in skim milk-based gels is shown as a function of time for skim milk concentrates which underwent various pre-treatments: heat treatment, UHP (400 MPa), Tg-ase ( $3 \text{ U g}^{-1}$  protein) and a combined treatment by Tg-ase and UHP. The pre-treatment time in each case was 60 min after which an acidification step by means of GDL (Glucono- $\delta$ -lacton) was applied in order to set the gel following isoelectric coagulation upon decrease of the pH. The acidification temperature was  $23^\circ\text{C}$ . Except for the control product which was not pre-treated at all, in all cases the storage modulus increased exponentially after about 1–1.5 h of lag time before levelling off to a final value. The  $G'$ -value differs for the various pre-treatments. The highest value was obtained for the combined Tg-ase/UHP-pre-treatment. This synergistic behaviour can be explained by a more open structure of the casein micelles upon UHP treatment, thus offering more reactive groups for the acyl group transfer reaction.

##### 4.2. Enzymatic lactose hydrolysis post-fermentation

Conventional lactose hydrolysis usually is conducted prior to fermentation, thus also changing the substrate compositions for the culture and introducing an additional processing step which significantly extends the overall processing time. An alternative to this treatment was developed by adding the enzyme hydrolysing the lactose post-fermentation. The enzyme used was a lactase extracted from moulds with a pH optimum suitable for the acid pH of the fermented product. In

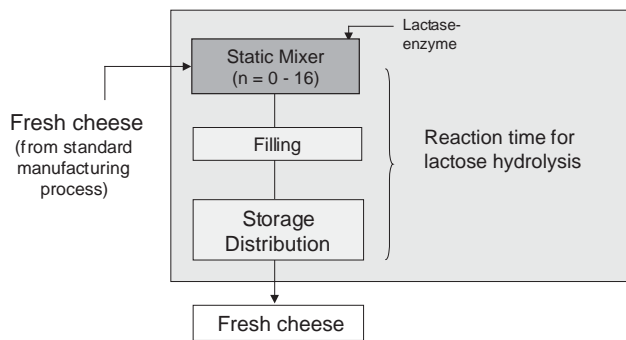


Fig. 9. Enzymatic lactose hydrolysis post-fermentation in fresh cheese.

this study a fresh cheese type of product (quarg) was used for the experiments. Two competing objectives were to be considered for this new process: to preserve the structure of the already formed protein gel while introducing the lactase enzyme inline by means of a static mixer and, secondly, to disperse the lactase fine enough in order to ensure a uniform hydrolysis reaction throughout the product. The processing conditions and time were set to 72 h at 4°C, assuming a 3 day distribution time available for the hydrolysis reaction under cooling conditions until the first product has reached the final consumption stage. A block diagram of the processing set up is depicted in Fig. 9.

Under these conditions the lactose was found to be able to migrate about 20 mm, whereas the lactase enzyme only migrates 5 mm as could be shown by experiments in a specially constructed diffusion cell described by Wilde, Baumgartner, Fertsch, and Hinrichs (2001) and Baumgartner, Wilde, and Hinrichs (2001). In other words, the inline mixing device comprising variable numbers of elements ( $n = 0-16$ ) of a static mixer cell, has to ensure a maximum distance of 20 mm between the enzyme and lactose molecules to be bridged by diffusion during the 3 days of reaction time available. The mixing intensity can thus be limited to a minimum in order to maintain most of the gel structure. From these experiments the potential can be derived to reduce the sweetness to be added to dessert type of products by means of fruit preparations. In terms of the additional options, other enzymatic reactions such as protein hydrolysis reactions can be considered as future possibilities using the same principal approach.

## 5. Membrane technology

The design of matrices to construct certain consumer preferred food structures is one of the keys for future competitiveness in the dairy industry for consumer preferred products. In addition, new nutritional concepts can be developed by means of enriching, depleting or avoiding certain components with special physiolo-

gical properties. Conventional means of fractionation are limited in their potential to provide solutions to these new concepts because they do not deliver the target ingredients in the desired form or molecular configuration. Membrane technology therefore was investigated in order to assess the processing variables and conditions required to come up with innovative possibilities for, e.g., protein fractionation. Starting point was the well-known uniform transmembrane pressure microfiltration (UTP MF) concept originally developed in the mid-seventies and then further optimised (Osterland, Andersen, & Ottosen, 1995) for the filtration of milk with membrane pore sizes around 1.4 µm with the intention to produce sterile milk. Other researchers later on made use of this processing concept for the fractionation of caseins and whey proteins with nominal pore sizes of 0.1 µm (Maubois & Ollivier, 1992; Kersten, 2001).

As can be seen from Fig. 10 skim milk can be fractionated by means of UTP MF (0.1 µm), in combination with an UF diafiltration step, in its two main protein fractions. This concept yields a native casein retentate and native whey proteins. The MF permeate can be considered a sort of sweet whey, because it only contains the whey proteins but no caseinoglycomacropetide (CGMP). This MF permeate can be further concentrated to obtain a WPC product. The UF permeate from this operation is recirculated into the MF stage as a diafiltration medium. The casein retentate, when used as cheese milk, can almost be depleted of all whey proteins through a continuous or six-fold batch multistage diafiltration. In contrast to conventional cheese technology, it is then possible to UHT treat the cheese milk in order to destruct the spore forming *Clostridium* species, which currently in most cases still have to be suppressed by nitrate addition to prevent gas formation in the cheese loaf (late blowing) during ripening (Schreiber, 2000). The whey proteins can either be concentrated by UF or treated further in order to fractionate the whey proteins in their main components. Alternatively, the whey proteins can be particulated to form WPP. Both approaches are options to build a new platform for the design of novel product matrices still to be exploited to achieve specific functional properties such as gelling, foaming or emulsification.

An alternative to entirely deplete the skim milk from the whey proteins by diafiltration is to raise the casein content in order to make the system more heat stable while reducing the technical effort for the diafiltration process. Investigations were conducted at different casein levels while modifying the whey protein content. The products were UHT treated (140°C/10 s holding time) and compared against a standard cheese milk treatment that was conducted at regular pasteurisation conditions. The effect of these variations on the rennet

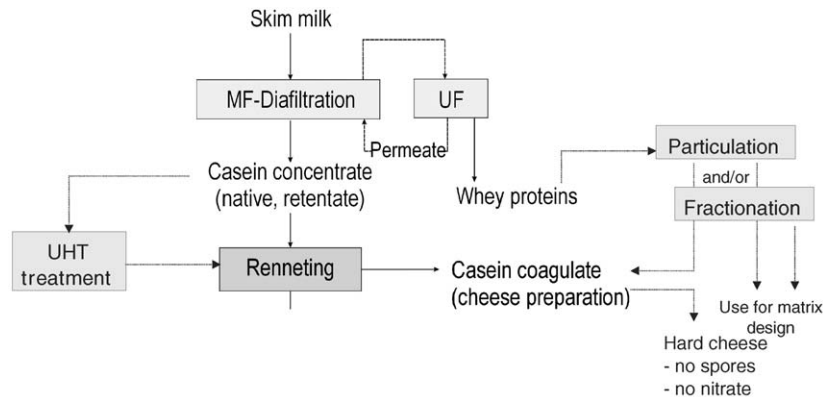


Fig. 10. Fractionation of skim milk by means of UTP-MF and UF and related technological options.

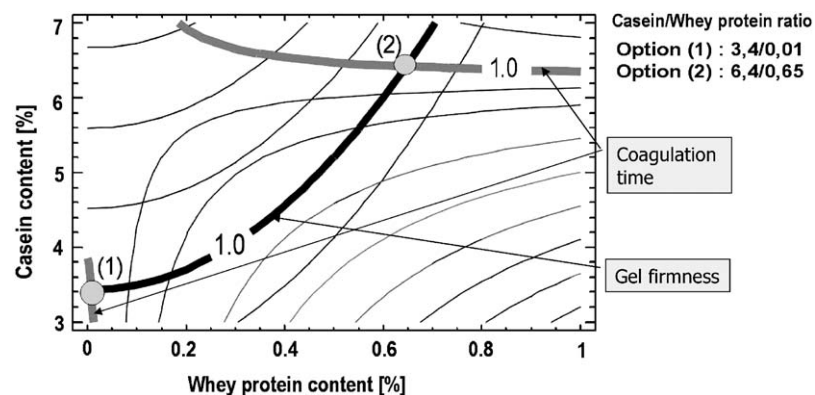


Fig. 11. Iso-effect lines regarding coagulation time and gel firmness for the assessment of the effect of a UHT treatment (140°C/10 s nominal holding time). Standard gel formation is achievable at two distinct combinations of casein and whey protein ratios. Options (1) and (2) (Bulca, Tolkach, & Kulozik, 2001).

coagulation was assessed by measuring the gelling time (Gelograph) and the resulting gel firmness (Texture profiling). Fig. 11 shows the iso-effect lines regarding gelling time and gel firmness, i.e. the relative values of these two properties of the experimental rennet gels versus the standard rennet gel. The target was to identify the set of conditions that delivered the same rennet gel properties in terms of gelling time (relative value of “1”) and gel firmness (relative value of “1”) as compared to the standard way of manufacture or milk pre-treatment including a pasteurisation step.

As can be seen from Fig. 11 the iso-effect lines have two crossover points at which the UHT treatment does not change the gelling properties of the cheese milk when coagulated by rennet.

## 6. New technologies for new nutritional concepts

Milk and dairy products are well recognised for their healthy composition. However, new tasks and expectations to provide products with preventive or even therapeutic properties are emerging (Korhonen, 2002).

This chapter describes two examples where a higher degree of nutritional functionality can be achieved by increased retention of calcium in fresh cheese (Example 1) and by concentrating the CGMP from the cheese process described in Fig. 10 (Example 2). Both examples include challenges on the structural level in order to ensure an active contribution in food microstructure or texture of the components originally included for their nutritional function.

### 6.1. Calcium retention in fresh cheese

In standard fresh cheese manufacture a larger portion of the original milk calcium is lost in the concentration step (either centrifugal separation or UF) where the desired protein and dry matter level is achieved, because the colloidal calcium, at acid pH values, is ionic and therefore leaves the casein micelle into the serum. While in the separation process the whey proteins and the calcium are lost in the serum, the UF process retains the whey proteins and, therefore, achieves a higher yield, but the calcium is still lost into the UF permeate. Fresh cheeses therefore are lower in calcium content than milk

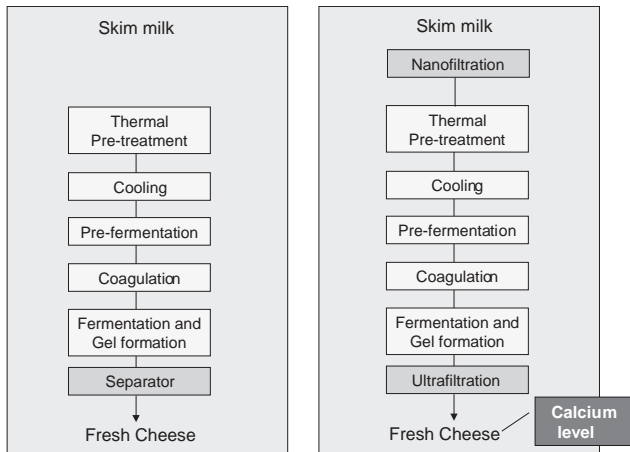


Fig. 12. Conventional fresh cheese technology and a new NF/UF-based process (Schkoda & Kessler, 1997).

and do not fulfil the nutritional expectations of dairy products. Fig. 12 compares the conventional fresh cheese process with a new process proposal that can retain most of the milk calcium in the fresh cheese. The new process includes an upstream nanofiltration two-fold pre-concentration step. Thereafter, the regular fresh cheese process is applied including an UF concentration step to achieve the final dry matter value. In this case, however, the calcium losses into the serum are much lower as compared to the conventional process, because the final concentration step only has to remove a small amount of serum including the ionic calcium. The final UF step and the partial calcium removal, however, is still necessary, because otherwise the product acquires undesired sensorial properties linked to a bitter taste at the beginning of the shelf life (Bäurle, Walenta, & Kessler, 1984), for which the mechanisms are not yet understood.

## 6.2. Caseinoglycomacropeptide (CGMP/CMP)

One of the biologically active ingredients that have a potential to be used more explicitly in dairy product formulations or in other areas of the food industry is CGMP, which is enzymatically cut off the casein micelle during the renneting process in cheese making. CGMP is a variable molecule dependent on the genetic variant, which is partially glycosylated (CGMP) and partially non-glycosylated (CMP). CMP and CGMP offer a large variety of well documented biological and physiological functions, such as toxin binding, suppression of pathogens, pre-biotic nutrient for a healthy gut flora, osteoporosis prevention and other properties (Brody, 2000; Clare, 1998; Abd El-Salam, El-Shibiny, & Buchheim, 1996; Neeser, 2000), which are partially linked to CMP or CGMP. New nutritional concepts could make extended use of this potential. However, the

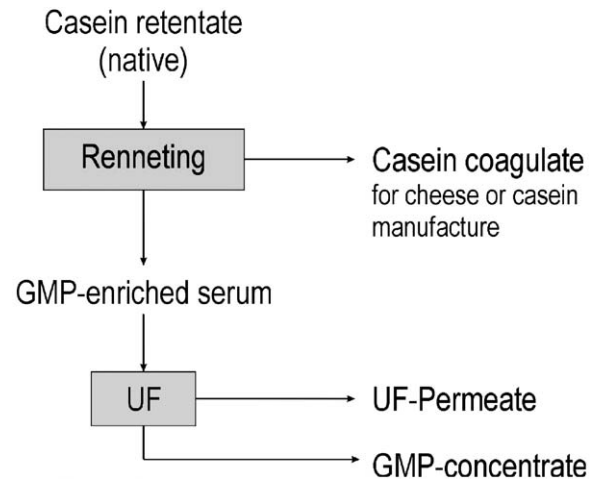


Fig. 13. Process to obtain CGMP/CMP from native casein micelles (Thomä & Kulozik, 2002).

ion exchange technology available to isolate GMP from sweet whey is not very efficient and not environmentally friendly. This results in a high price for GMP. More important, though, is the lack of knowledge on the functional properties of CGMP/CMP and on the active, targeted integration of CGMP or CMP in product matrices in conjunction with novel nutritional concepts, which is currently being investigated at the authors' chair.

UTP MF, as described above, is able to overcome the limitations of the current technology for the CGMP and CMP isolation. The process, as described in Fig. 10, is the starting point of new considerations in developing an alternative process to obtain CGMP and CMP. After the casein/whey protein fractionation the casein retentate is renneted to produce cheese. The 'whey' resulting from this procedure does not contain whey proteins, some casein coagulate particles and CGMP/CMP. The casein particles can easily be removed by a coarse microfiltration or centrifugation. What remains is a CGMP/CMP solution that can be further concentrated or pre-treated to influence the functionality. Current investigations focus on making use of the expected functional properties in dairy product matrices. Fig. 13 schematically shows the process for the isolation of CGMP/CMP from native casein micelles that could be extended by a MF or centrifugation step to remove casein coagulate particles.

## 7. Conclusion and outlook

From the examples presented in this paper it can be concluded that for the design of new product concepts the fractionation of dairy ingredients is key to offering novel development possibilities. Both the structural properties of products as well as their nutritional value

depend on the capability to enrich or deplete certain ingredients that have an influence on these functions. As demonstrated, membrane technologies can produce native single dairy proteins for product design. In combination with an improved understanding of thermal treatments on protein reactivity under certain milieu conditions these possibilities provide a whole new platform for developing innovative dairy and other food products. Material sciences and biology are expected to have a comparable influence on food product engineering and product development like the methods of chemical engineering had in the past few decades. Considering the various dairy products around the world, it is notable that these depend on the functional properties of milks from other species than cow. On the other hand, the availability of other milks is limited even in the home countries of such products, for instance, mare's milk for the manufacture of koumiss in Turkey. Hence, another direction for developing new dairy products is trying to adapt the cow's milk composition to that of milks from other species. Again, membrane technologies may be able to modify the contents of the key dairy ingredients including the casein/whey protein ratio, thus also helping to develop the required food textures and microstructures that are depending on the functionality of individual proteins or combinations thereof. In this context, especially because of their nutritional value, the minor substances of milk are of equal importance and will find more attention in the near term future. Challenges ahead are linked to open questions regarding closed product streams within a factory or to find integrated concepts with outlet usage's for those remaining parts of a fractionated product that have no immediate value or utilisation.

## References

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential use of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6, 327–341.
- Baumgartner, C., Wilde, J., & Hinrichs, J. (2001). Modelling of hydrolysis of the residual lactose in fermented milk. *Milchwissenschaft*, 56(9), 508–512.
- Bäurle, H. W., Walenta, W., & Kessler, H. G. (1984). Herstellung von Magerquark mit Hilfe der ultrafiltration. *Deutsche Molkereizeitung*, 105(12), 356–363.
- Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84(Suppl. 1), 39–46.
- Bulca, S., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2001). Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU Munich, pp. 181–182.
- Clare, R. (1998). The benefits of CMP. *Dairy Industries International*, 63, 29–31.
- Dannenberg, F. (1986). *Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung*. Dissertation, Technische Universität München.
- Dannenberg, F., & Kessler, H. G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins. *Journal of Food Science*, 1, 258–263.
- Fertsch, B., Hinrichs, J., & Brummet, S. (2000). *Modifikation von Druckinduzierten Gelstrukturen aus Milchproteinen durch Variation der Druckabbaurate*. In: Annual Report Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel FML, TU München, pp. 150–151.
- Hinrichs, J. (2000). *Ultrahochdruckbehandlung von Lebensmitteln mit Schwerpunkt Milch—Phänomene, Kinetik und Methodik*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 3, Nr. 656, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Hinrichs, J. (2001). Thermisch und hydrostatisch induzierte Milchgele als Basis für neuartige Produkte. *Deutsche Milchwirtschaft*, 24, 1016–1020.
- Kersten, M. (2001). *Proteinfraktionierung mittels Membranverfahren*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 3, Nr. 709, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79–88.
- Lauber, S. (2002). *Beziehungen zwischen Struktur und Gelbildungseigenschaften posttranslational quervernetzter Milchproteine*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 14, Nr. 107, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Maubois, J. L., & Ollivier, G. (1992). Milk protein fractionation. In: *New applications of membrane processes*. IDF Monograph, Special issue 9201, IDF Brussels, 15–22.
- Neeser, J.-R. (2000). Milk protein hydrolysate for addressing a bone or dental disorder. International Patent No. WO 00/49885.
- Osterland, N., Andersen, S., & Ottosen, N. (1995). *Membrane filtration assembly*. Int. Patent WO 95/23639.
- Plock, J. (1994). *Zum Einfluss von Lactose auf die Denaturierung von Molkenproteinen in Molkenkonzentrat und auf die Ausbildung thermisch induzierter Gelstrukturen*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 14, Nr. 69, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Rademacher, B. (1999). *Hochdruckbehandlung von Milch—Untersuchungen zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen und deren kinetische Beschreibung*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 14, Nr. 96, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Rademacher, B., Werner, F., & Pehl, M. (2002). Effect of the pressurizing ramp on the inactivation of *Listeria innocua* considering thermofluidodynamical processes. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 3, 19–24.
- Schkoda, P., & Kessler, H. G. (1997). Das neue FML-Frischkäseverfahren. *Deutsche Milchwirtschaft*, 48(2), 36–41.
- Schreiber, R. (2000). *Funktionalität und Labgelbildung hocherhitzter Caseinmicellsuspensionen—Modellierung von Prozessparametern zur sicheren Käseherstellung*. Fortschr. Ber. VDI, Reihe 3, Nr. 644, Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Spiegel, T. (1999). *Thermische Denaturierung und Aggregation von Molkenproteinen in Ultrafiltrationsmolkenkonzentraten—Reaktionskinetik und Partikulieren im Schabewärmeaustauscher*. Dissertation, Technische Universität München, Shaker Verlag.
- Thomä, C., & Kulozik, U. (2002). Gewinnung und technologische Eigenschaften von Glykomakropeptid. Poster, Wissenschaftstagung Lebensmittel und Gesundheit, Freising-Weihenstephan, 26.2.2002.
- Tolkach, A., & Kulozik, U. (2001). Untersuchungen zur Denaturierungskinetik von  $\alpha$ -Lactalbumin. In: Innovationsfeld Lebensmittel—Beiträge zur Gemeinschaftsforschung. Bonn: Forschungskreis der Ernährungsindustrie FEI, pp. 42–59 and 149.
- Wilde, J., Baumgartner, C., Fertsch, B., & Hinrichs, J. (2001). Matrix effects on the kinetics of lactose hydrolysis in fermented and acidified milk products. *Chemical and Biochemical Engineering*, 15(4), 143–147.

# Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein contents

By Selda BULCA, Jeanette LEDER and U. KULOZIK

Technische Universität München, Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Weihenstephaner Berg 1, 85350 Freising, Germany. E-mail: Selda.Bulca@wzw.tum.de

The whey protein content of skim milk was reduced using microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) in a diafiltration (DF) mode, while keeping the casein concentration constant. The MF retentates obtained were heated in the temperature range of 110–140 °C. The objective of the study was to assess the impact of the heat treatment on the rennetability of milk at various whey protein levels. It was found that the higher the remaining amount of whey proteins and the higher the temperature, the more affected were coagulation time and gel strength. However, the standard gel formation properties could be obtained, which describe the comparable renneting properties of heated MF retentates with pasteurised milk despite the higher amount of remaining whey proteins, when the maximum temperature for the heating step is decreased. With a partial removal of whey proteins by 82%, which corresponded to a 3-fold diafiltration step, the MF retentates could be heated at 120 °C, while a 4-fold diafiltration of retentates allowed a heating temperature up to 130 °C. The temperature levels could be increased up to 140 °C, when the whey proteins were depleted approximately by 96%.

## Einfluss einer UHT- oder Hoherhitzung auf die Labelbildung von Milch mit unterschiedlichen Molkenprotein-konzentrationen

Mittels Mikrofiltration (MF) und Ultrafiltration (UF) wurde im Diafiltrations (DF)-Modus die Molkenproteinkonzentration in Milch bei konstanter Caseinkonzentration reduziert. Die MF-Retentate wurden zwischen 110 und 140 °C erhitzt. Ziel der Arbeit war, den Effekt der Hitzebehandlung auf die Labelbildung bei unterschiedlichen Molkenproteinkonzentrationen zu bestimmen. Je höher der Restmolkenproteingehalt und die Erhitzungstemperatur sind, desto stärker wird die Labelbildung der Käseemilch beeinträchtigt. Jedoch kann eine Standardlabelbildung trotz eines hohen Restmolkenproteingehaltes erreicht werden, wenn die Erhitzungstemperatur im Vergleich zu UHT-Bedingungen reduziert wird. Durch eine Entfernung der Molkenproteine um 82%, welche bei einem 3-fachen Diafiltrationsschritt erreicht wurde, können die MF-Retentate bei 120 °C erhitzt werden, während ein 4-facher Diafiltrationsschritt eine Erhitzung bis zu 130 °C erlaubt. MF-Retentate können bis auf 140 °C erhitzt werden, wenn eine Entfernung der Molkenproteine um 96% gewährleistet ist.

**21 Heat treatment** (rennet gel formation)

**21 Milcherhitzung** (Labelbildung)

## 1. Introduction

Spore formers can lead to the undesired effect of "late blowing" during the ripening of semi-hard and hard cheeses. According to SCHREIBER and HINRICH (1), heating conditions of 110 °C/24 s are sufficient to destroy spores from *Cl. tyrobutyricum* by 4 log units. However, heating of milk can impair its renneting properties depending on the severity of the heat treatment. It is well established that milk which was heated at temperatures above 70 °C has a longer coagulation time and forms a weaker curd than original unheated milk (2, 3, 4). The effect of heating on renneting is principally ascribed to the formation of complexes between denatured  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) and  $\kappa$ -casein (5). This complex impairs the hydrolysis of  $\kappa$ -casein by chymosin. It is generally agreed that the secondary phase of the rennet coagulation is more adversely affected by heating than the enzymatic phase. Denatured whey proteins on the surface of casein micelles sterically hinder the aggregation of renneted casein micelles (2, 3, 6). This effect is more pronounced the higher the heating temperature is, when skim milk is heated at temperatures in the range of 70–140 °C, the quantities of native  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La) decrease with an increase in heating time. Under the same conditions, the degree of denaturation of  $\beta$ -Lg is greater than for  $\alpha$ -La (7, 8, 9). According to DALGLEISH (5), the coagulation time of heated milk increases slowly at low levels of whey protein denaturation. Above 50% of  $\beta$ -Lg denaturation, the coagulation time increases considerably.

Studies of GHOSH *et al.* (10) showed that the rennet coagulation time of heated

milk increases linearly, for a degree of whey protein denaturation from 20 to 99%. Rennet induced-gelation was totally hindered when more than 60% whey proteins of cheese milk were denatured (11). In terms of the association of denatured whey proteins with casein micelles OLDFIELD *et al.* (9) reported that during the initial stages of heating in the range of 80–130 °C, mainly  $\beta$ -Lg associates with casein micelles, while  $\alpha$ -La begins to associate with the micelle after prolonged heating times. CORREDIG and DALGLEISH (12) showed that about 60% of  $\kappa$ -casein is shielded by  $\beta$ -Lg after heating at 120–140 °C for 4 s, while only 15% of  $\kappa$ -casein is blocked by  $\alpha$ -La. Because of the greater sensitivity of  $\beta$ -Lg to heat, in our investigations we determined the amount of denatured  $\beta$ -Lg B and the ratio of denatured whey proteins relative to the amount of casein. Apart from whey protein denaturation, other physico-chemical casein micelle changes in milk salts equilibria might also interfere with the renneting process, especially during the aggregation phase (2). Therefore, changes in the rennet coagulation time and curd firmness of heated milk could be counterbalanced by acidification or calcium addition prior to heating as described by 4, 13, 14, 15. It is well established that the heating causes the precipitation of calcium phosphate with a reduction of soluble serum calcium. A certain calcium concentration, however, is required for the formation of rennet gels (16, 17). Acidification of



heated milks causes a reduction in charge repulsion and increased calcium concentration solubilization (3, 18). However, neither the acidification nor the calcium addition could completely restore the original renneting properties especially gel firmness of heated milk (15). In other words, most of the heat-related changes must be assigned to the interaction of whey proteins and casein. Hence, the influence of whey protein denaturation on the renneting properties of milk is likely to be avoidable by the partial or complete removal of the whey proteins by using microfiltration (MF) in combination of ultrafiltration (UF) before heating, using the UF-permeate as a diafiltration medium. This method allows to deplete the whey protein of skim milk and should thus increase the rennetability of heated milk. However, no information is available as to the tolerable amount of remaining whey proteins such that the renneting properties of the partially whey protein depleted milk (coagulation time, gel strength) after heating remains comparable with unheated or pasteurised milk. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the influence of modified whey protein concentration, according to the number of diafiltration steps on the renneting properties.

**2. Materials and methods**

**2.1 Removal of whey proteins by microfiltration**

Pasteurised skim milk (72 °C, 15 s) was obtained from the local dairy. The UF and MF process was performed according to KERSTEN (19). Skim milk was fractionated using a MF (0.1 µm nominal pore size) membrane in the UTP mode (uniform transmembrane pressure) and diafiltered (DF) with UF-permeate to keep the lactose and salt concentrations constant. The MF/DF process was conducted by a 5-fold volume turn over. After each diafiltration step MF retentates were obtained and designated as MF-R 1 to MF-R 5.

Figure 1 visualises the concentration decrease of the individual whey proteins as a function of the number of diafiltration steps. After the diafiltration, the total whey protein content was reduced to 0.24 g.l<sup>-1</sup> (0.02%).

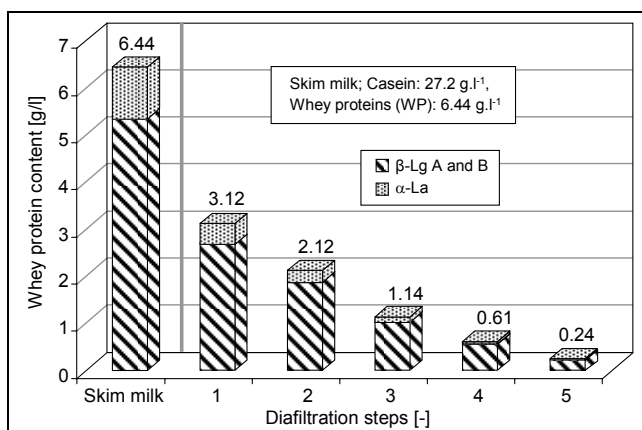


Fig. 1: Reduction of the whey protein content in skim milk as a function of the number of diafiltration steps by microfiltration using milk serum in the form of UF permeate as diafiltration medium

**2.2 Heating**

The heating was performed in a pilot heating plant using small tubes with a volume of 20 ml (stainless

steel). As heating medium saturated steam was used. The heating temperatures ranged between 110 and 140 °C for 10 s holding time. After heating, the samples were immediately cooled down to 20 °C.

**2.3 Protein content**

The protein content of the retentates was analysed using the nitrogen analyser FP-528 Series (Leco, Mönchengladbach, Germany). The whey protein content was determined by RP-HPLC according to BEYER (20), where the caseins and the denatured whey proteins were precipitated at pH 4.6 using 1 M HCl. After filtration, the concentration of remaining soluble, native whey proteins (β-Lg A and B, α-La) were measured. The denaturation degree of the whey proteins was calculated as the difference between the total whey protein concentration and the native whey protein concentration in relation to the total whey protein concentration. Figure 2 shows the chromatograms of heated and not heated milk samples. As can be seen β-Lg A and B fractions were denatured to almost 100 %, while α-la is still present in milk.

The casein content was calculated from the difference between the total protein content and the whey protein content. Because the total non-protein nitrogenous compounds (NPN) of milk is between 229 and 308 mg.kg<sup>-1</sup> (21), in our investigations the NPN content of the samples was considered negligible.

The total protein concentration of skim milk and of the 5 microfiltration retentates 1–5 were adjusted to 33.6 g.l<sup>-1</sup> using UF permeate prior to heating in order to avoid the effect of different protein concentrations on the renneting gel properties. The total protein concentrations of the retentates MF-R 1–MF-R 5 are shown in Fig. 3.

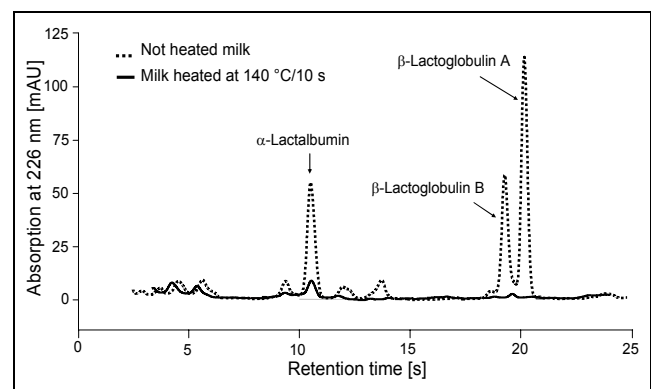


Fig. 2: RP-HPLC overlay chromatograms from heated (140 °C/10 s) and not-heated skim milk

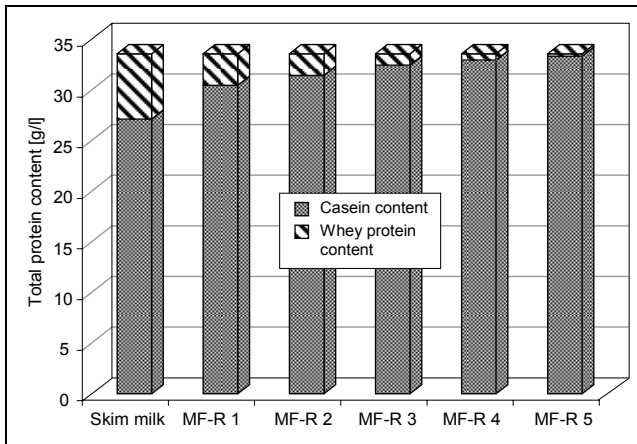


Fig. 3: Total protein content of MF retentates regarding casein and whey protein content

#### 2.4 Effect of the ultra high temperature on denaturation of $\beta$ -Lg B and on ratio of denatured whey proteins to casein

After heating, the denaturation degree of  $\beta$ -Lg B was determined and, in addition, expressed as the ratio of denatured  $\beta$ -Lg B to casein in the retentates, because  $\beta$ -Lg B is the more heat unstable than the  $\beta$ -Lg A and the  $\alpha$ -La (23) and thus the renneting properties of heated retentates strongly depend on its concentration. In our investigations, we observed that the denaturation degree of  $\beta$ -Lg B was between 83 and 100%, while the ratio of denatured  $\beta$ -Lg B to casein was in the range of 0.007–0.1 g.g<sup>-1</sup> depending on diafiltration steps and temperature applied.

#### 2.5 Renneting properties

The rennet coagulation time of the heat treated samples was analysed by the Gelograph (Gel Instrument AG, Germany). Before renneting, 0.02% CaCl<sub>2</sub> was added to the samples and the pH was adjusted to 6.5 using lactic acid (9%). The renneting was performed at 30 °C with 0.02% rennet addition (Standard plus 175, Chr. Hansen, Nienburg, Germany). To measure the gel firmness a Texture Analyzer (TA-XT2, Stable Micro Systems, Haslemore, England) was used. The resistance force was measured 60 min after incubation at 30 °C. A crossed wire (d=30 mm) was used as a probe to penetrate the rennet gel (volume: 60 ml). The renneting properties were defined as relative values in comparison to the absolute coagulation properties of the non-heated milks.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Rennet coagulation properties of heated MF-retentates

##### 3.1.1 Relative rennet coagulation time

The relative coagulation time (RCT) of MF-R 1 to MF-R 5 is shown in Fig. 4 as a function of the ratio of denatured  $\beta$ -Lg B to casein. The relative coagulation times of heated retentates were compared against the values of pasteurised (standard) cheese milk, *i.e.* a normalised value of “1” is obtained if the products behaved like standard milk. With increasing initial whey protein content and increasing temperature, the RCT increases. The lower the whey protein content and the lower the temperature, the lower is the RCT. Due to the higher whey protein content a higher level of complex

formation occurs between  $\beta$ -Lg B and  $\kappa$ -casein and thus the ratio of denatured whey proteins to casein increases which results in an increase of the RCT for MF-R 1 from 1.6 to 2.4. For MF-R 1 the denatured whey protein/casein-ratio is in the range of 0.084–0.1 g.g<sup>-1</sup>. The more diafiltration steps were conducted, the lower is the whey protein content of milk as well as the ratio of denatured whey proteins to casein. Consequently, reduced values for RCT close to 1 were found. This is the case for MF-R 5 with a ratio of denatured whey protein to casein of 0.007 g.g<sup>-1</sup>. Despite the fact that the values for RCT are close to “1” for MF-R 5 there seems to be a trend of increasing RCT the higher the heating temperature. Other heat related changes, beyond the effect of whey proteins upon denaturation might play a role in this case.

##### 3.1.2 Relative gel firmness

In Figure 5, the ratio of the denatured whey protein to the casein is plotted against the relative rennet gel firmness (RGF) of heated MF-retentates. In order to compare the gel strength of the samples with standard cheese-making conditions, the data are shown as relative values against the unheated sample. The RGF decreases with decreasing diafiltration steps or with increasing denatured whey protein/casein-ratio which leads to weaker rennet gel formation. For MF-R 1 almost no gel formation was detected. Independent of the temperature applied the samples remain almost liquid. MCMAHON *et al.* (6) and WAUNGAN *et al.* (22) showed that the lower gel strength of heated milks is presumably caused by the disruption of the continuity of the gel network structure. This results in a weakening of the structure and in softer gels. With the decrease in the concentration of the whey proteins or increase in the number of diafiltration steps, the relative gel firmness can be brought closer to the value of 1. However, with increasing temperature also MF-R 5 shows a slight decrease in the relative gel firmness despite the absence of  $\beta$ -Lg B, which was similarly observed by SCHREIBER (24), who brought this phenomenon in connection with heat-induced precipitation of soluble calcium.

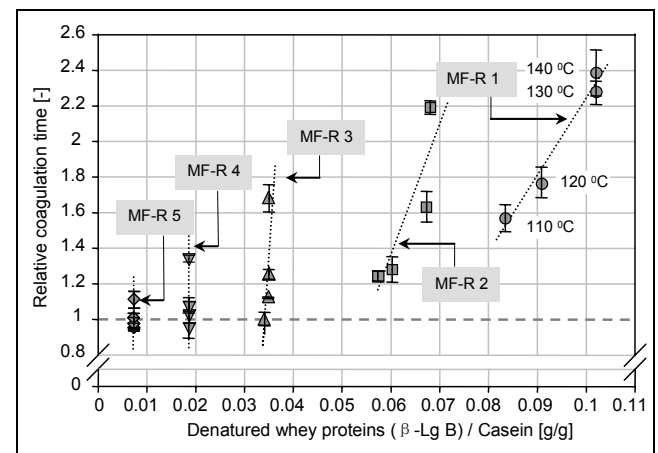


Fig. 4: Relative coagulation time of heated MF retentates as a function of denatured whey protein to casein ratio (The data points refer to the temperature conditions from 110 °C–140 °C; each set of experiments for MF-

R 1-5 shows the data points from bottom (110 °C) to the upper point (140 °C).

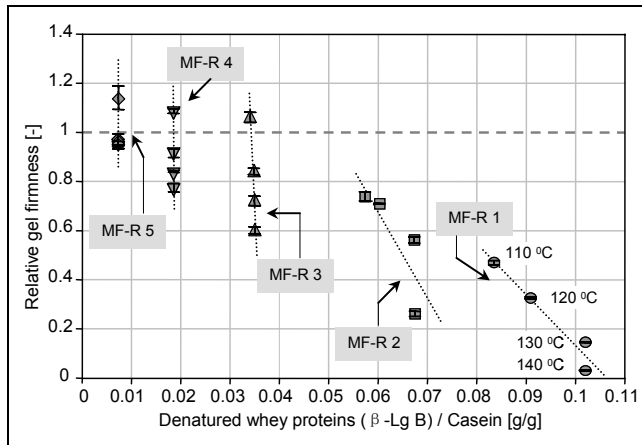


Fig. 5: Relative gel firmness of heated MF retentates as a function of denatured whey protein to casein ratio (Each set of experiments for MF-R 1-5 shows the data points from upper (110 °C) to the bottom point (140 °C))

**4. Conclusions**

The heat treatment of cheese milk above pasteurisation conditions would be desirable in order to inactivate spores from microorganisms which induce the late blowing phenomenon during the ripening of hard or semi-hard cheeses. Such a heat treatment, however, impairs the rennetability of the cheese milk due to the whey protein denaturation on the casein micelle surfaces. An alternative was assessed to enable the heat treatment at higher levels, namely the partial or complete removal of whey proteins by microfiltration in combination with diafiltration with milk serum (UF-permeate) as a diafiltration medium.

It was shown that a partial removal of the whey proteins allows for an increased heating temperature, depending on the depletion level. For a removal by 82 % the cheese milk can already be treated at 120 °C/10 s, which is above the temperature of 110 °C/24 s, sufficiently high for the inactivation of spores from *Cl. tyrobutyricum* by 4 log units. An almost complete removal of the whey proteins (96%) allows temperature levels up to 140 °C. In conclusion, a set of combinations regarding level of remaining whey protein level and heating temperature can be proposed, such that cheeses without the risk for late blowing could be produced (Table 1). This provides an alternative to the addition of nitrate or bacto-fugation, which in many cases, are both applied in combination.

Number of diafiltration steps [-]	Remaining amount of whey proteins [g/l]	Heating temperature [°C]/10 s
3	1.14	120
4	0.61	120, 130
5	0.24	120, 130, 140

**Acknowledgements**

This work was supported by the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn), the AiF and the Ministry of Economics and Labour. AiF-Project No.: 12718 N.

(Technologies for cheese from UHT treated milk – Increased product safety without microbicidal additives)

**5. References**

- (1) SCHREIBER, R., HINRICHS, J.: Lait **80** 33–42 (2000)
- (2) VAN HOOYDONK, A.C.M., DE KOSTER, P.G., BOERRIGTER, I.J.: Neth. Milk Dairy J. **41** 3–18 (1987)
- (3) LUCEY, J.A.: In: Heat induced changes in milk (2<sup>nd</sup> ed.), IDF Brussels, Belgium, Special Issue **9501** 171–187 (1995)
- (4) SINGH, H., WAUNGANA, A.: Int. Dairy J. **11** 543–551 (2001)
- (5) DALGLEISH, D.G.: Milchwissenschaft **45** 491–494 (1990)
- (6) MCMAHON, D.J., YOUSIF, B.H., KALAB, M.: Int. Dairy Journal **3** 239–256 (1993)
- (7) DANNENBERG, F., KESSLER, H. G.: J. Food Sci. **53** 258–263 (1988)
- (8) LAW, A.J.R., HORNE, D.S., BANKS, J.M., LEAVER, J.: Milchwissenschaft **49** 125–129 (1994)
- (9) OLDFIELD, D.J., SINGH, H., TAYLOR, M.W.: Int. Dairy J. **8** 765–770 (1998)
- (10) GHOSH, B.C., STEFFL, A., KESSLER, H.-G.: Milchwissenschaft **51** 28–31 (1996)
- (11) STEFFL, A.: Ph.D. Thesis., Technische Univ. München, Germany (1999)
- (12) CORREDIG, M., DALGLEISH, D.G.: Food Res. Int. **29** 49–55 (1996)
- (13) MARSHALL, R.J.: J. Dairy Res. **53** 313–322 (1986)
- (14) BANKS, J.M., STEWART, G., MUIR, D.D., WEST, I.G.: Milchwissenschaft **42** 212–215 (1987)
- (15) LUCEY, J.A., GORRY, C., FOX, P.F.: Agric. Sci. Finl. **2** 361–368 (1993)
- (16) DALGLEISH, D.G.: J. Dairy Res. **50** 331–340 (1983)
- (17) NAKAMURA, K., NIKI, R.: Biorheology **30** 207–216 (1993)
- (18) SINGH, H., SHALABI, S.I., FOX, P.F., BERRY, A.: J. Dairy Res. **55** 205–215 (1988)
- (19) KERSTEN, M.: Fortschritt-Bericht, VDI Reihe 3, Nr. 709, VDI Verlag, Düsseldorf, Germany (2001)
- (20) BEYER, H.J.: Ph.D. Thesis., Technische Univ. München, Germany (1990)
- (21) WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M.A.J.S.: In: Dairy Technology, Marcel Dekker, Inc. New York-Basel, 99–104 (1999)
- (22) WAUNGANA, A., SINGH, H., BENNETT, R.J.: Food Res. Int. **31** 645–651 (1998)
- (23) TÖPEL, A.: In: Chemie und Physik der Milch (2. Aufl.) Leipzig, VEB-Fachbuchverlag, 128–166 (1981)
- (24) SCHREIBER, R.: Int. Dairy J. **11** 553–558 (2001)

# A comparison of low-intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT heat pre-treatment

Qin Wang\*, Selda Bulca, Ulrich Kulozik

*Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universität München, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany*

Received 22 February 2005; accepted 30 December 2005

## Abstract

Ultrasonic and oscillating rheological methods were applied to investigate the effects of heat pre-treatment at Ultra-High-Temperatures on the rennet gel formation of a whey-protein-free casein solution. By comparison, the ultrasonic velocity was found to be sensitive to measure the enzymatic hydrolysis by rennet and the following aggregation process, but not as sensitive to detect the formation of a casein gel. In contrast, the oscillating rheological method was not sensitive enough to detect the enzymatic hydrolysis, but more suitable to characterize the formed gel network. A linear correlation was found between the coagulation times determined by these two methods.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Ultrasound; Oscillating rheology; Rennet gelation; Casein; UHT treatment

## 1. Introduction

Rennet gel formation of casein is known to be comprised of three successive steps. Firstly, the rennet enzyme hydrolyses the hydrophilic caseinomacropeptide (CMP) from the casein micelle. The hydration state of casein micelles thus changes due to the loss of the hydrophilic part of  $\kappa$ -casein on its surface, and the radius of casein micelles shrinks (De Kruif & Holt, 2003). Subsequently, the casein micelles start to aggregate due to increased hydrophobicity of their surfaces. Finally, the aggregates form a three dimensional gel network. The rennet gel formation and properties of the formed gel can be influenced by many factors, such as calcium concentration, pH, and heat treatment of the milk.

A variety of different methods exists to investigate the milk gel formation: oscillatory rheometry (Bohlin, Hegg, & Ljusberg-Wahren, 1984), thermal conductivity (Hori, 1985), refractometry (Korolczuk & Maubois, 1988), and dynamic light scattering (Horne & Davidson, 1990), to name a few.

In the last few years ultrasound was also used to investigate the milk gel formation (Benguigui, Emery, Durand, & Busnel, 1994; Corredig, Alexander, & Dalgleish, 2004; Gunasekaran & Ay, 1994; Nassar, Nongailard, & Noël, 2001, 2004) with inconsistent results. Gunasekaran and Ay (1994) investigated rennet milk coagulation using ultrasound at a frequency of 1 MHz and found that the ultrasonic velocity and attenuation decrease during coagulation of casein. In contrast, Corredig et al. (2004) observed an increase in ultrasonic velocity and attenuation at higher frequencies (14.667 and 7.835 MHz) during milk coagulation by rennet. At 200 KHz Nassar et al. (2004) also measured an increase in ultrasonic velocity. Dwyer, Donnelly, and Buckin (2005) could at 14.5 MHz clearly measure a decrease of ultrasonic attenuation during enzymatic cleavage of CMP. Corredig et al. (2004), however, measured little change in attenuation at both 7.835 and 14.667 MHz during enzymatic phase.

Thus, low intensity ultrasound as a novel method seems to offer a new option to obtain more information regarding the rennet action in its primary phase and the secondary aggregation phase. In the studies mentioned above the focus was on the ultrasonic measurement alone. In order to

\*Corresponding author. Tel.: +49 8161 715056; fax: +49 8161 714384.  
E-mail address: [qin.wang@wzw.tum.de](mailto:qin.wang@wzw.tum.de) (Q. Wang).

use ultrasonic measurement as a new analysis method, it is important to assess the quantitative correlation between this method and an established method such as rheology.

The most frequently used parameters in ultrasonic measurements are the ultrasonic velocity and attenuation. For compressional waves the ultrasonic velocity  $v$  is a function of the bulk modulus  $K'$  and the storage modulus  $G'$  of the medium (Audebrand, Doublier, Durand, & Emery, 1995):

$$v = \sqrt{\left(K' + \frac{4}{3}G'\right) \frac{1}{\rho}} \quad (1)$$

where  $v$  stands for the ultrasonic velocity,  $K'$  for the bulk modulus,  $G'$  for the storage modulus and  $\rho$  for the density.

The bulk modulus  $K'$  is the reciprocal of the compressibility  $\kappa$ . An important contribution to the compressibility  $\kappa$  is the hydration of molecules. The hydration usually has a negative contribution to the compressibility since water in the hydration shell is less compressible than bulk water (Gekko & Noguchi, 1979; Kharakoz & Sarvazyan, 1993; Nölting, Jiang, & Sligar, 1993). For fluid systems and weak gels  $G'$  is much smaller than  $K'$  (Povey, 1997). It is to be noticed that  $G'$  obtained from the rheological measurements at low frequency (normally <100 Hz) cannot be compared to those from ultrasonic measurements in the MHz range (Audebrand et al., 1995).

The ultrasonic attenuation describes the energy loss of an ultrasonic wave when it travels through a medium. This term includes the amount of ultrasonic energy converted into heat due to fluid viscosity, thermal conduction and molecular relaxation and the amount scattered by a discontinuity in heterogeneous systems. The attenuation provides information about the physicochemical properties of materials, e.g. concentration, viscosity, molecular relaxation, and microstructure (McClements, 1995).

The purpose of this study was to investigate the ultrasonic method in comparison with rheometry as an established method to describe the enzymatic renneting process, i.e., the action of the rennet enzyme on the casein fraction of milk protein. The casein solution used in this study was milk, depleted of whey proteins by means of membrane filtration. This solution was preheated at temperatures of 120, 130, or 140 °C for various heating times. Pre-heating is known to affect the renneting process (Bulca & Kulozik, 2003, 2004; Bulca, Leder, & Kulozik, 2004), and therefore, differences in the ultrasonic assessment were expected.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Production of casein solution and heating experiments

Pasteurized skim milk (72 °C, 15 s) was obtained from a local dairy. The whey proteins were removed by using microfiltration (MF) in combination with ultrafiltration (UF) according to Kersten (2001). The resulting “whey

protein-free” casein solution with 3% (w/w) casein and ≤0.02% (w/w) whey protein had similar lactose and salt contents as the original skim milk. The total protein content of the samples was measured by a nitrogen analyser FP-528 (Leco, Mönchengladbach, Germany) using the Dumas method. The whey protein content was determined by RP-HPLC (Beyer & Kessler, 1989). The casein solution was stored at –18 °C prior to use.

The MF Module (APV, Silkeborg, Denmark) has 7 multi-channel elements (SCT, Bazet, France) with 19 channels (total area 1.68 m<sup>2</sup>) each. The membrane material is  $\alpha$ -aluminium oxide with an active layer of zirconium oxide. The nominal pore-size of the membrane was 0.1  $\mu$ m. The MF plant works according to the uniform transmembrane pressure (UTP) principle, which reduces the surface layer formation and therefore allows a higher permeation flux compared to traditional cross-flow microfiltration. The UF module (DSS, Nakskov, Denmark) consists of a polysulphone membrane with a total area of 3 m<sup>2</sup> and the molecular mass cut-off of 25,000 Da.

The pre-treatment by heat under UHT conditions of the casein solution was carried out in small stainless steel tubes with a volume of 20 mL in a lab scale heating plant. The casein solution was pre-treated at 120, 130, or 140 °C for up to 300 s.

### 2.2. Sample preparation for the analysis

The casein solution, unheated or heated under variation of the UHT heating temperature and time, was tempered at 30 °C. After the temperature equilibrium was reached, 0.02% CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the casein solution. Then the pH value of the solution was adjusted to 6.5 using 9% lactic acid (Merck). This solution was used as starting solution for the renneting experiments. The renneting was performed at 30 °C with 0.02% rennet addition. According to the specification from the manufacturer, the rennet extract (Standard plus 175, Chr. Hansen, Nienburg, Germany) consisted of 80% chymosin and 20% pepsin. It was applied in the form of a 5% solution to adjust the rennet concentration.

### 2.3. Rheological measurements

Casein gels are viscoelastic (Bohlin et al., 1984) and their rheological properties upon small deformation can be determined using low amplitude dynamic oscillation. An AR 1000 N Rheometer (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) was used to measure the dynamic rheological properties of the samples. The measuring geometry consisted of an acryl cone (diameter 6 cm and 2° angle) and a plate. Two hundred microlitre of 5% rennet solution was added to 50 g casein solution with adjusted CaCl<sub>2</sub> concentration, pH, and temperature. After 30 s stirring the sample was transferred to the plate of the rheometer with an adjusted temperature of 30 °C. The

storage modulus  $G'$  of the sample was measured during 60 min at a frequency of 1 Hz. The strain was 0.03.

In this work, the coagulation time was considered as the time necessary for the gel to reach a  $G'$  value of 1 Pa according to Walsh-O'Grady, O'Kennedy, Fitzgerald, and Lane (2001) and Srinivasan and Lucey (2002). The gel strength was defined as the storage modulus after 60 min oscillation time.

#### 2.4. Ultrasonic measurement

The ultrasonic measurements were carried out by the ultrasonic device ResoScan (TF Instruments, Heidelberg, Germany). The ResoScan system measures the ultrasonic velocity  $v$  and the attenuation  $\alpha f^{-2}$ , where  $\alpha$  is the attenuation coefficient of the sample and  $f$  the frequency of the ultrasonic wave, respectively. The ResoScan system applies the resonance technique. The sample cells are constructed as ultrasonic resonators in which a standing compressional wave is generated. The ultrasonic transducers are made of lithium niobate. During the initialization a frequency range of about 7–9 MHz is scanned. By locating the resonance frequencies within this range, the order of the resonance peaks is calculated. The system automatically selects an optimal resonance peak (the master peak) for the measurement. From the frequency and the shape of this peak, the ultrasonic velocity and attenuation are calculated. For the measurements in this work the selected master peak was at 7.8 MHz.

The ResoScan system uses special intrinsic procedures to calculate the parameters velocity and attenuation. The ultrasonic velocity  $v$  is calculated from the fundamental frequency  $f_1$ , which is the lowest resonant frequency, and the path length  $d$ :

$$v = 2df_1. \quad (2)$$

The fundamental frequency  $f_1$  is indirectly obtained by measuring the frequency of the maximum of the master resonance peak  $f_n$ , from which  $f_1$  can be determined. In the ideal model of the ultrasonic resonator the resonances are described by harmonic overtones of the fundamental frequency. Hence,  $f_n$  should be an integer multiple of the fundamental frequency  $f_1$ . In the real ultrasonic resonator, however, the measured frequencies defer from the theoretical resonance frequencies. These deviations are used to evaluate the series of the real resonances by system-specific mathematical correction routines integrated in the software of the ResoScan system (Funck & de Maeyer, 2001).

The attenuation  $\alpha f^{-2}$  is determined by the ResoScan system as the total loss of energy induced by the sample itself including the scattering by large particles. The energy loss that occurs due to other effects, e.g. scattering, refraction and absorption by the resonator, is considered by a corrective factor. The ultrasonic intensity in the sample is  $10^{-4}$ – $5 \times 10^{-3}$  W cm $^{-2}$ .

The ResoScan has two closed sample cells, one sample cell and one reference cell, each with a path length of

7.0 mm. Evaporation is avoided by the closed lids. The sample volume of the cells is 180  $\mu$ L each. Heating or cooling scans can be performed with a rate of 100–350 m $^{\circ}$ C min $^{-1}$  via Peltier elements. The absolute accuracy of the thermostat temperature is 10 m $^{\circ}$ C. The resolution of the ultrasonic velocity is 0.001 m s $^{-1}$ . Repeatability of absolute velocity after automatic reinitialization is  $\pm 0.01$  m s $^{-1}$ . The resolution of ultrasonic attenuation is 1–3%, depending on the magnitude of attenuation.

Prior to the addition of rennet, both sample cells of ResoScan were filled with 3% casein solution with adjusted CaCl $_2$  concentration, pH, and temperature by means of a syringe, for the initialization of the system to select the resonance peak. After completion of this procedure, 200  $\mu$ L of 5% rennet solution was externally added to 50 g of the starting solution with adjusted CaCl $_2$  concentration, pH, and temperature and stirred for 30 s. Subsequently, the casein solution in cell 2 was replaced by rennet-containing casein solution. In order to determine the effect of rennet alone and to minimize the effect of even small temperature fluctuations, the differences of ultrasonic velocity and attenuation between a sample, casein solution with rennet, and a reference, casein solution without rennet, were used instead of the absolute values  $v$  and  $\alpha f^{-2}$ . The differences are abbreviated as  $\Delta v$  and  $\Delta(\alpha f^{-2})$ , respectively. The ultrasonic velocity difference  $\Delta v$  and attenuation difference  $\Delta(\alpha f^{-2})$  were measured against time. In total, the measurement was started approximately 120 s after adding the rennet in both rheological and ultrasonic measurements.

#### 2.5. Data analysis

The differentiation of  $\Delta v$  against time  $d(\Delta v)/dt$  was calculated by using the software Mathcad 2001i Professional from MathSoft Engineering & Education, Inc. (Cambridge, Massachusetts, USA). A smoothed curve was created by calculating an average value of several consecutive data points.

#### 2.6. Determination of the CMP content in serum during renneting

Fifty millilitre of the same whey-protein-free casein solution with adjusted pH and Ca $^{2+}$  content as used for the ultrasonic and rheological measurements was equilibrated at 30  $^{\circ}$ C. After addition of 200  $\mu$ L 5% rennet and 30 s stirring, the sample was divided and transferred in 10–11 tubes with 4 mL solution in each tube. After different incubation times at 30  $^{\circ}$ C, the renneting reaction in the tubes was stopped by adding 1 mL 15% (w/w) perchloric acid (Merck). The precipitated casein was separated by centrifugation at 3000  $\times g$  for 15 min. The CMP content in the supernatant was determined by RP-HPLC according to Thomä, Krause, and Kulozik (2006). A sample without rennet addition was prepared in the same way as a control. This sample was considered as the sample with incubation time 0. The relative CMP release was calculated according

to following equation:

$$\text{rel. CMP release} = \frac{\text{CMP content in sample}}{\text{max. attainable CMP content}} \cdot 100\%. \quad (3)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Ultrasonic velocity and attenuation during rennet gel formation

The ultrasonic velocity and attenuation over time during rennet gel formation was measured in an unheated 3% casein solution with 0.02% rennet addition. The typical course of these two dependent variables is shown in Fig. 1. In order to eliminate slight sample to sample variations between measurements, the  $\Delta v$  and  $\Delta(\alpha f^{-2})$  value is normalized (index  $n$ ) as  $(\Delta v)_n$  and  $(\Delta(\alpha f^{-2}))_n$  by subtracting the respective starting value. A two-stage increase of the ultrasonic velocity in the gel formation process is observed. The first increase can be correlated to the enzymatic hydrolysis. In this stage, the rennet enzyme cuts off the hydrophilic hair, CMP, from the surface of the casein micelle. This causes changes in the hydration state of casein micelles and leads to a more hydrophobic surface. On the other hand, the CMP released into the solution has a larger surface area accessible to water. The overall hydration degree of the casein solution increases. This leads to an increase in ultrasonic velocity, as shown in Fig. 1 during the first increase of  $\Delta v$ . After a certain amount of the total CMP is cut off, the casein micelles begin to coagulate. Green, Hobbs, Morant, and Hill (1978) found that the viscosity of rennet treated milk begins to rise when the enzymatic reaction is about 86% completed. In the ultrasonic measurement a second increase in ultrasonic velocity in parallel with the coagulation phase can be observed. Corredig et al. (2004) and Nassar et al. (2004)

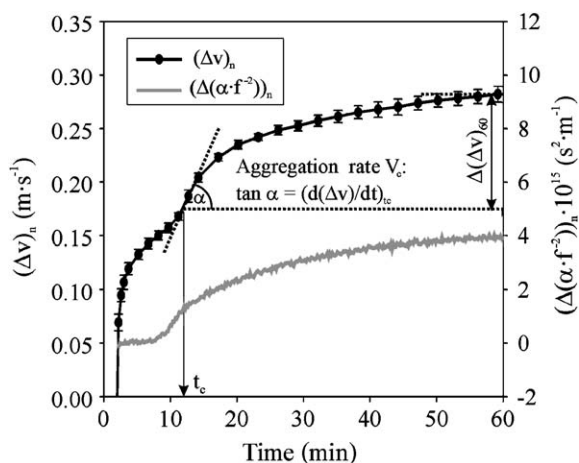


Fig. 1. Course of normalized ultrasonic velocity and attenuation,  $(\Delta v)_n$  and  $(\Delta(\alpha f^{-2}))_n$ , over time during rennet gel formation and definitions of different parameters for the characterization gel formation. The error bars are the confidence intervals ( $p \leq 0.05$ ) calculated from 5 measurements of the ultrasonic velocity in 3% unheated casein solution with 0.02% rennet.

considered this increase in ultrasonic velocity connected with the increased elasticity of the sample. Another possible reason for the increase in the ultrasonic velocity is the scattering effect due to the increased particle size. When a sound wave is incident on a spherical particle, a proportion of the energy is scattered from the forward direction of the wave. The phase changes in the forward component of the wave manifest themselves as a change in the apparent velocity of the sound wave. Thus, the velocity becomes a function of particle size (Pinfield, Povey, & Dickinson, 1995).

In order to assess the reproducibility of the ultrasonic measurement, five measurements of the ultrasonic velocity in rennet-treated unheated casein solution were carried out over time. In Fig. 1 the error bars are the confidence intervals ( $p \leq 0.05$ ). As can be seen there is a good reproducibility of the ultrasonic velocity measurement and the renneting process. The coagulation time  $t_c$  determined from these five measurements was  $12.67 \pm 0.39$  min.

According to the course of  $\Delta v$  over time (Fig. 1) we defined the parameters for the characterization of coagulation process as following:

- The coagulation time  $t_c$  as the time at the inflexion point. If  $\Delta v$  is differentiated against time, this point corresponds to the peak maximum of the curve  $d(\Delta v)/dt = f(t)$ .
- The aggregation rate  $V_c$  as the slope of the curve  $\Delta v = f(t)$  at time  $t_c$  which corresponds to  $d(\Delta v)/dt$  at the point of  $t_c$ .
- The  $\Delta(\Delta v)_{60}$  as  $\Delta v$  at 60 min after rennet addition ( $\Delta v_{60 \text{ min}}$ ) subtracted by  $\Delta v$  at  $t_c$  ( $\Delta v_{t_c}$ ), because the starting point of the curve immediately after adding the rennet enzyme could not be detected, as described above.

During the enzymatic hydrolysis the ultrasonic attenuation changes only slightly at the frequency used. This agrees with the results of Corredig et al. (2004) who measured at 7.835 MHz. According to the scattering theory, particle size influences the attenuation. The hydrodynamic length of CMP is 7 nm (De Kruif, 1999). Compared with the wave length at the frequency used (about 0.2 mm) the decrease in diameter of the casein micelles due to enzymatic cleavage is relatively small, so that this change could not be detected by measuring ultrasonic attenuation. This change could probably be detected by ultrasound at higher frequencies, which has a smaller wavelength and is therefore sensitive to smaller diameter changes of particles. Dwyer et al. (2005) measured a decrease of attenuation in the enzymatic phase at different frequencies between 2.5 and 14.5 MHz. However, Corredig et al. (2004) could not measure this decrease of attenuation at 7.835 or 14.665 MHz. The different results may be caused by the milk used for renneting. Dwyer et al. (2005) used a skim milk prepared from a skim milk

powder. In contrast, Corredig et al. (2004) used fresh skimmed milk. Casein micelles have sensitive structure. Any pre-treatment may cause changes in hydration state of the casein micelles and its renneting properties. With the beginning of the coagulation process the attenuation  $\Delta(\alpha f^{-2})$  increases more steeply, which correlates with the increase of particle size due to aggregation. This increase was also measured by both Dwyer et al. (2005) and Corredig et al. (2004).

### 3.2. Influence of heating temperature and time

In order to assess the effects of the heat-treatment on the renneting action and the capability of the ultrasonic technique to detect the difference in rennetability in comparison to rheology, the renneting process of the samples preheated at 120, 130, or 140 °C for up to 300 s was tracked by the ultrasonic and rheological measurements. The renneting properties of the unheated casein solution were used for comparison.

#### 3.2.1. Rheological measurements

Fig. 2 shows the change of  $G'$  in casein solutions unheated and pre-treated by heat at 120, 130, or 140 °C for 100 s during renneting. In the samples unheated and pre-heated at 120 or 130 °C for 100 s the storage modulus  $G'$  remains constant at first. This correlates with the primary enzymatic phase. After a certain time, which depends on the extent of the heat pre-treatment,  $G'$  starts to increase. This increase indicates the beginning of the coagulation of casein micelles. The higher the temperature of the heat treatment, however, the slower the increase of  $G'$ . This clearly indicates an effect of the heat treatment on the casein micelles, in spite of the negligible low concentration of the whey proteins, which in the past were made responsible for the negative effect of heat treatment at higher temperature on the renneting action. Bulca et al.

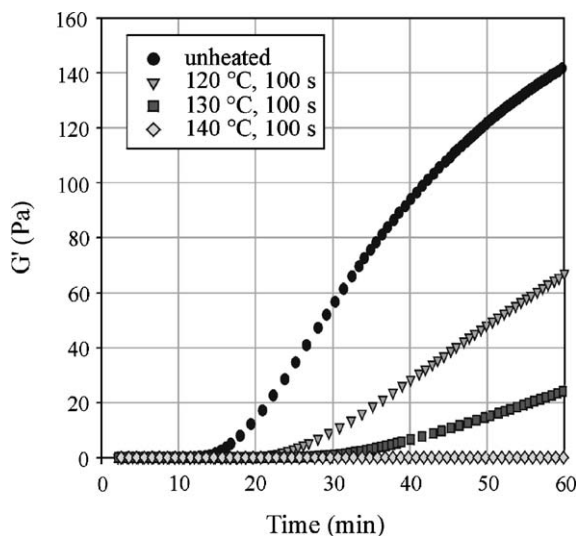


Fig. 2. Influence of the pre-heating conditions of the casein solution on the storage modulus  $G'$  during gel formation.

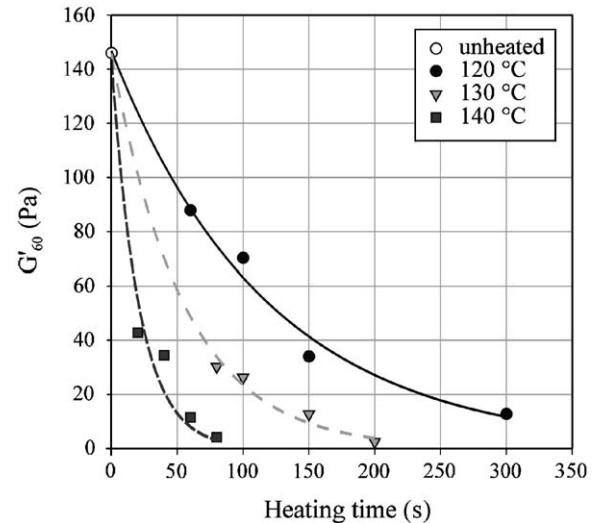


Fig. 3.  $G'$  value of the rennet gel at 60 min after rennet addition ( $G'_{60}$ ) depending on the pre-heating condition of the casein solution.

(2004) observed that with decreasing whey protein concentration in skim milk the influence of a UHT-pre-heating on the coagulation time and gel strength becomes smaller, but is still detectable. Bulca and Kulozik (2003, 2004) measured an increased dissociation of  $\alpha_s$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein from micelles into the serum and an increased polymerization degree of the casein fractions with increasing intensity of UHT treatment. These changes indicate the sensitivity of the casein micelle to heat, which has an effect on the rennet gel formation.

We defined the storage modulus  $G'$  60 min after start of the measurement ( $G'_{60}$ ) as a parameter for the strength of gel formed. The  $G'_{60}$  values are plotted against the heating time in Fig. 3. It can be seen that  $G'_{60}$  decreases with increasing heating time and temperature. This indicates that, the higher the temperature and the longer the heating time, the weaker the gel formed.

The coagulation time  $t_c$ , defined as the time at  $G' = 1$  Pa, is also plotted against heating time at different temperatures (Fig. 4). A linear increase of the coagulation time  $t_c$  with increasing heating time of the pre-heating step was found for all pre-treatment temperatures.

#### 3.2.2. Ultrasonic measurement

Fig. 5 shows the change of the normalized attenuation  $(\Delta(\alpha f^{-2}))_n$  over time after rennet addition in samples unheated and pre-treated at 120, 130 or 140 °C for 100 s during rennet gelation. The increase of the attenuation becomes weaker with increasing intensity of pre-heating. This confirms the poor coagulation capability of preheated samples. The characteristic shape of the curve  $(\Delta(\alpha f^{-2}))_n$  as a function of time is similar to that of  $G'$  as plotted in Fig. 2. But the increase of the ultrasonic attenuation appears much earlier than that of the  $G'$ . The ultrasonic method seems to be more sensitive to detect the starting of the aggregation process. The rheological measurement,



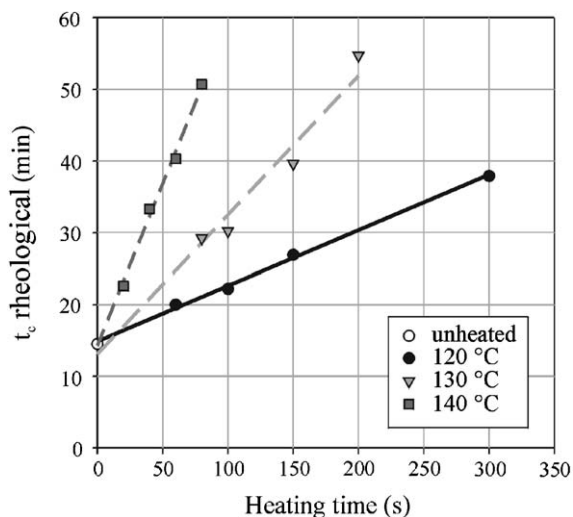


Fig. 4. Influence of the pre-heating condition of the casein solution on the coagulation time  $t_c$  determined by the oscillating rheological method.

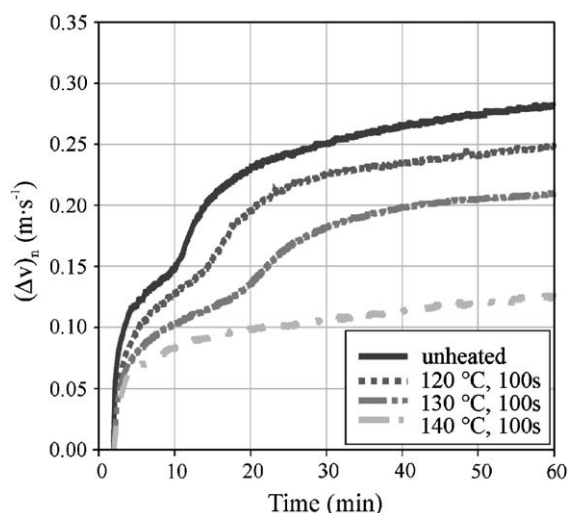


Fig. 6. Change of normalized velocity difference between the sample and the reference  $(\Delta v)_n$  over time during renneting in casein solutions unheated and pre-heated at 120, 130 or 140 °C for 100 s.

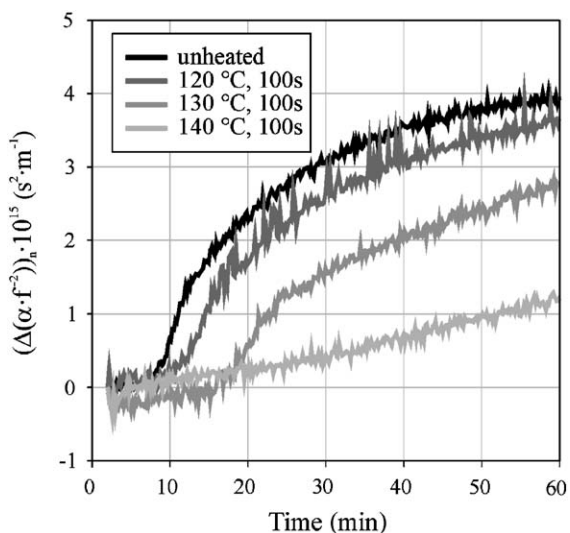


Fig. 5. Change of normalized attenuation difference between the sample and the reference  $(\Delta(\alpha \cdot r^2))_n$  over time during renneting in casein solutions unheated and pre-treated at 120, 130 or 140 °C for 100 s.

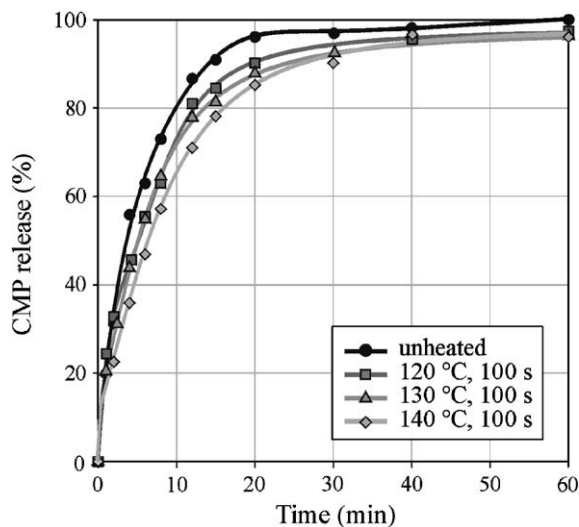


Fig. 7. Relative CMP release depending on the incubation time of rennet in 3% casein with 0.02% rennet addition at 30 °C.

however, cannot detect a change in  $G'$  until a certain extent of the aggregation is reached. Similar to  $G'$  the increase of the ultrasonic attenuation decreases with increasing intensity of the pre-heating. This indicates that the higher the intensity of pre-heating is, the slower the coagulation process is.

In Fig. 6,  $(\Delta v)_n$  is plotted against the time after rennet addition. The different slopes of the first increase in  $(\Delta v)_n$  indicates that pre-heating affects the enzymatic phase, too. To assess the effect of pre-heating on the enzymatic cleavage of CMP, the CMP (glycosylated and non-glycosylated) content released into the serum was determined during renneting. The relative CMP release is plotted against the incubation time in Fig. 7. With increasing heating intensity, the CMP cleavage was

decelerated. This explains the different slopes of the first increase in  $(\Delta v)_n$  and confirms the hypothesis that the first increase correlates with the CMP cleavage. Heating at high temperature causes modifications of casein micelles even in absence of whey proteins, e.g., dissociation of casein micelles (Aoki, Suzuki, & Imamura, 1974) and cross-linking reactions on the surface or within the micelle (Bulca & Kulozik, 2004). These modifications of casein micelles may impair the access of the rennet enzyme to the binding sites at the  $\kappa$ -casein.

Fig. 6 also shows that the higher the extent of the heat pre-treatment is, the later the second increase of  $(\Delta v)_n$  occurs. In the sample heated at 140 °C for 100 s the second increase of  $(\Delta v)_n$  disappeared. This indicates that the casein micelles were unable to form a coagulum.

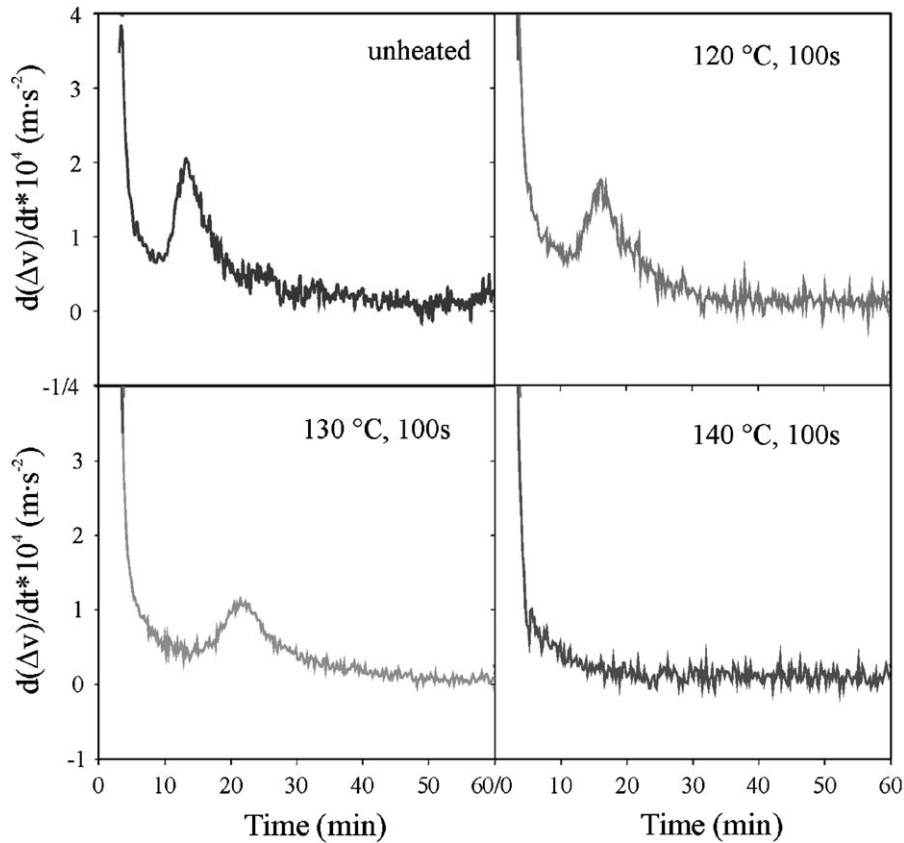


Fig. 8. Differentiated velocity difference between the sample and the reference  $d(\Delta v)/dt$  in unheated and pre-heated casein solutions over time during renneting process.

In order to detect the time  $t_c$  more clearly, the slopes of the curve in Fig. 6 were assessed as  $d(\Delta v)/dt$ . The unheated sample and the samples heated at 120, 130, or 140 °C for 100s show different patterns (Fig. 8). Both the peak maximum (the aggregation rate  $V_c$ ) and the time at peak maximum (the coagulation time  $t_c$ ), depend on the intensity of heat treatment.

According to the definitions given above, the coagulation time  $t_c$ , the aggregation rate  $V_c$ , and the  $\Delta(\Delta v)_{60}$  value of the heated samples at different temperatures and heating time were obtained. The influence of heat treatment on these parameters is demonstrated below.

As can be seen in Fig. 9 the coagulation time increases linearly with increasing temperature and increasing heating times. The aggregation rate decreases linearly with increasing extent of heat pre-treatment (Fig. 10).

In Fig. 11, the  $\Delta(\Delta v)_{60}$  values derived from ultrasonic measurements depending on the heat treatment are plotted. The  $\Delta(\Delta v)_{60}$  values show a decrease with increasing heating intensity. Although the decreasing trend of  $\Delta(\Delta v)_{60}$  was represented by a line in Fig. 11, the measurement points are scattered relatively broadly around this trend, compared to what was observed with rheological measurements. As it shown in Fig. 11 the  $\Delta(\Delta v)_{60}$  values are generally very low. This indicates that the gel formation causes only a small change in the ultrasonic velocity. According to Eq. (1), the

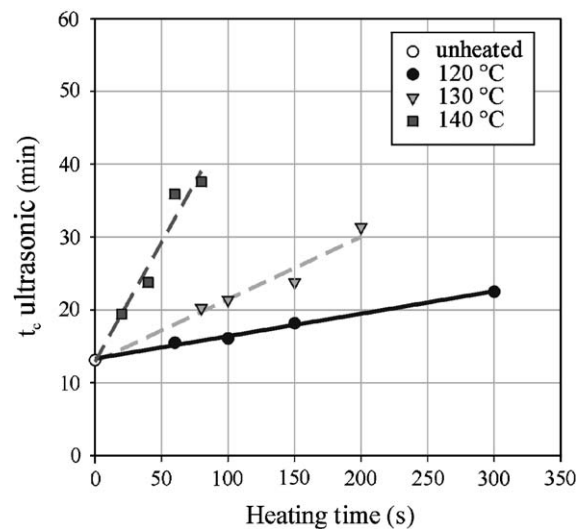


Fig. 9. Coagulation time  $t_c$  determined by ultrasonic measurements depending on the pre-heating condition of the casein solution.

ultrasonic velocity of compressional ultrasound is influenced by the storage modulus  $G'$  and the bulk modulus  $K'$ . In many food gels the contribution of  $G'$  is much smaller than that of the  $K'$  (Povey, 1997). The gelling process mainly causes a change of the elastic properties ( $G'$ ) of the

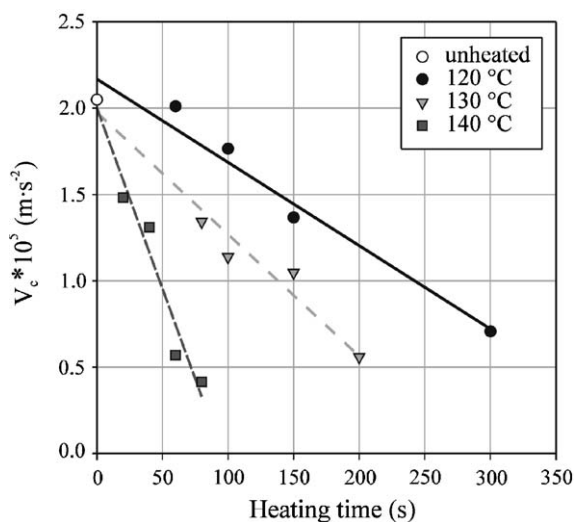


Fig. 10. Aggregation rate of the casein  $V_c$  determined by the ultrasonic method depending on the pre-heating condition of the casein solution.

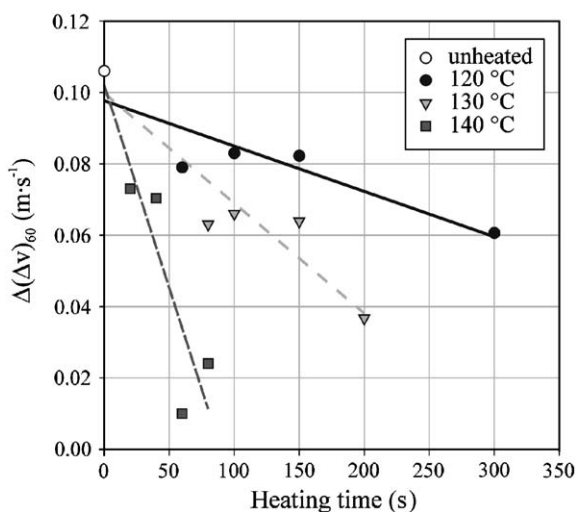


Fig. 11. Influence of the pre-heating condition of the casein solution on the  $\Delta(\Delta v)_{60}$  value (difference of ultrasonic velocity at 60 min after rennet addition and that at  $t_c$ ) of the rennet gel in ultrasonic measurements.

sample. Therefore, the formation of the casein network is more difficult, but still possible to be measured by compressional ultrasound.

### 3.2.3. Correlation of ultrasonic and rheological measurements

In order to compare the  $t_c$  determined by the two methods used, the  $t_c$  in samples heated at 120 °C obtained from the rheological measurements is plotted against that from the ultrasonic measurements (Fig. 12). As can be seen,  $t_c$  from the ultrasonic and the rheological measurements are linearly correlated. The values for  $t_c$  from the rheological measurements are higher than those from the ultrasonic measurements. This means that the ultrasonic technique detects changes related to aggregation earlier than the rheological method. The aggregation process

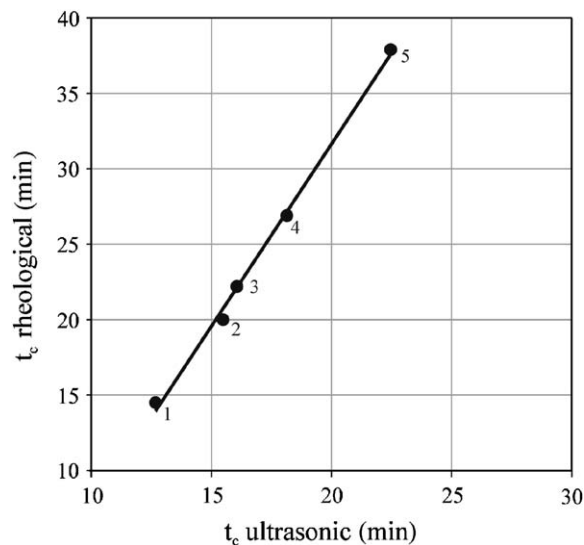


Fig. 12. Correlation of the coagulation times determined by ultrasonic and rheological methods in samples heated at 120 °C for varying time. The numbers 1–5 are for unheated, 60, 100, 150 and 300 s, respectively.  $R^2 = 0.9967$ .

precedes the network formation. The coagulation time  $t_c$  from the rheological measurements correlates with a certain extent of network formation. Therefore, it can only be measured at a later stage compared with the aggregation-related changes in ultrasonic measurements.

The slope of the regression line in Fig. 12 is larger than 1. This means that the difference between  $t_c$  from ultrasonic and rheological measurements increases with increasing heating time. This indicates that, the more the aggregation process is affected, the longer it takes from aggregation to gelling.

## 4. Conclusions

The results of ultrasonic and rheological measurements show that UHT heat treatment retards the coagulation process, and therefore, prolongs the gel firming process. In contrast to the rheological method, which is not sensitive enough to detect changes during the enzymatic hydrolysis, both the enzymatic phase and the aggregation phase of the casein micelles can be sensitively detected by ultrasonic measurement. A linear correlation exists between the coagulation times determined by rheological and ultrasonic measurements. However, the coagulation times measured by these two methods are different. The growth of the aggregates to a three-dimensional casein network is more difficult to be detected by compressional ultrasound. For the characterization of the formed gel the rheological measurement is more sensitive. The results of this study show that the ultrasonic measurement is a capable method to complement the established rheological measurement for the characterization of the rennet gel formation and a new option to track the cleavage phase of the rennet enzyme acting on the casein micelle surface. Due to its

online applicability the ultrasonic method has good potential to be used for monitoring the rennet process in cheese making or quality control of rennet enzyme.

## References

- Aoki, T., Suzuki, H., & Imamura, T. (1974). Formation of soluble casein in whey protein-free milk heated at high temperature. *Milchwissenschaft*, *29*, 589–594.
- Audebrand, M., Doublier, J. L., Durand, D., & Emery, J. R. (1995). Investigation of gelation phenomena of some polysaccharides by ultrasonic spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, *9*, 195–203.
- Benguigui, L., Emery, J., Durand, D., & Busnel, J. P. (1994). Ultrasonic study of milk clotting. *Lait*, *74*, 197–206.
- Beyer, H. J., & Kessler, H. G. (1989). Bestimmung des thermischen Denaturierungsverhaltens von Molkenproteinen mittels HPLC. *GIT Supplement Lebensmittel*, *2*, 22–24.
- Bohlin, L., Hegg, P. O., & Ljusberg-Wahren, H. (1984). Viscoelastic properties of coagulating milk. *Journal of Dairy Science*, *67*, 729–734.
- Bulca, S., & Kulozik, U. (2003). Investigations of heat-induced changes in casein solution produced by means of microfiltration/diafiltration for the cheese manufacturing. *Third NIZO dairy conference: Dynamics of texture, process and perception*. Papendal, The Netherlands, June 11–13. Poster abstract nr. 55.
- Bulca, S., Kulozik, U. (2004). Heat induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration. *Bulletin IDF* (Vol. 389, pp. 36–39). Brussels, Belgium: IDF.
- Bulca, S., Leder, J., & Kulozik, U. (2004). Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein contents. *Milchwissenschaft*, *59*, 590–593.
- Corredig, M., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2004). The application of ultrasonic spectroscopy to the study of the gelation of milk components. *Food Research International*, *37*, 557–565.
- De Kruif, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, *9*, 183–188.
- De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In 3rd ed P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry (Vol. 1): Proteins*, pp. 233–276. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Dwyer, C., Donnelly, L., & Buckin, V. (2005). Ultrasonic analysis of rennet induced Pregelation and gelation processes in milk. *Journal of Dairy Research*, *72*, 303–310.
- Funck, T., de Maeyer, L. (2001). Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung akustischer Parameter in Flüssigkeiten. *German Patent 101 37 679.0*.
- Gekko, K., & Noguchi, H. (1979). Compressibility of globular proteins in water at 25 °C. *The Journal of Physical Chemistry*, *83*, 2706–2714.
- Green, M. L., Hobbs, D. G., Morant, S. V., & Hill, V. A. (1978). Intermicellar relationships in rennet treated separated milk. II. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research*, *45*, 413–422.
- Gunasekaran, S., & Ay, C. (1994). Evaluating milk coagulation with ultrasonics. *Food Technology*, *48*, 74–78.
- Hori, T. (1985). Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the hot wire method. *Journal of Food Science*, *50*, 911–917.
- Horne, D. S., & Davidson, C. M. (1990). The use of dynamic light-scattering in monitoring rennet curd formation. *Milchwissenschaft*, *45*, 712–715.
- Kersten, M. (2001). Proteinfraktionierung mittels Membrantrennverfahren. *Fortschrittbericht, VDI Reihe 3, Nr. 709*. Düsseldorf, Germany: VDI Verlag.
- Kharakoz, D. P., & Sarvazyan, A. P. (1993). Hydrational and intrinsic compressibilities of globular proteins. *Biopolymers*, *33*, 11–26.
- Korolczuk, J., & Maubois, J. L. (1988). Effect of pH, calcium concentration and temperature on the evolution of the refractometric signal produced during rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, *55*, 81–88.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, *6*, 293–299.
- Nassar, G., Nongaillard, B., & Noël, Y. (2001). Monitoring of milk gelation using a low-frequency ultrasonic technique. *Journal of Food Engineering*, *48*, 351–359.
- Nassar, G., Nongaillard, B., & Noël, Y. (2004). Study by ultrasound of the impact of technological parameters changes in the milk gelation process. *Journal of Food Engineering*, *63*, 229–236.
- Nölting, B., Jiang, M., & Sligar, S. G. (1993). The acid molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin probed by sound velocity. *Journal of the American Chemical Society*, *115*, 9879–9882.
- Pinfield, V. J., Povey, M. J. W., & Dickinson, E. (1995). The application of modified forms of the urick equation to the interpretation of ultrasound velocity in scattering systems. *Ultrasonics*, *33*, 243–251.
- Povey, M. J. W. (1997). *Ultrasonic techniques for fluids characterization* (p. 153). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Srinivasan, M., & Lucey, J. A. (2002). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, *85*, 1070–1078.
- Thomä, C., Krause, I., & Kulozik, U. (2006). Precipitation behaviour of caseinomacropolymers and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International Dairy Journal*, *16*, 285–293.
- Walsh-O'Grady, C. D., O'Kennedy, B. T., Fitzgerald, R. J., & Lane, C. N. (2001). A rheological study of acid-set “simulated yogurt milk” gels prepared from heat- or pressure-treated milk proteins. *Lait*, *81*, 637–650.

# Water mobility during renneting and acid coagulation of casein solutions: a differentiated low-resolution nuclear magnetic resonance analysis

RUTH HINRICHS, SELDA BULCA and ULRICH KULOZIK\*

*Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 1, D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany*

*Changes in water mobility during renneting and fermentation (acidification) of casein micelle solutions measured by nuclear magnetic resonance (NMR) are presented. Casein solutions (native and ultra-high temperature or UHT-treated) were renneted and fermented directly in the NMR instrument to detect changes in water mobility due to the induced structural changes online. The data were analysed using a newly developed method capable of differentiating several fractions of water in terms of their mobility according to the  $T_2$  relaxation times in four distinct ranges, that is, immobile, weakly mobile, mobile and very mobile. Whereas obvious changes in the water mobility take place during acidification, no changes in the water mobility during renneting were observed. This is explained by proposing a model building on different mechanisms of coagulation between acidification and renneting.*

**Keywords** Casein solution, Fermentation, NMR, Rennet, UHT-treatment, Water mobility.

## INTRODUCTION

Curd formation by aggregation and coagulation of proteins is a process with both micro- and macro-structural changes. During renneting of milk, casein micelles coagulate and form a gel due to the enzymatic separation of caseinomacropeptide (CMP) and precipitation of para-casein micelles. Presumably, these structural changes should include a change in water mobility. Many techniques, like vibrational systems, electrical conductivity, optical systems and dynamic light-scattering techniques have been used to monitor the process of curd setting as reviewed by O'Callaghan *et al.* (2002). None of the methods mentioned by O'Callaghan *et al.* (2002), however, deals with water mobility. Therefore, nuclear magnetic resonance (NMR) is of interest because it has the potential to provide additional information beyond routine tests applied so far. NMR uses the fact that protons ( $^1\text{H}$ ), when exposed to a magnetic field, can absorb and emit energy through electromagnetic radiation depending on their own mobility and their immediate environment.

Various authors have published results offering first insights regarding the change of water mobility upon gelification. The gelling of renneted milk has already been described by means of  $^1\text{H}$  low-resolution NMR (20 MHz) by Lelievre and Creamer (1978) and high-resolution NMR (250 MHz) by Tellier

*et al.* (1993). However, no significant change in the molecular mobility of the water protons could be detected during renneting in these studies despite the fact that gelification obviously takes place. Mariette (2003) also mentioned, without providing evidence, that it is not possible to study the renneting with NMR. After gelling, that is during the contraction of the gel, which is linked with the phenomenon of syneresis, an increase in the mobility of the mobile phase was observed (Lelievre and Creamer 1978; Tellier *et al.* 1993).  $^1\text{H}$  NMR diffusion measurements also did not show any differences in the mobility of water in casein solutions and renneted casein gels (Mariette *et al.* 2002). In contrast to renneted gels, using single-phase  $T_2$  relaxation time analysis, HCl-acidified casein gels (Roefs *et al.* 1989) and glucono- $\delta$ -lactone-acidified milk and caseinate solutions (Mariette *et al.* 1993; Famelart *et al.* 1997) show obvious changes in the overall water mobility depending on the pH value. Changes in the  $T_2$  relaxation time during fermentation by lactic acid bacteria can also be observed (Laligant *et al.* 2003). Making a distinction between various phases of immobilized and mobile water, definite changes in the water mobility and the structure during yogurt fermentation (R Hinrichs, personal communication) could be observed by a differentiated analysis using modern NMR instruments. Lelievre and Creamer (1978) dealt only with a single-phase  $T_2$  relaxation time analysis

\* Author for correspondence. E-mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

because of the limited instrumental capabilities at the time, and Tellier *et al.* (1993) only determined a short and a long relaxation time. It can therefore be assumed that their analysis of renneted gels was not sufficiently capable of detecting changes in water mobility in greater detail. Therefore, it is conceivable that a more differentiated NMR analysis using up-to-date hardware could bring new information about water mobility in renneted gels.

The aim of this work was twofold: first, to introduce a novel approach by means of a combination of a free-induction decay (FID) and a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) sequence, other NMR measuring parameters and a more differentiated analysis of different water phases affecting mobility status during the renneting of casein solutions; second, to determine the influence of ultra-high temperature (UHT) treatment of casein solutions on the water mobility in the renneting process. It is known that UHT treatment of even a pure casein solution without whey proteins causes significantly altered coagulation properties (Schreiber and Hinrichs 2000; Schreiber 2001; Bulca, Leder and Kulozik 2004). The evolution of water mobility during renneting was compared against the water mobility of the same casein solutions during fermentation.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Pasteurized skim milk (72°C, 15 s) was obtained from the local dairy. An ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) process was performed according to Kersten (2001) in order to obtain milk depleted of whey proteins. Skim milk was fractionated using a MF (0.1 µm nominal pore size) membrane in the uniform transmembrane pressure (UTP) mode and diafiltered by a fivefold volume turnover. The resulting ‘native’ casein dispersion (Table 1), virtually free of whey proteins, with 3% (w/w) casein and 0.02% (w/w) whey protein, had similar lactose and salt contents as compared to the original skim milk. We considered the pasteurized casein micelle solution as native because of the use

of pasteurized milk. The heating at pasteurization conditions causes minimal denaturation of whey proteins at a concentration of 1–2%; during the heating, induced changes in the casein micelle structure begin at over 100°C. Therefore, it is to be assumed that no changes can occur during the pasteurization of milk. Additionally, the creation of the casein solutions is performed at 55°C, with a transmembrane pressure of 40 kPa and wall shear stress of 150 kPa without any chemical additions.

Some casein dispersions were subject to UHT treatment. The heating was performed in a pilot heating plant using small tubes (stainless steel) with a volume of 20 mL. Saturated steam was used as heating medium. The heating was performed at 140°C with a deliberately chosen long holding time of 60 s in order to induce more pronounced temperature-induced changes. After heating, the samples were immediately cooled down to 20°C. Before renneting the samples, 0.02% CaCl<sub>2</sub> was added and the pH was adjusted to 6.5 using lactic acid (9%). The renneting was performed at 30°C with 0.02% rennet addition (Standard plus 175, Chr. Hansen, Nienburg, Germany) directly in the NMR tubes (diameter 10 mm). All fermentations were carried out with the yogurt culture L11020332 Yogurt 709 which consists of a mixture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Danisco Deutschland GmbH, Niebüll, Germany). Before fermentation, the casein solutions were mixed with 2% yogurt culture. 0.6 mL of incubated milk was filled in NMR tubes and put directly into the NMR apparatus.

### Nuclear magnetic resonance

NMR stems from the fact that the nuclei of specific isotopes (e.g. of the hydrogen isotope <sup>1</sup>H) possess a magnetic moment (spin). They are precessing under a specific angle with respect to an external magnetic field **B**<sub>0</sub>. In the case of spin 1/2, nuclei orientate their components either parallel or antiparallel to the field axis of **B**<sub>0</sub>. As the parallel orientation is energetically preferable for <sup>1</sup>H, this orientation is assumed by a larger number of nuclear spins. Despite the fact that this phenomenon can be calculated correctly in physical terms only by the use of quantum mechanics, the macroscopic behaviour of the spin ensembles can be described for many of the NMR experiments as a continuous magnetization vector. In the description presented, the magnetization vector in the thermal equilibrium points in the direction of the static magnetic field of the magnet. The thermal equilibrium can be disturbed by an appropriate radiofrequency (RF) pulse. After switching off the RF field, the subsequent relaxation can be described by the so-called relaxation times T<sub>1</sub> (longitudinal relaxation time) and T<sub>2</sub> (transversal relaxation time). T<sub>1</sub> (not carried out here) and T<sub>2</sub> are measures of the interaction of

**Table 1** Chemical composition of native casein micelle solution

Component	Content (%)
Dry matter	8.6
Casein	3.0
Whey proteins	< 0.02
Lactose and organic salts	4.6
Ash content	1.0

a spin with its surroundings and the mobility of a spin, respectively. Therefore, it is possible to distinguish between free water that does not interact with the solid particles or dissolved molecules and immobile water, such as crystallization water or other chemically or physically bound or immobilized water. If there is more than one phase present in a sample, a frequency distribution of the relaxation times can be interpreted as the existence of several phases with different viscosities derived according to Bloembergen *et al.* (1947, 1948). In a gel, for example, there are at least two phases. One phase corresponds to the low-viscosity pore-fluid (serum), the other to the high-viscosity network structure. A detailed description of macroscopic interpretations of NMR results is given by Götz (2004). Further details regarding the NMR fundamentals can be found in Abragam (1961), Farrar and Becker (1971), Ernst *et al.* (1987) and Götz (2004).

We made  $T_2$  relaxation time experiments with a low-resolution NMR spectrometer system MINISPEC mq 20 (Bruker Optics GmbH, Rheinstetten, Germany) with temperature control and regulation. The resonance frequency of  $^1\text{H}$  was 20 MHz for magnetic field strength of  $B_0 = 0.47$  Tesla. The pole gap was 25 mm. NMR measurements were performed every 9 min at 30°C during renneting and gel formation up to 150 min, and during fermentation every 9 min at 43°C until reaching a pH value of 4.6–4.5. All experiments were performed in triplicate.  $T_2$  relaxation times were determined by means of a combination of a free-induction decay (FID) and a CPMG sequence. The FID, which was part of the CPMG sequence used, had a scanning time distance of  $5.2 \cdot 10^{-4}$  ms. The duration  $\tau$  of the CPMG sequence was 0.2 ms and the number of data points was set to 19 400. With the CPMG, the influence of field inhomogeneities, diffusion and chemical exchange on the relaxation is minimized (Hills *et al.* 1990). Comparably long total measuring times ( $\sim 8$  s) are achieved

in spite of the high scanning rate with the used instrumentation.

From the  $T_2$  experiments, the response signal (decay of voltage  $U$  over the measurement time  $t$ ) can be described according to equation 1 by a series of up to four exponential terms

$$U(t) = a + b \cdot \exp(-t/2T_{2,1})^2 + \sum_i d_i \cdot \exp(-t/T_{2,i}), \quad (1)$$

with  $b + \sum_i d_i = 1$ ,  $i = 2, 3, 4$ ,  $a$  as the zero drift,  $b$  as the fraction of the spins in the solid state and  $T_{2,1}$  as the  $T_2$  relaxation time of the spins in the solid state and  $d_i$  as the fractions of the spins in fluid states and  $T_{2,i}$  as the  $T_2$  relaxation times of the spins in fluid states.  $i = 2$  stands for the weakly mobile phase,  $i = 3$  for the mobile phase and  $i = 4$  for the very mobile phase. Further details of analysis and interpretation can be obtained from Hinrichs *et al.* (2004a, 2004b).

### pH value

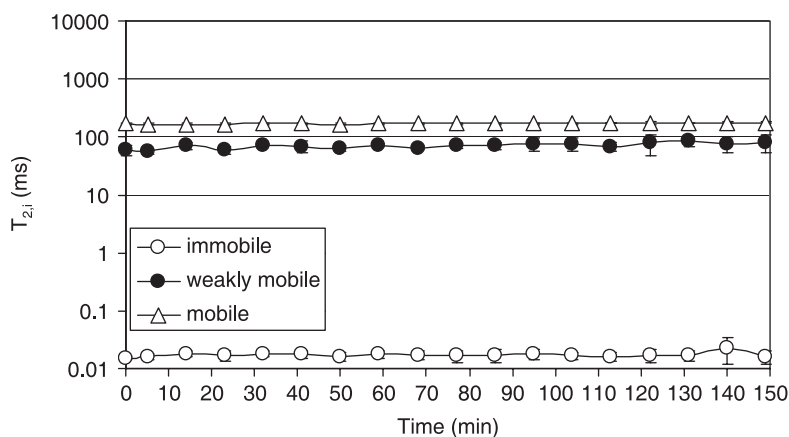
In order to control the fermentation the pH value was measured with a pH meter 761 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). The pH measurements were performed every 9 min at 43°C with 10 mL probes of the same batch as the NMR sample. The pH samples were stored during fermentation in an incubator at 43°C.

## RESULTS AND DISCUSSION

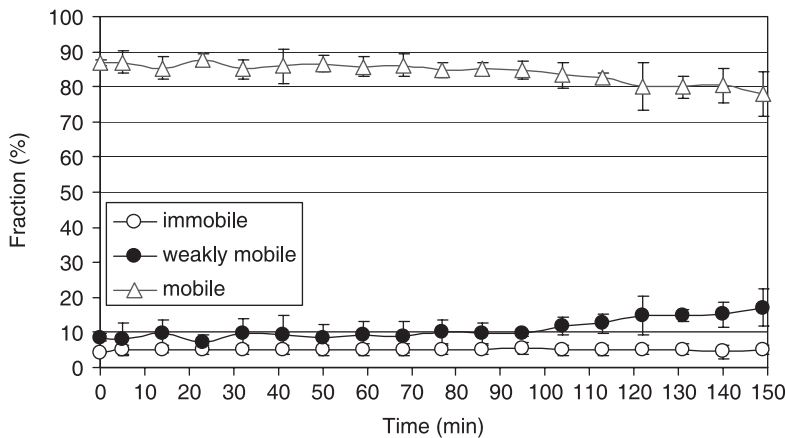
### Changes in water mobility during renneting and gel formation of native casein solutions

During renneting of native casein solutions three differently mobile water phases (mobile, weakly mobile and a phase consisting of immobilized water plus solid material) were detectable by means of  $T_2$  relaxation times. The immobile phase is characterized in this study by  $T_{2,1} < 0.1$  ms, the weakly mobile phase by  $0.1 \text{ ms} < T_{2,2} < 100$  ms and the mobile phase by  $100 \text{ ms} < T_{2,3} < 1000$  ms.

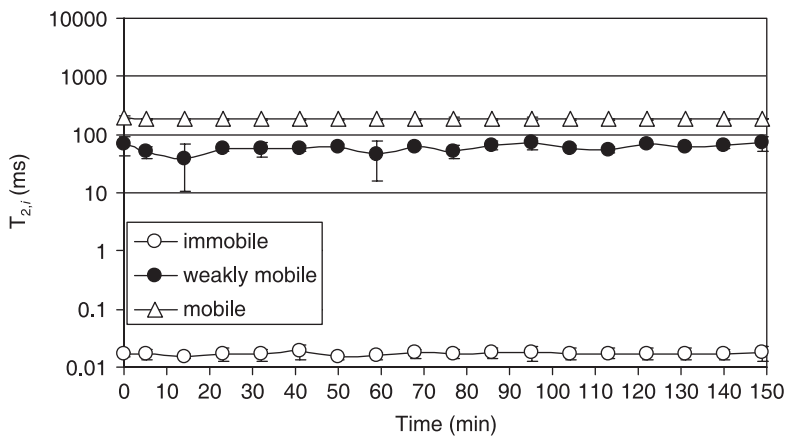
Figure 1 shows the development of the relaxation times  $T_{2,i}$  of the differently mobile phases during coagulation of unheated casein solutions. After 1 h of renneting, the relaxation times of the weakly mobile and the mobile phase tend to result in longer relaxation times at the end of the studies. The relaxation time of the weakly mobile phases increases by 20 ms, the one of the mobile phase by 10 ms. This indicates that the water mobility of these phases increases slightly beginning after 1 h of curd formation. The  $T_2$  relaxation time  $T_{2,1}$  of the immobile phase does not seem to alter significantly. Due to the logarithmic scale, which allows a comparison with the other results, these observable changes appear to be very small in Figure 1. Figure 2 depicts the proportion per fraction of water, differentiated by means of their water mobilities according to the



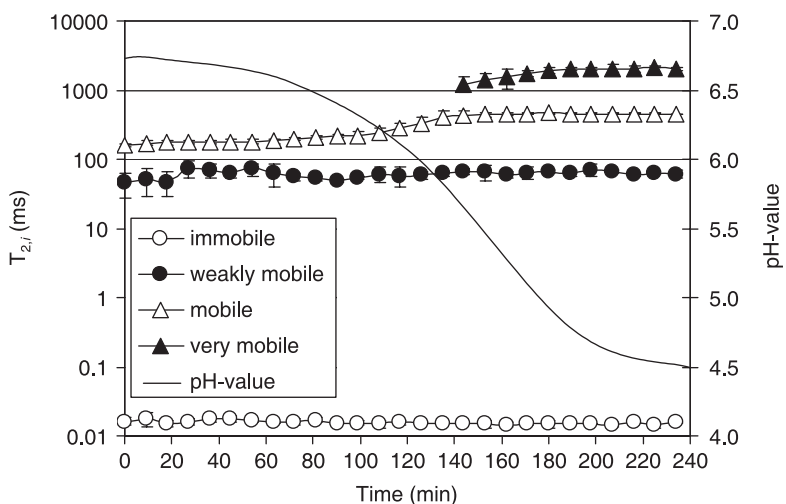
**Figure 1** Development of the  $T_2$  relaxation times of the water phases during renneting of casein solutions at 30°C, experiment in triplicate.



**Figure 2** Development of the water phase fractions during renneting of casein solutions at 30°C, experiment in triplicate.



**Figure 3** Development of the  $T_{2,i}$  relaxation times of the water phases during renneting of preheated (140°C, 60 s) casein solutions at 30°C, experiment in triplicate.



**Figure 4** Development of the  $T_{2,i}$  relaxation times of the water phases and pH (solid line without data points) during fermentation of casein solutions at 43°C, experiment in triplicate.

relaxation times  $T_{2,i}$ . As can be seen, the fraction of the immobile phase does not change much either. In contrast, the fraction of the mobile water phase decreases slightly over time from 86% to 78%. At the same time, the weakly mobile phase increases from 9% to 17%. These changes become detectable 60 min after rennet enzyme addition and become more pronounced after 100 min. This can be explained by curd contraction and syneresis (Tellier *et al.* 1993).

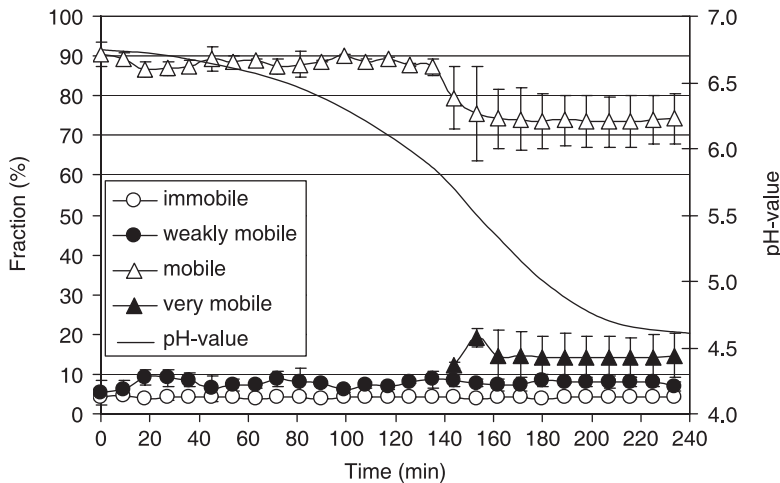
**Changes in water mobility during renneting and gel formation of UHT-treated casein solutions vs native casein**

Besides the native casein solutions, UHT-treated casein solutions were renneted because this treatment causes altered coagulation properties. It was suspected that this change in renneting properties would also introduce changes in the water mobility. The development of the water mobility during curd formation of preheated casein solutions proceeds similarly to the unheated solutions. In contrast to the native casein solutions, however, the  $T_2$  relaxation times of all phases do not alter (Figure 3) and, accordingly, the distribution of the fractions of the different mobile phases does not change (not shown). Syneresis-induced changes as for native casein solutions (approximately 110 min after rennet addition) cannot be observed.

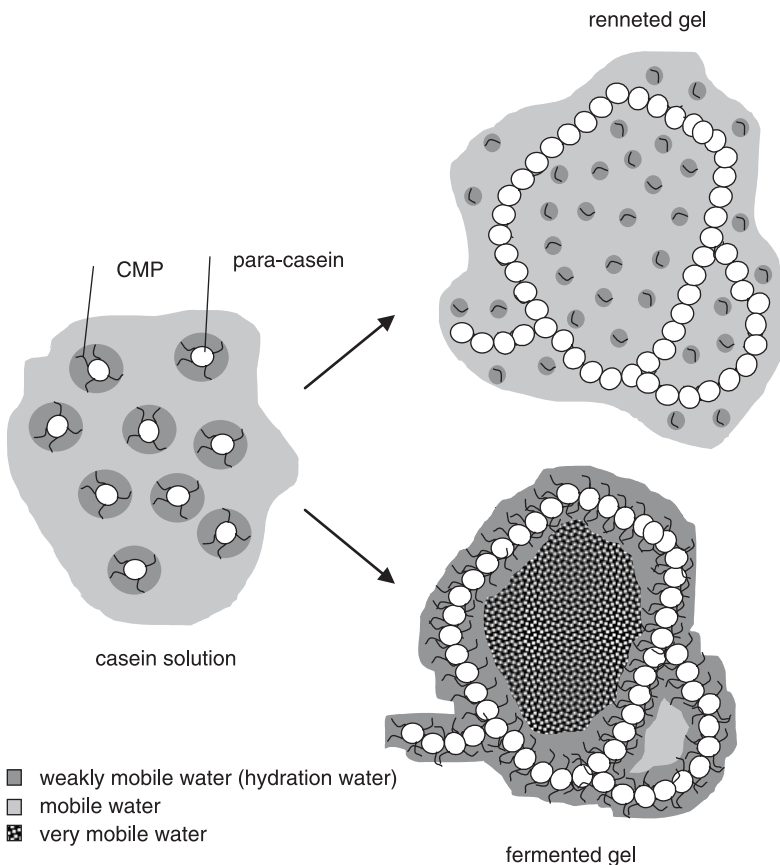
**Changes in water mobility during the fermentation of native casein solutions**

In an earlier study, the effect of acidification on water mobility was investigated using milk (R Hinrichs, personal communication). The aim here was to assess water mobility in a solution of casein micelles, depleted of whey proteins by microfiltration, in order to differentiate between the contributions of the caseins and whey proteins to water mobility. Significant changes in the mobilities of the water phases and their fractions can be observed during fermentation of native casein solutions as the pH value decreases. Three differently mobile water phases (immobile, weakly mobile and mobile) can reliably be differentiated by means of  $T_{2,i}$  relaxation times (Figures 4 and 5). A very mobile phase ( $T_{2,i} > 1000$  ms) is also present for pH values below 5.8. The relaxation times of the fermentation are shown in Figure 4. The  $T_2$  relaxation times  $T_{2,i}$  are approximately constant up to pH 6.3. Between pH 6.3 and 5.4, the relaxation time of the mobile phase increases by the factor 2.5. The weakly mobile water phase and the immobile water phase do not show any changes. The relaxation time of the very mobile water phase increases by the factor 2. These changes presumably are a consequence of the evolving microstructure. In the casein solution the free path-length of diffusing water molecules is small before colliding and interacting with other





**Figure 5** Development of the water phase fractions and pH (solid line without data points) during fermentation of casein solutions at 43°C experiment in triplicate.



**Figure 6** Model to explain the different status of immobilization of water in renneted and fermented casein gels; partial view in order to explain the possible different phases. CMP, caseinomacropptide.

molecules like casein or lactose. Therefore, no very mobile water exists. Figure 5 shows the fractions of different mobile water phases during gelling. Between pH 5.8 and 5.4 the phase distribution changes rapidly. The mobile phase decreases from

88% to 74%. At the same time of approximately 140 min a very mobile phase appears with a fraction of about 14%. The fractions of the immobile and the weakly mobile phase do not significantly alter. The relatively high-standard deviations after 140–150 min of fermentation time can possibly be explained by the fact that the fermentations conducted (three repetitions) did vary to some extent in terms of fermentation speed. In other words, the isoelectric points were reached at different times.

From these results (Figures 1–3), it can be assumed that rennet casein gels interact very differently with the enclosed water than do fermented casein solutions (Figures 4 and 5) and fermented milk gels (R Hinrichs, personal communication). In this work the influence of the raw material (raw milk and skim milk) on the changes in the water-holding capacity during the fermentation of yogurt, which is combined with gelling, was studied by means of  $T_2$ -relaxation times. A significant change in the mobility of the water phases ( $T_2$ ) and their fractions could be observed with decreasing pH value. The differences in renneting and acid coagulation must be explainable by the different gelling mechanisms of acid and rennet casein gels. Studies of Keim *et al.* (2004) can also give a hint to explain these differences. They found out that rennet casein gels are mainly stabilized via calcium bonds and acid-induced casein gels via hydrophobic interactions. This can cause a different interaction between the water molecules and the proteins. Furthermore, the rheological behaviour of acid milk gels and renneted milk gels is different (Lucey 2002; Keim *et al.* 2004).

**Model of the water mobility in renneted and fermented casein gels**

These observations support the current understanding of mechanisms affecting, and the differences between, renneted and acid-casein gels. Figure 6 depicts a model to explain the differences in water mobility between rennet and acid type casein gels; only parts of the system, not the whole gel, are shown in order to explain all possible phases. The main influence for the changes in the water mobility in fermented casein gels are the pores and capillaries formed in the gel (R Hinrichs, personal communication). The casein micelles especially, including the CMP, lower the mobility (and hence the  $T_2$  relaxation time) of water protons in casein solutions (Hinrichs 2004b). During acidification, micelles disintegrate due to the conversion of micellar bound calcium phosphate into ionic, soluble calcium and phosphate. The gel resulting from the isoelectric flocculation can be seen as a network incorporating pores and capillaries which changes the water mobility as soon as the pH reaches the isoelectric point of the caseins. A considerable proportion of the water molecules can

then diffuse comparably freely in the closed pores and open capillaries of the gel. Relatively big cavities, free of casein particles, are formed in the gel, which bring out a new and very mobile water phase. The bigger the pore, the smaller is the influence of the solid on the pore water and the higher the water mobility.

In contrast to acidification, the casein micelles stay intact during renneting. The interaction with the aqueous environment of the native casein micelle prior to renneting results from the hydrophilic  $\alpha$ -casein surface, which contains the hydrophilic CMP. Upon renneting, the CMP is released into the serum phase without, however, changing its water-binding capacity. According to our results, most of the water interacts directly with the CMP, not with the casein micelles. Separation of the CMP does not cause any changes in these water–CMP interactions. The separated CMP takes the water away from the para- $\kappa$ -casein micelles. As the CMP, holding the water, is evenly spread in the pores and capillaries of the renneted gel, no differences in the mobility of the water in the different-sized cavities, as in acid gels, is observed. The coagulating para- $\kappa$ -casein micelles seem to form pores and capillaries, which do not have an influence on the water mobility. In other words, the amounts of CMP-bound and CMP-influenced water, as well as the mobility of the other water fractions, are not affected by renneting. The NMR water mobility measurements support this view.

## CONCLUSIONS

By means of  $T_2$  relaxation times, three differently mobile water phases (mobile phase, weakly mobile, describing the hydration water of CMP, and a phase consisting of immobilized water plus solid material) can be differentiated in casein solutions (whey protein-depleted milk) during renneting. Changes in the water mobility during coagulation hardly occur. UHT treatment of casein solutions has no influence on the water mobility during renneting, but UHT treatment seems to prevent an increase in the water mobility during shrinkage of the coagulum. If an acid-induced casein gel is formed, changes in the water mobility and in the distribution of the different mobile phases can be observed during acidification. The differences in the NMR signals between acid-induced gels and renneted gels seem to confirm the different mechanisms of gel formation and put a new perspective on the water-binding behaviour of CMP after renneting.

## REFERENCES

- Abragam A (1961) *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford: Clarendon Press.
- Bloembergen N, Purcell E M and Pound R V (1947) Nuclear magnetic resonance. *Nature* **160** 475.
- Bloembergen N, Purcell E M and Pound R V (1948) Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Physical Review* **73** 679–712.
- Bulca S, Leder J and Kulozik U (2004) Impact of UHT or high heat treatment on the rennet gel formation of skim milk with various whey protein contents. *Milchwissenschaft* **59** 590–593.
- Ernst R R, Bodenhausen G and Wokaun A (1987) *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford: Clarendon Press.
- Famelart M-H, Gaucheron F, Mariette F, Le Graet Y, Raulot K and Boyaval E (1997) Acidification of pressure-treated milk. *International Dairy Journal* **7** 325–330.
- Farrar T C and Becker E D (1971) *Pulse and Fourier Transform NMR*. New York: Academic Press.
- Götz J (2004) *Applications of NMR to food and model systems in process engineering*. Habilitation Thesis, Technische Universität München, München, Germany.
- Hills B, Takacs S and Belton P (1990) A new interpretation of proton NMR relaxation time measurements of water in food. *Food Chemistry* **37** 95–111.
- Hinrichs R (2004) NMR-Messungen zur Wasserbindung und Struktur in Systemen aus Milchproteinen und Hydrokolloiden. PhD Thesis, Technische Universität München, München, Germany.
- Hinrichs R, Götz J, Noll M, Wolfschoon A, Eibel H and Weisser H (2004a) Characterisation of the water-holding capacity of fresh cheese samples by means of low-resolution nuclear magnetic resonance. *Food Research International* **37** 667–676.
- Hinrichs R, Götz J, Noll M, Wolfschoon A, Eibel H and Weisser H (2004b) Characterisation of different treated whey protein concentrates by means of low-resolution nuclear magnetic resonance. *International Dairy Journal* **14** 817–827.
- Keim S, Mérel E and Hinrichs J (2004) Influence of stabilizing bonds on the rheological characteristics of milk protein gels. *Proceedings ICEF9, International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France, 7–11 March 2004* (CD-ROM).
- Kersten M (2001) *Proteinfraktionierung Mittels Membrantrennverfahren*, Fortschritt-Berichte VDI Reihe 3, Nr. 709. Düsseldorf: VDI-Verlag.
- Galigant A, Famelart M H, Paquet D and Brulé G (2003) Fermentation by lactic bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. II – Dynamic approach of the gel construction. *Le Lait* **83** 307–320.
- Lelievre J and Creamer L K (1978) An NMR study of the formation and syneresis of renneted milk gels. *Milchwissenschaft* **33** 73–76.
- Lucey J A (2002) ADSA Formation Scholar Award—formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science* **85** 281–294.
- Mariette F (2003) NMR relaxometry and MRI for food quality control: application to dairy products and processes. In *Magnetic Resonance in Food Science—Latest Developments*, Special Publication No. 286, pp 209–222. Belton P S, Gil A M, Webb G A, Rutledge D, eds. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Mariette F, Tellier C, Brulé G and Marchal P (1993) Multi-nuclear NMR study of the pH-dependent water state in skim milk and caseinate solutions. *Journal of Dairy Research* **60** 175–188.

- Mariette F, Topgaard D, Jonsson B and Soderman O (2002)  $^1\text{H}$  NMR diffusometry study of water in casein dispersions and gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 4295–4302.
- O'Callaghan D J, O'Donnell C P and Payne F A (2002) Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology* **55** 65–74.
- Roefs S P F M, van As H and van Vliet T (1989) Pulse NMR of casein dispersions. *Journal of Food Science* **54** 704–708.
- Schreiber R (2001) Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability. *International Dairy Journal* **11** 553–558.
- Schreiber R and Hinrichs J (2000) Rennet coagulation of heated milk concentrates. *Le Lait* **80** 33–42.
- Tellier C, Mariette F, Guillement J-P and Marchal P (1993) Evolution of water proton nuclear magnetic relaxation during milk coagulation and syneresis: structural implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41** 2259–2266.

## **Eingereichte Publikationen**

1. Impact of casein and whey protein content on the renneting properties of UHT-treated microfiltered milk concentrates, Journal of Food Engineering in review

1 **Impact of casein and whey protein content on the renneting properties of**  
2 **UHT-treated microfiltrated milk concentrates**

3 **Selda Bulca, Alexander Tolkach, Jeanette Leder, Ulrich Kulozik\***

4 *Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universität*  
5 *München,*

6 *D-85354, Freising-Weihenstephan, Germany*

7

8

9

10

11 \*Corresponding author.

12 Tel: +49-8161-713535; Fax: +49-8161-714384; E-mail: [Ulrich.Kulozik@wzw.tum.de](mailto:Ulrich.Kulozik@wzw.tum.de)

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

**30 Abstract**

31 The renneting properties of heat treated milk are depending on the intensity of heating as well as on  
32 the amount of individual protein fractions involved in the complex formation between whey proteins  
33 and casein micelles during heat treatment. Hence, the rennetability of UHT-heated milk can be  
34 modified either by removing whey proteins or by increasing the casein content in cheese milk by  
35 means of ultrafiltration, microfiltration or by a combination of both processes in a diafiltration mode.

36 The aim of this study was to investigate the effect of different casein / whey protein ratios on the  
37 cheese making properties of UHT treated skim milk (140 °C for 10 sec). For this reason the casein and  
38 whey protein contents were varied between 3.0 and 6.4 % and 0.02 and 0.65 %, respectively. Rennet  
39 coagulation time and the gel firmness after 60 min were assessed as response factors and used for  
40 further optimisation of thermal pre-treatment conditions.

41 The results demonstrate strong interactions between the factors studied regarding the rennet properties  
42 of milk concentrates. This allowed to identify the optimal compositional parameters concerning  
43 casein/whey protein ratio which deliver the same renneting properties in terms of coagulation time and  
44 gel firmness as compared to those of pasteurised skim milk. Two discrete pairs of casein and whey  
45 protein concentrations of 3.4% / 0.01% and 6.4% / 0.65% were found to be suitable for cheese  
46 production from UHT treated milk.

47 *Key words:* microfiltration, ultrafiltration, UHT treatment, rennet coagulation, cheese, casein, whey proteins

**48 1. Introduction**

49 The presence of spore formers such as *Clostridium tyrobutyricum* can cause the undesired effect of  
50 "late blowing" in hard cheese. Spores can only be completely inactivated under UHT or high heat  
51 conditions. However, a heat treatment above 70°C leads to a complex formation between denatured  $\beta$ -  
52 lactoglobulin ( $\beta$ -lg) and  $\kappa$ -casein of the casein micelles (Wheelock & Kirk, 1974; Dalgleish, 1990)  
53 which impairs its renneting properties (Wilson & Wheelock, 1972). The reaction of denatured whey  
54 proteins with the casein micelles appears to hinder the aggregation of para-casein (Van Hooydonk et  
55 al., 1987). This effect results in a longer rennet coagulation time, weaker gels and a reduced whey  
56 drainage from the curd during cheese making process (Kannan & Jennes, 1961; Casiraghi, Lucisano,  
57 & Peri, 1989; Reddy & Kinsella, 1990; McMahon, Yousif & Kalab, 1993; Ghosh, Steffl & Kessler,  
58 1996; Guinee, Gorry, O'Callaghan, O'Kennedy, O'Brien & Fenelon, 1997).

59 A strong correlation was found between the denaturation degree of whey proteins ( $\beta$ -lg in particular)  
60 and the cheese making properties of milk in a large number of scientific studies. Different statements  
61 exist concerning the correlation between the coagulation time and whey protein denaturation of milk.  
62 According to Dalgleish (1990) the coagulation time of heated milk increases slowly at lower levels of  
63 whey protein denaturation. If the denaturation degree of  $\beta$ -Lg exceeds 50%, the coagulation time  
64 increases considerably. Leaver et al. (1995) in the contrary showed that a whey protein denaturation of  
65 only about 10 % already results in a partial inhibition of the aggregation reaction. A study of Ghosh et

66 al. (1996) demonstrated that the rennet coagulation time of heated milk increases linearly with a  
67 degree of whey protein denaturation arises from 20 to 99%. Additionally, the investigations described  
68 by Singh & Waungana (2001) showed a linear decrease of the storage modulus value of rennet gels  
69 when the degree of  $\beta$ -lg denaturation increased from 10 to 65%. According to Steffl (1999) a  
70 denaturation of  $\beta$ -lg above 60 % led to a complete loss of the rennetability of milk. As found by Van  
71 Hooydonk, De Koster & Boerrigter (1987), the rate of the enzymatic hydrolysis of  $\kappa$ -casein is reduced  
72 by 20 % at complete denaturation of  $\beta$ -lg.

73 Apart from whey protein denaturation other physico-chemical changes of casein micelles related to the  
74 milk salts equilibria might also interfere with the renneting process. A degradation in the rennet  
75 coagulation time and curd firmness of heated milk related to these changes could partially be  
76 counterbalanced by acidification or calcium addition prior to heating as described by Marshall (1986),  
77 Banks, Stewart, Muir, & West (1987) and Lucey, Gorry & Fox (1993). However, neither acidification  
78 nor calcium addition could completely restore the original renneting properties of heated milk,  
79 especially gel firmness (Lucey et al. 1993). This suggests that the most decisive heat-related changes can  
80 be assigned to the interaction of whey proteins and casein.

81 On the other hand, the thermal denaturation of whey proteins upon heat treatment of cheese milk can  
82 be used to increase the cheese yield and water binding capacity which is especially important for the  
83 production of soft cheese (Kosikowski & Mistry, 1990; Banks et al., 1995; Hinrichs, 2001). Marshall  
84 (1986) reported that the dry matter of cheshire cheese produced from heated milk (97°C, 15 s) can be  
85 significantly increased by a denaturation of whey proteins to a degree of about 30%. In the  
86 experimental cheeses about 4.5% more dry matter was recovered compared with controls made from  
87 pasteurised milk owing to a recovery of 6.7% and 0.7% increase in protein and fat, respectively.

88 In order to avoid the inhibiting effect of denatured whey proteins on renneting properties of skim milk  
89 and to allow the production of semi-hard or hard cheese from heated e.g. UHT-treated milk, the  
90 following two major strategies were usually applied (Schreiber & Hinrichs, 2000):

- 91 1. Concentration of total protein content of skim milk by ultrafiltration (UF) or
- 92 2. Removal of whey proteins from skim milk by microfiltration (MF).

93 According to the first strategy the renneting properties of concentrated heated milk can be improved  
94 by ultrafiltration prior to the heating (Maubois & Mocqout, 1974; Mistry & Maubois, 1993; Schreiber,  
95 2000). Despite the loss of native  $\beta$ -lg in the UF-concentrated milk heated between 80 and 120°C was  
96 comparable to that of the normal skim milk (Waungana, Singh & Bennett, 1996), the renneting  
97 behaviour of the heat treated milk concentrates significantly differ from those of heated milk.  
98 However, a row of contradictory results are reported regarding the renneting properties of heated UF  
99 milk concentrate. According to Kosikowski & Mistry (1990) a twofold concentrated UF retentate  
100 heated at 120°C for 5 min is suitable to form a rennet coagulum. Sharma, Hill & Goff (1990) also  
101 reported that heat treated UF milk (85°C, 15 min) retains its rennet coagulation and curd formation  
102 capacity despite a slight decrease in the rate of  $\kappa$ -casein hydrolysis. For temperatures above

103 pasteurisation level McMahon, Yousif & Kalab, M. (1993) could show that a threefold concentrated  
104 UF concentrate heated at 140°C can form a rennet coagulum. However, only a weak gel could be  
105 formed compared to unheated UF concentrate. Results of Waungana et al. (1996, 1998) demonstrated  
106 that significant decreases in the gel formation rate and the gel firmness not only in skim milk but also  
107 in UF concentrate (3 fold concentration) occurred when the heating temperature increased from 80 to  
108 140°C at a holding time for 4 s. The authors reported that the denaturation of  $\beta$ -Lg up to 75% had little  
109 effect on the gelation time in UF concentrate, although higher degrees of denaturation resulted in a  
110 significant increase of the rennet gelation time. Confirming these results Singh & Waungana (2001)  
111 found that the storage modulus of rennet gel produced from UF concentrate decreased almost linearly  
112 as the degree of denaturation of  $\beta$ -lg increased.

113 In summary, it can be concluded that the decreased rennetability of heat treated milk caused by the  
114 complex formation between denatured whey proteins and the casein micelles can be compensated by  
115 increasing of the casein micelle concentration. Therefore, despite the fact that a thermal treatment of  
116 UF milk concentrates results in a slight decrease of the rennetability in comparison to unheated  
117 concentrates, their renneting properties are superior to those of unconcentrated skim milk. This allows  
118 gel network formation even if the whey protein concentration is increased to higher levels.

119 As a second strategy to avoid the negative influence of the heat treatment on the rennet properties of  
120 milk, microfiltration (MF) can be used to reduce the whey protein level. MF allows to remove the  
121 whey proteins from milk almost completely and producing suspensions of casein micelles with a  
122 composition identical to raw milk except the whey protein concentration (Punidades & Rizvi, 1998;  
123 Saboya & Maubois, 2000; Kulozik & Kersten, 2002). Many studies have been published describing  
124 the effect of MF on the cheesemaking properties. Garem, Schuck & Maubois (2000) found no  
125 significant differences concerning rennet based coagulability and melting properties in cheese from  
126 microfiltrated milk as compared to unmodified milk during the production of mozzarella. Semi-hard  
127 low fat cheese made by microfiltration showed an improved texture in comparison to that made from  
128 ultrafiltrated milk (Rodriguez, Requena, Fontecha, Gougedranche & Juarez, 1999). Schreiber (2000)  
129 reported that both the coagulation time and the gel strength of unheated microfiltrated retentates with a  
130 constant casein content (2.8%) and the whey protein concentration adjusted between 0 and 0.6% by  
131 means of diafiltration, were independent from the amount of whey proteins as long as they remained  
132 native. A thermal treatment of microfiltrated milk at pasteurisation conditions (72°C / 20 s) did not  
133 affect the rennet coagulation during soft cheese production (Daviau, Pierre, Famelart, Gougedranche,  
134 Garnier & Maubois, 2000).

135 However, little is known about the renneting properties of UHT-treated MF retentates which are  
136 partially depleted from whey proteins by diafiltration except results from the works of Schreiber &  
137 Hinrichs (2000) and Schreiber (2000). They could show that the higher the casein content of the  
138 retentate is, the more whey proteins could be denatured while still obtaining a satisfactory gel  
139 firmness. In addition, it was shown that the renneting properties of MF retentates heated between 100  
140 and 140°C were less impaired when the whey proteins were completely removed. However, Schreiber



141 (2000) reported that an increase in the intensity of heat treatment (100-140°C with variable holding  
 142 time) led to a significant decrease of the renneting properties of micellar casein suspension even when  
 143 the whey proteins are completely removed. No gel formation could be observed after the micellar  
 144 casein solutions were heated at 140°C for 120 s.

145 The results of Schreiber (2000) compared to the studies mentioned above indicate that the changes in  
 146 the renneting properties of heated milk, UF or MF-retentates appear to arise as a consequence of the  
 147 thermal modification of both whey proteins and casein micelles, especially in the UHT area. However,  
 148 it is still unclear to what extent the heat modification of the casein fraction or the whey protein fraction  
 149 contributes to the impairment of the rennet gel formation properties of milk. Another question in this  
 150 context is whether the negative effect of heat treatment can be compensated by changing the  
 151 concentration of whey proteins and the ratio between whey proteins and casein prior to heat treatment.  
 152 Therefore, the goal of this study was to investigate the influence of the casein and whey proteins  
 153 contents on the rennetability of the UHT treated milk concentrates in order to obtain optimal protein  
 154 composition regarding their renneting properties. Focus was put on milk concentrates with high casein  
 155 and reduced whey protein contents produced by means of a combination of MF and UF in a  
 156 diafiltration mode.

## 157 **2. Materials and methods**

### 158 *2.1 Raw materials*

159 Pasteurised skim milk (72 °C, 15 s) was obtained from the local dairy.

### 160 *2.2. Variation of the casein/whey protein ratio of skim milk by membrane filtration*

161 Milk concentrates were produced by means of a combination of ultrafiltration (UF) and microfiltration  
 162 (MF) in the diafiltration mode. UF was performed using a DDS module 36, membrane type GR 60 PP  
 163 (DSS AS, Nakskov, Denmark) with a surface area of 3 m<sup>2</sup>. The membranes were made from  
 164 polysulphone with a nominal cut-off of 25 kDa.

165 The MF module (7P19-40GL, APV, Silkeborg, Denmark) had 7 multichannel filtration elements  
 166 (SCT, Bazet, France) each consisting of 19 channels (total surface area 1.68 m<sup>2</sup>). The membrane  
 167 material was  $\alpha$ -aluminium oxide with a selective layer of zirconium oxide (nominal pore-size 0.1  $\mu$ m).  
 168 The MF unit plant was operated according to the UTP (Uniform Transmembrane Pressure) principle  
 169 (Kersten, 2001; Kulozik & Kersten, 2002).

170 In order to vary the casein content and the whey protein / casein ratio, the skim milk was concentrated  
 171 twofold by means of ultrafiltration to a total protein concentration of 6.5 %. Thereafter, the whey  
 172 protein content was reduced by diafiltration according to the scheme shown in Figure 1 with five  
 173 volume turnovers using milk serum as a diafiltration medium. The remaining whey proteins content  
 174 could be calculated by equation 1 according to Van Reis and Saksena (1997):

$$175 \frac{C_{WP,V_p}}{C_{WP,0}} = \exp\left(-p \frac{V_p}{V_{MC}}\right) \quad (1)$$

176 with  $C_{WP,V_p}$  - the concentration of the whey proteins after diafiltration with  $V_p$  volume turn over of UF  
 177 permeate ( $\text{gL}^{-1}$ );  $C_{WP,0}$  - initial concentration of the whey proteins in the milk concentrate ( $\text{gL}^{-1}$ );  $p$  -  
 178 sieving coefficient (permeation) of whey proteins;  $V_{MC}$  - volume of diafiltrated milk concentrate (L).

179 The sieving coefficient (or permeation)  $p$  is defined as the ratio between the concentration of the  
 180 whey protein in the MF permeate  $C_{WP,MFP}$  and MF retentate  $C_{WP,MFR}$  :

$$181 \quad p = \frac{C_{WP,MFP}}{C_{WP,MFR}} \quad (2)$$

182 The sieving coefficients of  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la were found to be  $p = 0.51$  and  $p = 0.55$ , respectively, which  
 183 are in agreement with those observed for MF with average pore diameter  $0.1 \mu\text{m}$  by Kersten (2001)  
 184 and Tolkach and Kulozik (2005). By combination of the equation 2 and equation 1 solved for the  
 185 number of diafiltration volumes or diafiltration steps  $DS = \frac{V_p}{V_{MC}}$  the number of diafiltration volumes  
 186 could be calculated to reach certain whey protein concentrations in the MF retentate according to the  
 187 experimental plan.

188 After each diafiltration step a MF retentate sample was taken. To obtain the solutions with a lower  
 189 casein and whey proteins contents, the total protein concentration was adjusted to 4.9 and 3.3 % with  
 190 UF-permeate. As a result, 18 solutions with different casein and whey protein contents were finally  
 191 obtained for the heat treatment (Table 1).

## 192 2. 2. Heating conditions

193 All sample solutions were heated in a pilot heating plant, using tubes with a diameter of 5 mm and a  
 194 volume of 20 ml (stainless steel). Saturated steam up to 0.6 bar was used to heat the samples at  $140^\circ\text{C}$   
 195 for 10 s holding time which ensures a complete spore inactivation of *Clostridium tyrobutyricum*  
 196 (Schreiber & Hinrichs, 2000) and cooled to  $20^\circ\text{C}$  with cold water. The denaturation degree of whey  
 197 proteins was found to be 98-100%.

## 198 2. 3. Assessment of the rennet coagulation properties

199 The coagulation properties of the samples upon renneting were characterized by measuring of the  
 200 coagulation time and the resulting gel firmness. The following parameters were applied for renneting:  
 201 pH 6.5 adjusted using lactic acid (9%, Sigma); temperature  $30^\circ\text{C}$ ; 0.02% rennet (Standard plus 175,  
 202 Chr. Hansen, Nienburg, Germany). Before renneting 0.02%  $\text{CaCl}_2$  (Sigma) was added to the samples.  
 203 Rennet coagulation time was assessed using a vibrational device (Gel Instrument, Reutlingen,  
 204 Germany). Coagulation time was defined as the time from adding the rennet to the first sign of  
 205 aggregation (McMahon et al., 1984). Gel firmness was measured as the resistance force after 60 min  
 206 coagulation using a texture analyser (TA-XT2, Stable Micro Systems, Haslemore, England) at  $30^\circ\text{C}$   
 207 (Schreiber, 2000). A crossed wire probe ( $d=30 \text{ mm}$ ) was used as gaging device which penetrated the  
 208 rennet gel (volume: 60 ml) 15 mm deep at the velocity of  $0.5 \text{ mm s}^{-1}$ . The measurements were  
 209 repeated four times per sample.

210 In order to compensate seasonal fluctuation of the renneting properties of milk, the rennet coagulation  
 211 time (RCT) and firmness of the rennet gels (RGF) were calculated relatively to that of pasteurized  
 212 milk according to the equations (3) and (4)

$$213 \quad RCT = \frac{\tau_{HS}}{\tau_{PM}} \quad (3)$$

214 Where  $RCT$  is the relative coagulation time of the heated sample,  $\tau_{HS}$  is the coagulation time of the  
 215 heated sample (min),  $\tau_{PM}$  - coagulation time of the pasteurized skim milk (min).

$$216 \quad RGF = \frac{F_{HS}}{F_{PM}} \quad (4)$$

217 where  $RGF$  is the relative gel firmness of the heated sample,  $F_{HS}$  - the maximal resistance force of  
 218 the rennet gel obtained from the heated sample after 60 min after addition of the rennet;  $F_{PM}$  - the  
 219 maximal resistance force of the rennet gel obtained from the pasteurized milk after 60 min after  
 220 addition of the rennet.

## 221 2.4 Data analysis

222 Statistical design of experiment, data analysis, calculation of regression coefficients and response  
 223 surfaces were performed by using the software program Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics  
 224 Corp. Rockville, USA).

## 225 2.5. Chemical Analyses

226 The total protein content of the samples was measured by using a nitrogen analyser FP-528 (Leco,  
 227 Mönchengladbach, Germany) which is based on the method after Dumas. The whey protein content  
 228 ( $\beta$ -Lactoglobulin A and B,  $\alpha$ -Lactalbumin) was determined by RP-HPLC according to Beyer (1990).

## 229 3. Results and discussion

230 The results of the renneting experiments were analysed using multivariate regression in order to derive  
 231 a mathematical model to quantitatively describe the influence of the casein and whey protein  
 232 concentrations on the renneting properties of the heated milk concentrates. The data allowed to obtain  
 233 response surfaces and iso-effect lines depicting the impact of the protein composition on the RCT and  
 234 RGT of the UHT treated milk concentrates. The response surface in this case provides the information  
 235 which allows the interpretation of the interactions between two investigated factors regarding their  
 236 influence on the rennet gel formation.

### 237 3.1 Effect of casein and whey protein contents on the relative rennet coagulation time of UHT 238 treated MF retentates

239 Figure 2a shows a response surface describing the effect of the casein and whey proteins  
 240 concentrations on the relative coagulation time RCT of the UHT-treated micro-/diafiltrated milk  
 241 concentrates. Additionally, figure 2b shows this relationship as a plot of iso-effect lines according to  
 242 the following mathematical expression model for the prediction of RCT at a correlation level  
 243  $R^2 = 0.850$  :

$$244 \quad RCT = 0.05 \cdot C_{Cas} + 5.97 \cdot C_{WP} - 0.96 \cdot C_{Cas} \cdot C_{WP} + 0.79 \quad (5)$$

245 with  $C_{cas}$  - the casein content in the milk concentrate (%);  $C_{WP}$  - the whey protein content in the milk  
246 concentrate (%).

247 As can be seen, the relationship between the casein content and the renneting behaviour of the heated  
248 milk concentrate primarily depends on the amount of whey proteins available in the solutions prior to  
249 heating. The increase of the casein concentration in absence or at very low whey protein content  
250 affects the RCT only slightly. Probably, this phenomenon is due to the thermal damage of the micellar  
251 casein which occurs at UHT temperatures (Schreiber, 2000). However, the changes within the casein  
252 micelles under heat treatment conditions used in this experiment seems not to alter their renneting  
253 properties dramatically.

254 The minor impact of the casein content on the RCT of milk concentrates with low whey protein  
255 contents can be explained by taking into consideration the hydrolysis of the  $\kappa$ -casein by chymosin,  
256 defined as the primary phase of rennet gel formation. According to Dalglish (1980) approximately  
257 80-90% of the  $\kappa$ -casein should be hydrolysed before appreciable aggregation and clotting occurs.  
258 However, in a 4 fold concentrated UF retentate a hydrolysis of only 50% of  $\kappa$ -casein is sufficient to  
259 induce rennet gel formation (Garnot, 1988) that, approximately, results from a closer distance between  
260 the casein micelles which leads to a decrease of the critical charge or  $\zeta$ -potential at which the  
261 aggregation occurs. Hence, the higher the concentration of the casein micelles is, the lower the relative  
262 amount of the  $\kappa$ -casein which is needed to be hydrolysed to initiate clotting. However, the absolute  
263 amount of  $\kappa$ -casein hydrolysed prior to clotting remains almost constant, since the casein content was  
264 increased by ultrafiltration. An overlapping of these two processes probably results in a RCT nearly  
265 independent on the casein concentration.

266 The presence of whey proteins in the concentrates completely changes the above mentioned  
267 behaviour. If the amount of the whey proteins in the UF or MF milk concentrates exceeds 0.2 %, the  
268 rennetability of the UHT treated samples with a casein content under 6 % alters dramatically. The  
269 reason for this behaviour originates from the thermal interaction between the whey proteins and casein  
270 micelles during heat treatment. While the milk concentrate is heat treated, the major whey proteins,  
271 especially  $\beta$ -lg, react with the surface of the casein micelles. This reaction results in a limited  
272 participation of the casein surface in both primary and secondary phases of the renneting process.

273 The involvement of casein micelles in the gel formation strongly depends on the degree of surface  
274 blocking by whey proteins (Schreiber and Hinrichs, 2000). Figure 2b shows that the higher the ratio of  
275 denatured whey proteins/casein is, the higher is the RCT and the lower is the ability of heat treated  
276 milk concentrate to form a rennet gel after heat treatment. The rennetability of the UHT treated milk  
277 concentrates can be improved either by increasing the casein content or by decreasing the whey  
278 protein content, i.e. by the factors elevating the casein/whey proteins ratio.

279 The optimal composition of the milk protein concentrate regarding coagulation time can be derived  
280 from figure 2b. As can be seen, the UHT treated milk concentrates show the same coagulation time as  
281 pasteurized skim milk either if the whey proteins are completely removed from the milk concentrate  
282 (lower than 0.05) or at casein contents of 6.5-7 % and whey protein concentration between 0.2 and

283 1 %. However, in order to find out the protein composition of milk concentrates prior heating which is  
 284 optimal concerning both coagulation time and gel strength, the characteristics of the final rennet gels  
 285 described by relative gel firmness must also be taken into consideration.

### 286 3.2 *Effect of casein and whey protein contents on the relative gel firmness of the UHT-treated MF* 287 *retentates*

288 Fig. 3a shows the effect of the whey protein and casein content on the relative gel firmness RGF of  
 289 heated retentates. The zero-line in Fig. 3b marks the region where no gel formation after heat  
 290 treatment was observed. It can be seen that the protein composition of skim milk with unmodified  
 291 protein composition is located in this area. This is in agreement with many publications which showed  
 292 that UHT treated milk is not able to form a rennet gel.

293 The mathematical expression model for the prediction of the RGF at a correlation level of  
 294  $R^2 = 0.957$  as a function of the whey protein and casein concentration was found as follows:

$$295 \text{ RGF} = 0.92 \cdot C_{Cas} + 0.02 \cdot C_{Cas} \cdot C_{WP} - 6.79 \cdot C_{WP}^2 - 2.12 \quad (6)$$

296 It can be seen from figure 3a that an increase of the casein content as well as a decrease of the whey  
 297 protein content enhances the relative gel firmness of the UHT treated MF milk concentrate. The  
 298 decline of the RGF with increased whey protein concentration leads to weaker rennet gels due to the  
 299 association of  $\beta$ -lg with casein micelles and blocking of their surface. This results in a formation of  
 300 fewer bridges and weaker bonds between the para-casein micelles (Van Hooydonk et al., 1987;  
 301 Waungana et al., 1996). Changes in the whey protein and casein concentrations leading to an increase  
 302 of the ratio between these protein fractions prior heating appears to lower the firmness of the rennet  
 303 gels. Decreasing the proportion between whey proteins and casein leads to the formation of stronger  
 304 gels due to the lower amount of whey proteins reacting with the surface of the casein micelles and  
 305 blocked its reactivity after heat treatment. Additionally, the enhanced RGF of the milk concentrates  
 306 with increased casein contents is obviously due the increased amount of the para-casein micelles  
 307 participating in the gelling process.

308 In order to obtain the same coagulation time as that of pasteurized skim milk, the decline of the rennet  
 309 gel firmness caused by an increased whey protein concentration can be compensated by higher casein  
 310 contents (Fig 3b). The results are in general agreement with those of Schreiber & Hinrichs (2000) who  
 311 also showed that with rising casein contents of the retentate more whey protein can be tolerated to be  
 312 denatured by heat treatment if a rennet gel with a certain firmness value shall be obtained. Figure 3b  
 313 also shows that even in almost complete absence of the whey proteins some changes in the casein  
 314 micelles occur as a result of a UHT treatment.

### 315 3.3 *Optimization of the protein composition of the milk concentrates regarding their renneting* 316 *properties*

317 The results described above allow to identify the compositions of the milk concentrate prior to UHT  
 318 treatment with coagulation time and gelling firmness of the heated concentrates identical to  
 319 pasteurized milk. In other words, in these MF retentates the RCT as well as the RGF have to be equal

320 to one. This optimal composition can be found as a solution of the following equation system (7) by  
 321 setting equations (5) and (6) to one.

$$322 \quad \begin{cases} 0.05 \cdot C_{Cas} + 5.97 \cdot C_{WP} - 0.96 \cdot C_{Cas} \cdot C_{WP} + 0.79 = 1 & (RCT) \\ 0.92 \cdot C_{Cas} + 0.02 \cdot C_{Cas} \cdot C_{WP} - 6.79 \cdot C_{WP}^2 - 2.12 = 1 & (RGF) \end{cases} \quad (7)$$

323 Graphically, the solution can be found as crossover points of the isoeffect lines for RCT and RGF with  
 324 a target value of 1. Fig. 4 shows the graphical solution of the equation system (7). As can be seen,  
 325 there are two discrete situations which fit the requirements of the equation system (7). The first option  
 326 corresponds to a casein concentration of 3.4% and a whey protein content of 0.01%, the second option  
 327 has a higher casein level of 6.4% and a whey protein content of 0.65 %.

### 328 3.4. Validation of the optimal protein compositions

329 In order to validate the optimal protein compositions of the MF retentates in absolute terms, two milk  
 330 concentrates with 3.4% casein, 0.01% whey protein and 6.4% casein and 0.65% whey protein were  
 331 produced. The casein concentration was adjusted by means of UF. 100 L skim milk with a casein  
 332 concentration of 2.7 % was concentrated 1.26 times to obtain the casein content of 3.4% and 2.37  
 333 times to obtain a casein content of 6.4%. Afterwards, the obtained milk concentrates were diafiltrated  
 334 in MF/UF modus according to Fig 1. The number of required diafiltration volumes was calculated by  
 335 equation (1) solved for  $\frac{V_P}{V_{MC}}$ . The number of diafiltration steps for the first option (3.4% casein,  
 336 0.01% whey proteins) was found to be 5.6. In order to reach the second optimal protein composition  
 337 (6.4% casein, 0.65% whey proteins) the UF milk concentrate had to be diafiltered by one diafiltration  
 338 volume. Both milk concentrates were UHT-treated under the conditions mentioned above and  
 339 underwent the standard renneting procedure.

340 Figures 5 and 6 show the absolute coagulation time and absolute firmness of the gels after 60 min after  
 341 rennet addition, respectively, of both milk concentrates and pasteurized skim milk. It can be clearly  
 342 seen that the coagulation properties of both experimental situations are comparable to those of  
 343 pasteurised skim milk. No significant differences between the absolute coagulation time of skim milk  
 344 and the milk concentrates were observed.

345 The coagulation time were in the standard range for rennet coagulation (Schreiber, 2000). The  
 346 absolute gel strength of the heated casein /whey protein concentrates was in the range of 0.2-0.5 N  
 347 which is known as the target value range for the gel strength of pasteurised milk according to Steffl  
 348 (1999) and Schreiber (2000).

## 349 4. Conclusions

350 The results of this study show that the impact of the heat induced denaturation of the whey proteins  
 351 and their reaction with the casein micelle surfaces can be overcome by manipulation of the protein  
 352 composition prior to heat treatment. Generally, two strategies can be chosen for the retention of the  
 353 rennetability of the heated milk: either, to completely remove the whey proteins by means of  
 354 diafiltration in the MF/UF modus or to compensate the negative impact of denatured whey proteins by  
 355 increasing of concentration of the micellar casein. These two procedures prior to heating enable the  
 356 same rennet coagulation time and the same rennet gel firmness as for pasteurized milk. The fact that a

357 retention of the renneting properties of the UHT treated milk is possible even after UHT heating  
358 conditions allows to assume that more gentle heating conditions in the 120 °C -range which still assure  
359 a complete inactivation of *Cl. tyrobutyricum* spores offer an broader temperature range available  
360 (Schreiber und Hinrichs, 2000). In this case the concentration levels of milk proteins would be even  
361 lower and the amount of the whey proteins that can be incorporated in the cheese matrix, could be  
362 higher than those selected by this study.

363 However, the results also show that the impairment of the rennetability of the heated milk is not only  
364 related to the denaturation of the whey proteins and their reaction with the casein micelles which are  
365 considered to be thermally stable. It has been shown that even in the absence of the whey proteins the  
366 rennet gel formation properties are impaired by the UHT treatment and must be compensated by an  
367 elevated casein concentration. This observation clearly demonstrates that a high temperature treatment  
368 of the milk results in some degree of modification of the casein micelles. These modifications can be  
369 related to a dissociation of the casein micelles (Aoki, Suzuki & Imamura, 1974), cross-linking  
370 reactions on the surface or within the micelles (Zin El-Din & Aoki, 1993, Bulca & Kulozik, 2004) as  
371 well as other reactions such as heat-induced changes of milk salts or modification of protein  
372 hydration. (Singh & Creamer, 1992). The kinetics of these modifications are currently being  
373 investigated.

#### 374 **Acknowledgements**

375 This research project was supported by the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V.,  
376 Bonn), the AiF and the Ministry of Economics and Labour. Project No.: AiF-FV 12718 N  
377 (*Technologies for cheese from UHT treated milk - Increased product safety without microbicidal*  
378 *additives*)

379 **References**

- 380 Aoki, T., Suzuki, H., & Imamura, T. (1974): Formation of soluble casein in whey protein-free milk  
381 heated at high temperature. *Milchwissenschaft*, 29, 589-594
- 382 Banks, J. M. Law, A. R. J. Leaver, J. & Horne, D. S. (1995). Maturation profiles of cheddar-type  
383 cheese produced from high heat treatment milk to incorporate whey protein. *In: Chemistry of*  
384 *structure-function relationships in cheese*, (pp. 221-236) Ed. (Malin, E. L., Tunick, M. H.), Plenum  
385 Press, New York
- 386 Banks, J. M. Stewart, G. Muir, D. D. & West, I. G. (1987). Increasing the yield of cheddar cheese by  
387 acidification of milk containing heat-denatured whey protein. *Milchwissenschaft*, 42, 212-215
- 388 Beyer, H. J. (1990). Zum Einfluss der Molkenproteinkonzentration auf das Denaturierungsverhalten  
389 der Molkenproteine sowie die damit verbundenen rheologischen Veränderungen. Dissertation,  
390 Technische Universität München, Germany
- 391 Bulca, S., Kulozik, U. (2004). Heat-induced changes in native casein micelles obtained by  
392 microfiltration. *Bulletin of International Dairy Federation*, 389, 36-39
- 393 Casiraghi, E. Lucisano, M. & Peri, C. (1989). Rennet coagulation of milk retentates. 2. The combined  
394 effect of heat treatments and protein concentration. *Journal of Dairy Science*, 72, 2457-2463
- 395 Dalgleish, D. G. (1980). A mechanism for the chymosin-induced flocculation of casein micelles.  
396 *Biophysical chemistry*, 11, 147-155
- 397 Dalgleish, D. G. (1990). The effect of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin on renneting-a quantitative  
398 study. *Milchwissenschaft*, 45, 491-494
- 399 Daviau, C. Pierre, A. Famelart, M.-H. Gougedranche, D. J. Garnier, M. & Maubois, J.-L. (2000) .  
400 Whey drainage during soft cheese manufacture and properties of drained curd as modified by casein  
401 concentration, whey protein to casein ratio, and the pasteurisation of milk, *Lait*, 80, 573-587
- 402 Garem, A. Schuck, P. & Maubois, J.- L. (2000). Cheesemaking properties of a new dairy-based  
403 powder made by a combination of microfiltration and ultrafiltration. *Lait*, 80 25-32
- 404 Garnot, P. (1988). Influence of milk concentration by UF on enzymatic coagulation. *Bulletin of the*  
405 *International Dairy Federation*, 225, 11-15
- 406 Ghosh, B. C. Steffl, A., & Kessler, H. G. (1996). Rennetability of milk containing different heat-  
407 denatured whey protein. *Milchwissenschaft*, 51, 28-31
- 408 Green, M. L. (1990). The cheesemaking potential of milk concentrated up to four-fold by  
409 ultrafiltration and heated in the range 90-97 °C. *Journal of Dairy Research*, 57, 549-557
- 410 Guinee, T. P., Gorry, C. B., O'Callaghan, D. J., O'Kennedy, B. T., O'Brien, N., & Fenelon, M. A.,  
411 (1997) The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation  
412 properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 90-105



- 413 Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495-  
414 503
- 415 Kannan, A. & Jenness, R. (1961). Relation of milk serum proteins and milk salts to the effects of heat  
416 treatment on rennet clotting. *Journal of Dairy Science*, 44, 808-822
- 417 Kersten, M. (2001). Proteinfraktionierung mittels Membrantrennverfahren. Fortschr. Ber. VDI, Reihe  
418 3, Nr. 709, Düsseldorf, VDI-Verlag
- 419 Kosikowski, F. V., & Mistry, V. V. (1990). Microfiltration, ultrafiltration and centrifugation  
420 separation and sterilization processes for improving milk and cheese quality. *Journal of Dairy Science*,  
421 73, 1411-1419
- 422 Kulozik, U., & Kersten, M. (2002). Membrane fractionation of dairy proteins by means of  
423 microfiltration, *Engineering in Life Science* 2, 275-278
- 424 Leaver, J., Law, A. J. R., Horne, D. S., & Banks, J. M. (1995). Influence of heating and pH on the  
425 primary phase of renneting of whole milk. *International Dairy Journal*, 5, 129-140
- 426 Lucey, J. A. Gorry, C., & Fox, P. F. (1993). Rennet coagulation properties of heated milk.  
427 *Agricultural and Food Science in Finland*, 2, 3461-3468
- 428 Marshall, R. J. (1986). Increasing cheese yields by high heat treatment of milk. *Journal of Dairy*  
429 *Research*, 53, 313-322
- 430 Maubois, J. L., & Mocquot, G. (1974). Application of membrane ultrafiltration to preparation of  
431 various types of cheese. *Journal of Dairy Science*, 58, 1001-1006
- 432 McMahon, D. J., Yousif, B. H., & Kalab, M. (1993) Effect of whey protein denaturation on structure  
433 of casein micelles and their rennetability after ultra-high temperature processing of milk with or  
434 without ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 3, 239-256
- 435 Mistry, V. V., & Maubois, J. L. (1993). Application of membrane separation technology to cheese  
436 production, In: Fox, P.F. (Ed.), (pp. 493-522) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1,  
437 General aspects, Chapman & Hall, London
- 438 Punidadas, P., & Rizvi, S. S. H. (1998). Separation of milk proteins into fractions rich in casein or  
439 whey proteins by cross flow filtration. *Food Research International*, 31, 265-272
- 440 Reddy, I. M., & Kinsella, J. E. (1990). Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with  $\kappa$ -casein in micelles as  
441 assessed by chymosin hydrolysis: effect of temperature, heating time,  $\beta$ -lactoglobulin concentration  
442 and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 50-58
- 443 Rodriguez, J., Requena, T., Fontecha, J., Gouedranche, H., & Juarez, M. (1999). Effect of different  
444 membrane separation technologies (ultrafiltration and microfiltration) on the texture and  
445 microstructure of semihard low-fat cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 558-565
- 446 Saboya, L. V., & Maubois, J. M. (2000). Current developments of microfiltration technology in the  
447 dairy industry. *Lait*, 80, 541-553

- 448 Schreiber, R. (2000). Funktionalität und Labgelbildung hocherhitzter Caseinmicellsuspensionen-  
449 Modellierung von Prozessparametern zur sicheren Käseherstellung. Fortsch. Ber. VDI, Reihe 3, Nr.  
450 644, Düsseldorf, VDI-Verlag
- 451 Schreiber, R. (2001). Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability.  
452 *International Dairy Journal*, 11, 553-558
- 453 Schreiber, R., & Hinrichs, J. (2000). Rennet coagulation of heated milk concentrates. *Lait*, 80, 33-42
- 454 Sharma, S. K., Hill, A. R. & Goff, H. D. (1990). The effect of heat treatment of ultrafiltered milk on  
455 its coagulation properties. *Milchwissenschaft*, 45, 432-435
- 456 Singh, H., & Waungana, A. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties.  
457 *International Dairy Journal*, 11, 543-551
- 458 Singh, H., & Creamer, L. K. (1992), Heat stability of milk. In Fox, P. F. (Hrsg.): *Advanced Dairy*  
459 *Chemistry-1: Proteins*. London und New York: Elsevier Applied Science
- 460 Singh, H., & Fox, P. F. (1985). Heat stability of milk: pH-dependent dissociation of micellar kappa  
461 casein on heating milk at ultra high temperatures. *Journal of Dairy Research*, 52, 529-538
- 462 Tolkach, A., & Kulozik, U. (2005): Fractionation of whey proteins and caseinomacropptide by means  
463 of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67, 13-  
464 20
- 465 Steffl, A. (1999). Integration von denaturierten Molkenproteinen in die Käsematrix von Weichkäse.  
466 München Technische Universität, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und  
467 Milchwissenschaft, Dissertation, Shaker Verlag, Aachen
- 468 Van Hooydonk, A. C. M., De Koster, P. G., & Boerrigter, I. J. (1987). The renneting properties of  
469 heated milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 41, 3-18
- 470 Van Reis, R., & Saksena, S. (1997). Optimization diagram for membrane separations. *Journal of*  
471 *Membrane Science*, 129, 19-29
- 472 Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., & Van Boekel, M. A. J. S. (1999). Dairy  
473 Technology, Principles of milk properties and processes, (pp. 100), Marcel Dekker, Inc. New York,  
474 Basel
- 475 Waungana, A., Singh, H., & Bennett, R. J. (1998). Rennet coagulation properties of skim milk  
476 concentrated by ultrafiltration: effects of heat treatment and pH adjustment. *Food Research*  
477 *International*, 31, 645-651
- 478 Waungana, A., Singh, H., & Bennett, R. J. (1996). Influence of denaturation and aggregation of  $\beta$ -  
479 lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Research*  
480 *International*, 29, 715-721
- 481 Wheelock, J. V., & Kirk, A. (1974). The role of  $\beta$ -lactoglobulin in the primary phase or rennin action  
482 on heated casein micelles and heated milk. *Journal of Dairy Research*, 41, 367-372

- 483 Wilson, G. A., & Wheelock, J. V. (1972). Factors affecting the action of rennet in heated milk.  
484 *Journal of Dairy Research*, 39, 413-419
- 485 Zin El-Din, M., & Aoki, T. (1993). Polymerisation of casein heating milk, *International Dairy*  
486 *Journal*, 3, 581-588

487 **Figures and Tables**

488 **Table 1:** Experimental design for the evaluation of the influence of casein and whey protein  
489 contents on the renneting properties of UHT-treated milk concentrates

490 **Figure 1:** Processing scheme for the preparation of milk concentrates with different contents of  
491 casein  
492 and whey protein by UTP-Microfiltration / Diafiltration

493 **Figure 2:** Effect of casein and whey protein concentrations prior to heating on the rennet  
494 coagulation  
495 time of UHT treated MF retentates: response surface (a) and isoeffect lines of relative  
496 coagulation time (b)

497 **Figure 3:** Effect of casein and whey protein concentrations prior to heating on the rennet gel  
498 properties of UHT treated MF retentates: response surface (a) and isoeffect lines of  
499 relative gel firmness (b)

500 **Figure 4:** Optimisation of the protein composition of MF milk concentrates prior to UHT treatment  
501 using the relative rennet coagulation time and gel firmness as criteria

502 **Figure 5:** Absolute rennet coagulation time of UHT-treated milk concentrates with optimal protein  
503 composition relative to pasteurised skim milk

504 **Figure 6:** Absolute gel firmness of the UHT-treated milk concentrates with optimal protein  
505 composition relative to pasteurised skim milk

506

507

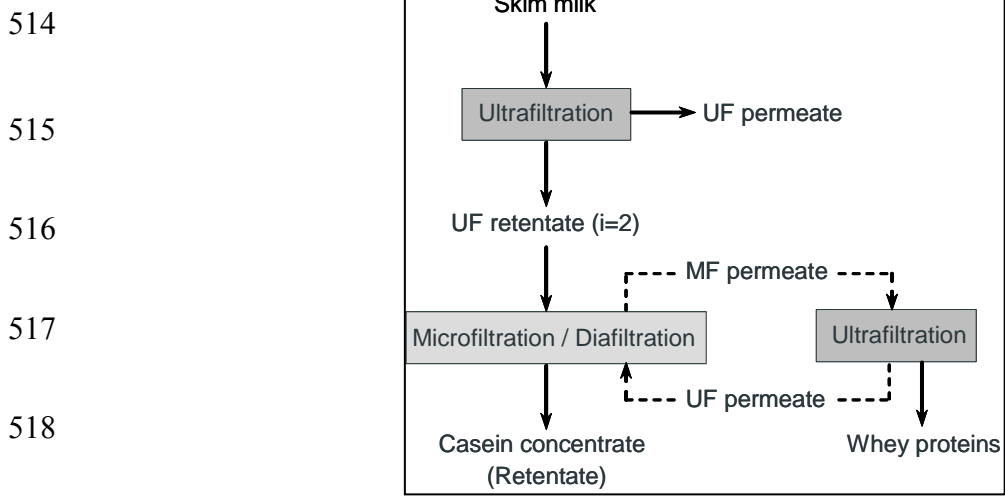
508

509 **Table 1:** Experimental design for the evaluation of the influence of casein and whey protein  
 510 contents on the renneting properties of UHT-treated milk concentrates

<b>Solutions</b>	<b>Total protein content [%]</b>	<b>Casein content [%]</b>	<b>Whey protein content [%]</b>
1	6.5	5.91	0.63
2		6.20	0.35
3		6.33	0.21
4		6.41	0.09
5		6.41	0.05
1a	4.9	4.47	0.47
2a		4.69	0.27
3a		4.77	0.16
4a		4.88	0.07
5a		4.83	0.038
1b	3.3	3.0	0.32
2b		3.18	0.18
3b		3.20	0.11
4b		3.23	0.045
5b		3.25	0.026

511

512 **Figure 1:** Processing scheme for the preparation of milk concentrates with different contents of  
513 casein and whey protein by UTP-Microfiltration / Diafiltration



520 **Figure 2:** Effect of casein and whey protein concentrations prior to heating on the rennet  
521 coagulation time of UHT treated MF retentates: response surface (a) and isoeffect lines of  
522 relative coagulation time (b)

523

524

525

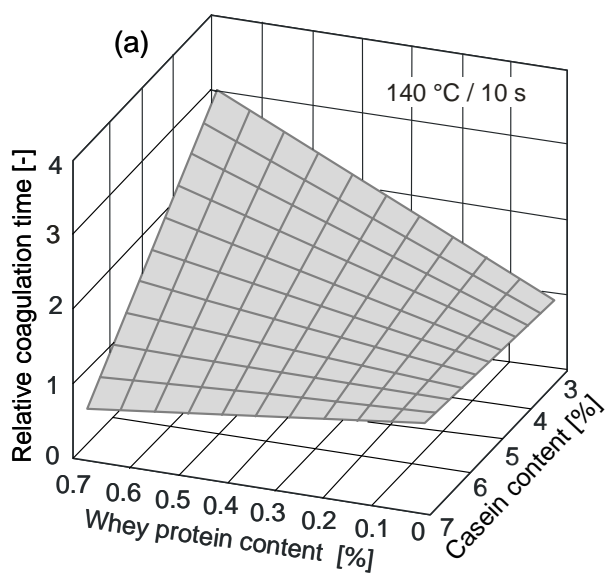
526

527

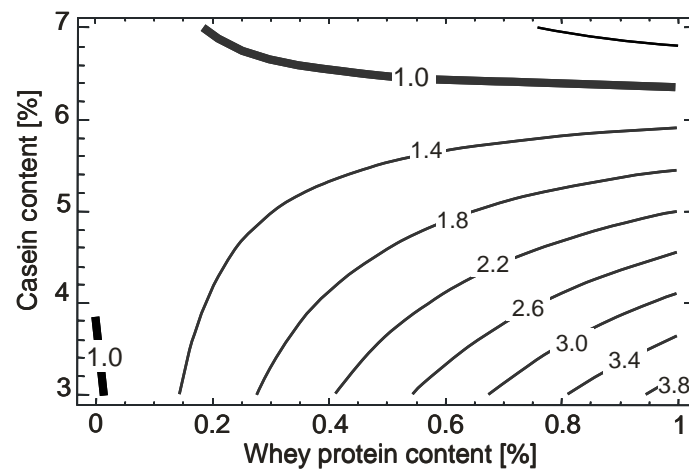
528

529

530



(b)



531 **Figure 3:** Effect of casein and whey protein concentrations prior to heating on the rennet gel  
532 properties of UHT treated MF retentates: response surface (a) and isoeffect lines of  
533 relative gel firmness (b)

534

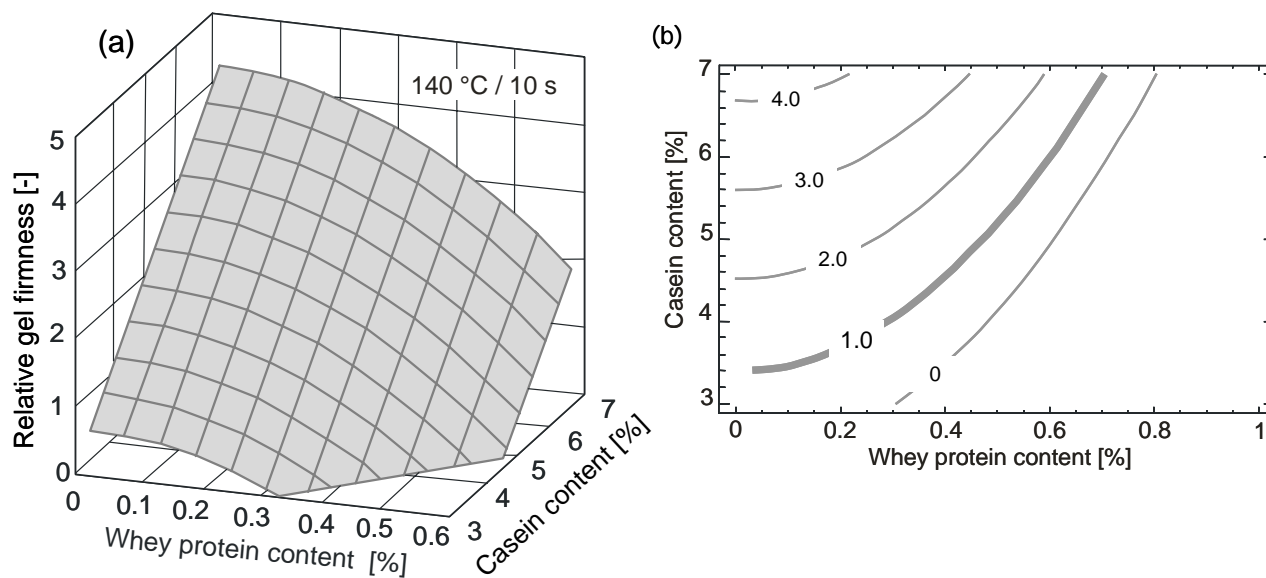
535

536

537

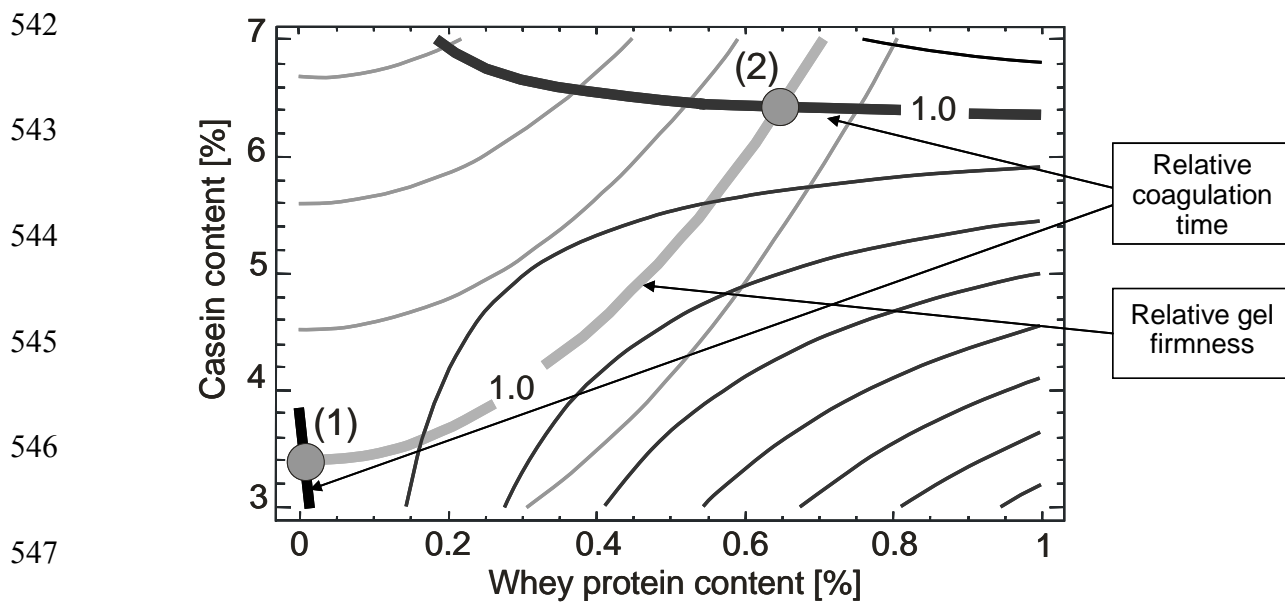
538

539





540 **Figure 4:** Optimisation of the protein composition of MF milk concentrates prior to UHT treatment  
541 using the relative rennet coagulation time and gel firmness as criteria

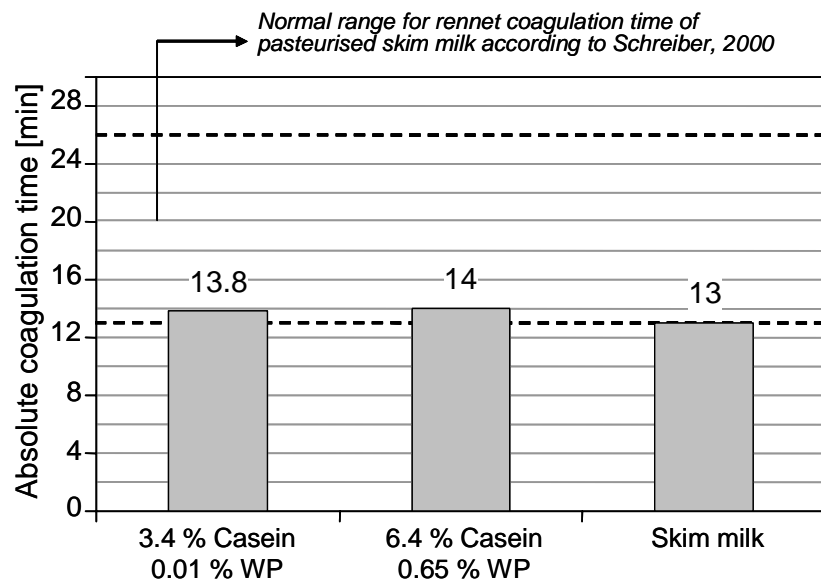


548

549

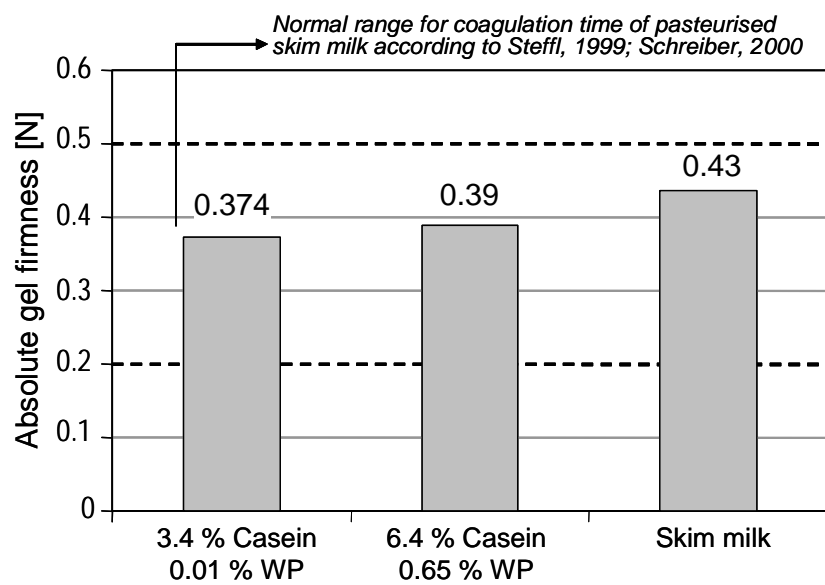
550

551 **Figure 5:** Absolute rennet coagulation time of UHT-treated milk concentrates with optimal protein  
552 composition relative to pasteurised skim milk



553

554 **Figure 6:** Absolute gel firmness of the UHT-treated milk concentrates with optimal protein  
555 composition relative to pasteurised skim milk



556

557

558

559

## **Geplante Publikationen in Vorbereitung bzw. formuliert**

1. Bulca, S., Tolkach, A., Kulozik, U.

Kinetic description of heat-induced cross-linking reactions of whey protein-free casein solutions in Vorbereitung für Journal of Agricultural and Food Chemistry

2. Bulca, S., Kulozik, U.

Heat-induced modifications of whey protein-free casein dispersions and the influence on the functional properties regarding the serum binding capacity of renneted gels in Vorbereitung für Journal of Food Engineering

3. Bulca, S., Kulozik, U.

Effect of UHT heating conditions on the ripening behaviour of cheese made from whey protein-free milk in Vorbereitung für Milchwissenschaft

4. Bulca, S., Lange, I., Kulozik, U.

Investigations of renneting properties of high heated whey protein-free casein dispersions as a function of casein content and NaCl concentration in Vorbereitung für Journal of Agricultural and Food Chemistry

## SELDA BULCA

### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

- Datum & Geburtsort: April 1972, Ankara - Türkei
- Familienstand: ledig
- Nationalität : Türkisch

### AUSBILDUNG & STUDIUM

---

- 2000- heute Technische Universität München (TUM), Deutschland  
Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, PhD  
Studentin  
Dokarbeitsthema: Hitzebedingte Veränderungen an der Caseinmicelle unter UHT-Bedingungen und deren Auswirkungen auf die Käseertechnologie
- 2000-2002 Aufbaustudium an der Technischen Universität München, Weihenstephan-Freising / Deutschland,
- 1995-2000 Studium der Lebensmitteltechnologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim / Deutschland  
Diplomarbeitsthema: Adaptation von Lactobazillen aus Sauerteig an das Wachstum in Milch.
- 1994-1995 Deutschkurs in Freiburg und Stauf en a. d. Breisgau
- 1989-1993 Studium der Milchtechnologie an der Universität Ankara, Türkei  
Titel: Dipl.-Ing. agr.
- 1986-1989 Ankara Kalaba Gymnasium, Ankara-Türkei

### ARBEITSERFAHRUNG

---

- Juli 1992-Aug 1992 Praktikum bei dem Direktorium für Milch und Milchprodukte  
Trabzon, Türkei
- Okt 1999-Nov 1999 Praktikum bei dem Fleischkombinat in Ankara, Türkei

### FREMDSPRACHEN

---

- Türkisch (*Muttersprache*)  
Deutsch (*Fließend mündlich und schriftlich*)  
Englisch (*Fortgeschritten*)