

Juli 1982 / 119

Herausgegeben von der
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc

Lab- und Säuregerinnung der Milch

O. Flüeler
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
3097 Liebefeld-Bern

1. Einleitung

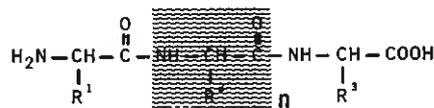
Die geschichtlichen Ueberlieferungen der Essens- und Lebensgewohnheiten der Völker aus der Frühzeit lehren uns, dass die Kenntnis der Milchverarbeitung sehr alt sein muss. Danach scheinen schon 5000—6000 Jahre vor der modernen Zeitrechnung die Jäger- und Hirtenvölker Kleinasiens und Arabiens Magenblasen und Gedärme frisch geschlachteter Tiere zur Aufbewahrung von Flüssigkeiten, namentlich Milch, benützt zu haben. Meistens wird die darin aufbewahrte Milch dick und sauer geworden sein. Die ausgeschiedene weisse Käsemasse und die grünliche Sirte bereicherten das Speiseangebot dieser Menschen. Ob für die zufällige Käseherstellung der frühen Hirtenvölker die Labgerinnung oder die Säuregerinnung ausschlaggebend sein mochte, ist heute bedeutungslos. Die unter dem Begriff «Nomadenkäse» bekannten, käseartigen Erzeugnisse Kleinasiens, lassen noch viel vom ursprünglichen Herstellungsverfahren erkennen.

In der Entwicklung aller heute bekannten Käsesorten, spielte die unterschiedliche Anwendung der Lab- und der Säuregerinnung der Milch eine nicht unbedeutende Rolle. Die Bereitstellung der breitgefächerten Palette feinsten Milchprodukte wäre ohne die bewusste Anwendung von Lab- und Säuregerinnung nicht möglich. In den nachfolgenden Ausführungen sollen die chemisch-physikalischen Zusammenhänge für die Lab- und Säuregerinnung dargelegt und deren bedeutendsten Auswirkungen auf das Produkt aufgezeigt werden.

2. Aufbau des Caseins

Das Casein der Milch ist wie andere Proteine aus langen und unverzweigten Ketten, den sogenannten Polypeptidketten aufgebaut. Die Glieder dieser Polypeptidketten werden durch Aminosäuren gebildet. In einer Polypeptidkette können mehrere hundert Aminosäuren enthalten sein. MERCIER et al. (9) ermittelten im Falle des β -Caseins 209 Aminosäuremoleküle.

Aminosäuren sind organische Verbindungen. Sie enthalten immer eine Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), eine Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) und eine



α -Casein: $n = 199$ Aminosäuren
 β -Casein: $n = 209$ Aminosäuren
 κ -Casein: $n \sim 170$ Aminosäuren

Abb. 1: Beispiel einer Polypeptidkette

Restgruppe (R, auch Seitengruppe genannt). Die einzelnen Aminosäuren einer Polypeptidkette sind über die Carboxylgruppe und die Aminogruppe miteinander fest verbunden; die Verknüpfungsstelle wird als Peptidbindung bezeichnet. Diese Bindung ist sehr fest und kann nur mit starken, kochenden Säuren oder von proteolytischen Enzymen (Proteasen) gespalten werden. Die Restgruppen (R) der einzelnen Aminosäuren sind entlang der Polypeptidkette als kurze Seitenketten gebunden.

Die Aminosäuren haben bestimmte Eigenschaften, die auch noch in den Proteinen zur Wirkung kommen. Auf-

grund dieser Eigenschaften kennen wir eine grosse Anzahl verschiedener Aminosäuren. In den natürlich vorkommenden Proteinen unterscheidet man zwischen 20 Aminosäuren. In den Milchproteinen sind davon 19 enthalten.

Die spezifischen Eigenschaften der Aminosäuren werden hauptsächlich durch die Restgruppen (Seitengruppen) bestimmt. Entsprechend ihren chemischen Merkmalen und der dadurch bewirkten Reaktionen unterscheiden wir zwischen polaren-ionisierbaren Seitenketten, polaren-nicht-ionisierbaren Seitenketten und nicht-polaren Seitenketten.

Die Seitengruppen der Aminosäuren einer Polypeptidkette sind zu den verschiedensten Reaktionen befähigt. Unter bestimmten Bedingungen vermögen sie Ionen (z. B. Calcium, Phosphat) zu binden oder mit den Seitengruppen anderer Aminosäuren und benachbarten Polypeptidketten Bindungen (Wasserstoff-, Disulfid- oder Phosphatesterbrücken) einzugehen. Die Anzahl und die Art der Seitenketten einer Polypeptidkette sowie ihr zahlenmässiges Verhältnis zueinander auf der Oberfläche eines Proteinteilchens (Casein-Micelle) haben wichtige Eigenschaften des Caseins zur Folge, zum Beispiel:

- sie sind für die räumliche Struktur des Caseins und für den Aufbau der Caseinteilchen (Micellen) verantwortlich;
- sie bedingen das Calcium- und Phosphat-Bindungsvermögen des Caseins;
- sie bestimmen den schwach sauren Charakter des nativen Caseins sowie die elektrische Ladung der Casein-Micellen;

- sie bewirken das Wasserbindungsvermögen (Hydratation) und ermöglichen die kolloidale Löslichkeit des Caseins;
- sie befähigen das Casein zur Salzbildung (z. B. Caseinate);
- sie verleihen den Proteinen die Eigenschaft im elektrischen Feld zu wandern (elektrophoretische Untersuchungen).

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaues der Polypeptidketten (Zahl, Art und Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren) unterscheiden wir zwischen α -, β - und κ -Casein. Vorkommen und spezielle Eigenschaften dieser Casein-Fractionen in Milch sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Das Casein kommt in frisch ermolkenen Milch in Form von Casein-Micellen vor, die sich aus den verschiedenen Fractionen aufbauen. Ein Casein-Komplex besteht aus einem Agglomerat der Fractionen α_{s1} -, β -, γ - und κ -Casein in einem Verhältnis, das KIRCHMEIER (6) mit 9:4:1:3 angibt. Die Polypeptidketten sind da-

bei durch ihre Karboxylgruppen und die reaktionsfähigen Seitenketten miteinander verbunden. Das Calcium ist dabei von Bedeutung. Viele dieser Casein-Komplexe vereinigen sich nun mit Hilfe von Calcium-Ionen und Calcium-Phosphaten zu Casein-Micellen, den bekannten kugelförmigen Gebilden (Abbildungen 2 und 4). Ihr Durchmesser liegt zwischen 10–160 nm (1 nm = 1/1000 000 mm) und ist rund 10 mal kleiner als die Fettkügelchen der Milch. Am Aufbau der Casein-Micelle sind rund 7 000 bis 10 000 Polypeptidketten beteiligt.

Da sich die einzelnen Caseinfraktionen in ihrer Löslichkeit und ihrer Calciumempfindlichkeit stark unterscheiden, erfolgt der Aufbau der Casein-Micelle nach einem bestimmten Prinzip (Abbildung 2). Nach Modellvorstellungen (1, 9) befindet sich das κ -Casein vorwiegend an der Oberfläche der Micelle, wobei der negativ geladene, hydrophile Teil — das sog. Glukomakropeptid — nach außen gerichtet ist. Die hydrophoben α_{s1} - und β -Caseine sind vorzugsweise im Micell-Innern angeordnet.

Tabelle 1: Casein-Fractionen der Kuhmilch und ihre wichtigsten Eigenschaften

Bezeichnung	Vorkommen	Eigenschaften
α -Casein:		
— α_{s1} -Casein	45—55%	— Calcium-empfindlich, flokkt in Gegenwart von Ca-Ionen aus, wird durch κ -Casein stabilisiert;
— κ -Casein	8—15%	— Calcium-unempfindlich, wirkt als Schutzkolloid des gesamten Casein-komplexes und bewirkt kolloidale Löslichkeit, wird von Lab angegriffen;
β -Casein:	25—35%	— Calcium-unempfindlich
γ -Casein:		
R-, S-, TS-Casein	3—7%	— Minor-Komponenten, Fragmente des β -Caseins

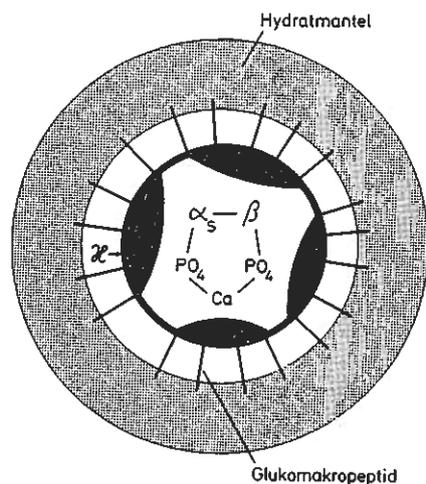


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Casein-Micelle, umgeben von einer Hydrathülle

Die Casein-Micellen sind in ihrem ursprünglichen Zustand von einer

Hydrathülle (Wassermantel), die gleichzeitig eine Schutzhülle darstellt, umgeben. Diese ist auch für die feine Verteilung des Caseins in der Milch verantwortlich. Die Hydrathülle kommt vor allem aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des κ -Caseins und der elektrischen Ladungen auf der Micellenoberfläche sowie des polaren Charakters der Wassermoleküle zustande. Für die Stärke dieser Hydrathülle sind hauptsächlich der pH-Wert und die Mineralsalz-Zusammensetzung der Milch verantwortlich. Sie bestimmen damit die Labfähigkeit einer Milch.

3. Labgerinnung und deren Einflussfaktoren

Bei der Labgerinnung wird grundsätzlich zwischen drei Phasen unterschieden:

- Primär- bzw. enzymatische Phase
- Sekundär- bzw. Koagulations-Phase
- Tertiär- bzw. Griff-Bildungs-Phase (Synärese)

Die Vorgänge in der Milch nach der Zugabe von Lab gehen aus der Darstellung in Abbildung 3 hervor.

MECHANISMUS DER LABGERINNUNG:

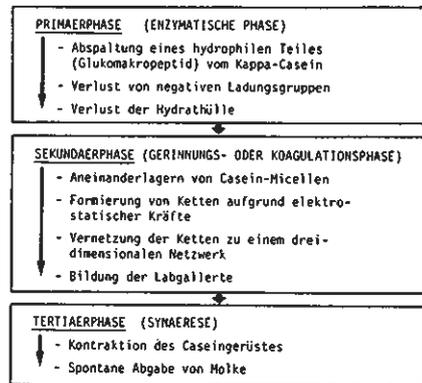


Abb. 3: Vorgänge bei der Labgerinnung der Milch

In frischer Milch sind die kugelförmigen Casein-Teilchen feinst verteilt (Abbildung 4). Aufgrund ihrer stark negativen Ladung stoßen sie sich gegenseitig ab. Nach der Labzugabe zur Milch wird durch die Wirkung des Labenzym der stark negativ geladene, hydrophile Teil des κ -Caseins auf der Micellenoberfläche abgespalten und geht als sog. Glukomakropeptid in Lösung (\rightarrow Primär-Phase).

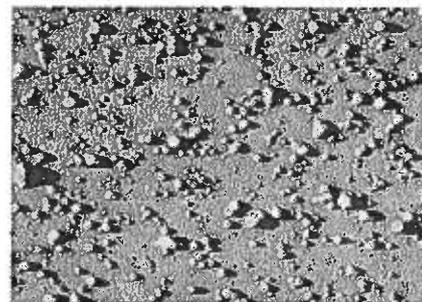


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Casein-Micellen der Milch vor der Labzugabe

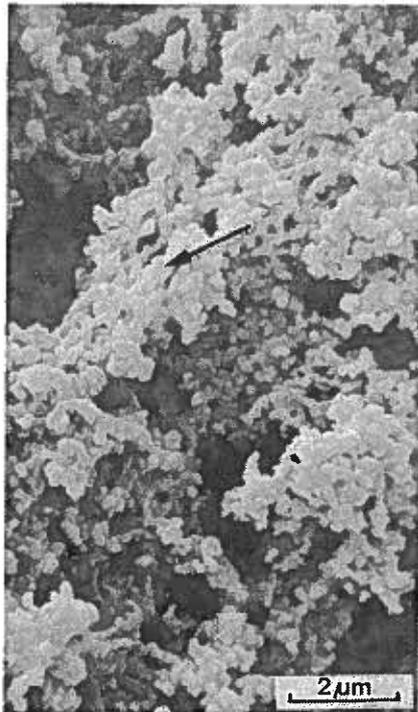
Als Folge der Labwirkung befinden sich auf den Micellen-Oberflächen annähernd gleichviele negative wie positive Ladungen, die mit den Ionen der Milch (z. B. Calcium) oder mit Seitengruppen benachbarter Micellen Verbindungen eingehen. In der Folge führt dies zu einer Aneinanderlagerung der Casein-Micellen und zur Bildung langer, unverzweigter Ketten (\rightarrow Koagulationsphase). Im weiteren Gerinnungsverlauf werden die Micellenketten zu einem dichten Netzwerk verflochten, das in seinen

Hohlräumen Wasser mit den gelösten Milchinhaltstoffen und die Fettkügelchen einschliesst. Dieser Zustand entspricht der noch zarten Gallerte im Kessi vor der Bruchbereitung. Abbildung 5a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Labgallerte kurz nach der Gerinnung. Die kugelförmigen Casein-Micellen sind dabei noch deutlich zu erkennen.

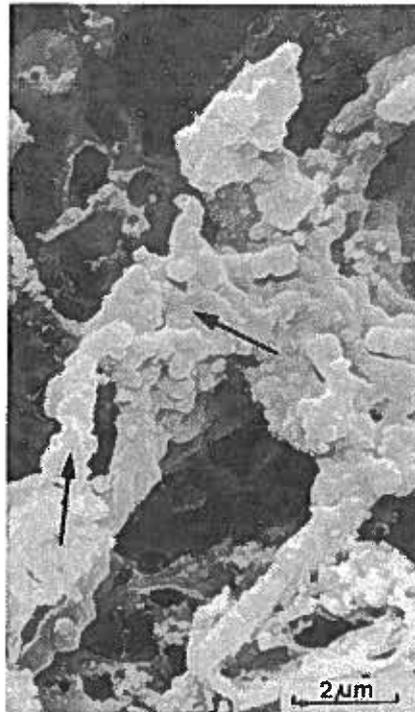
Die frisch geronnene Milch hat normalerweise das Bestreben sich durch Verringerung der Bindungsabstände

zwischen den Micellen und durch Vervielfachung der Verknüpfungspunkte zu verfestigen. Die eingeschlossene Molke wird dabei aus dem Caseingerüst ausgepresst (\rightarrow Synärese). Im fortgeschrittenen Stadium dieses Prozesses verlieren die Casein-Micellen ihre ursprüngliche Form (Abbildung 5b). Bei der Käsefabrikation wird die Synärese des Caseins durch Zerschneiden der Gallerte, Vorkäsen, Wärmen und Ausrühren des Sirten-Bruchgemisches gefördert.

zu unverzweigten Ketten (Sekundärphase) beginnt ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt — anfänglich langsam, gegen den Flockungspunkt hin immer schneller. Die Milch bleibt dabei noch flüssig. Nach KNOOP und Mit. (8) beginnt kurze Zeit vor dem Sichtbarwerden des Flockungspunktes die Verzweigung der Micellen-Ketten und die Ausbildung des Casein-Gerüsts. Der Käser beobachtet zu diesem Zeitpunkt im Kessi das «Ziehen». Mit fortschreitender Gerinnung verdichtet sich dieses Netzwerk zunehmend, und die Gallerte verfestigt sich dabei immer mehr. Mechanische Einflüsse auf die gerinnende Milch, wie Temperaturveränderungen, Rühren oder Bewegungen der Milch, stören den Aufbau der Gallerte und verschlechtern die Synärese, was sich in ausgeprägtem Masse auf die Teigeigenschaften des Käses auswirken kann.



a)



b)

Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Labgallerte (a) unmittelbar nach der Gerinnung und (b) 80 Minuten später, nach erfolgtem Fabrikationsprozess für Greyerz Käse (Brenntemperatur = 56 °C). Das Zusammenfließen der Casein-Micellen ist dabei deutlich zu erkennen. (Die EM-Aufnahmen der Bruchkörner wurden in verdankenswerter Weise durch Dr. M. Rüegg und Fr. U. Moor ausgeführt)

Tabelle 2: Einfluss der Gerinnungstemperatur auf den Labverbrauch bei der Emmentalerfabrikation (Parallelfabrikation in drei Kessi, n = 15)*

		Variante 1	Kontrolle	Variante 2
Einlabungstemperatur	°C	30	32	34
Labverbrauch (ml/100 l Milch)	\bar{x}	163	151	141
	s	10	8	9
Labungszeit (Minuten)	\bar{x}	32	32	32
Mehr- bzw. Minderverbrauch an Labextrakt	(%)	+7,9	—	—6,6

* EFAM-Versuch im Jahre 1978/79 (3)

Der zeitliche Ablauf des Labgerinnungsprozesses ist dadurch gekennzeichnet, dass sich einzelne Gerinnungsphasen deutlich überschneiden und zum Teil nebeneinander ablaufen.

Die Primärphase beginnt sofort nach der Zugabe von Lab in die Kessi-

milch. Die Abspaltung des Glukomakropeptides ist zu Beginn der Labgerinnung am grössten und verflacht im weiteren Verlaufe der Gerinnung. Das abgespaltene Glukomakropeptid lässt sich in der Milch als Nichtprotein-Stickstoff (NPN) nachweisen. Die Formierung der Casein-Micellen

Für den Labgerinnungsvorgang sind folgende Faktoren von Bedeutung: Temperatur und pH-Wert der eingelabten Milch, Labkonzentration sowie Mineralsalzzusammensetzung der Milch.

Temperatur: Die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion nimmt mit steigender Temperatur zu. Für die Labgerinnung mit handelsüblichem Kälberlab gilt die Beziehung bis zu einem Temperaturbereich von 38—41 °C. Bei höheren Temperaturen wird das Labenzym inaktiviert. Die Beziehung zwischen der Gerinnungstemperatur und dem Labverbrauch geht aus einem Fabrikationsversuch für Emmentaler Käse in der Versuchskäserei Uetligen in Tabelle 2 hervor.

pH-Wert: Enzyme sind in ausgeprägtem Masse vom pH-Wert abhängig. Bei der Milchgerinnung mit Lab verkürzt sich die Gerinnungszeit mit sinkendem pH-Wert der Milch (Abbildung 6). Das pH-Optimum für das Labenzym (Chymosin) liegt in einem Bereiche vom pH 5,3—6,3. Somit ist für die Labgerinnung der Säuregrad bzw. der pH-Wert der Kessimilch zum Zeitpunkt des Einlabens von grosser Bedeutung.

Labkonzentration: Die Geschwindigkeit der Labgerinnung entspricht weitgehend dem Zeitgesetz von STORCH und SEGELCKE (11). Danach besteht zwischen der Labkonzentration in der eingelabten Milch und der Gerinnungsdauer eine lineare Beziehung. Die Labungszeit der Milch verkürzt sich mit zunehmender Menge an Lab. Ein allfälliger Was-

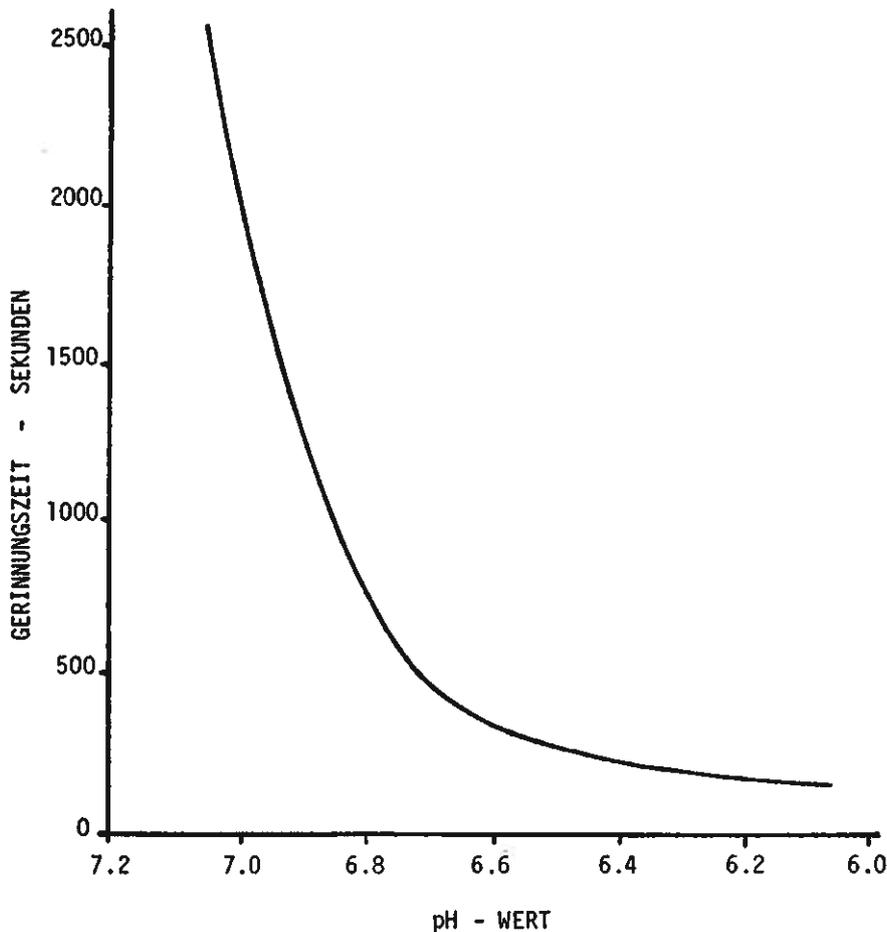


Abb. 6: Labgerinnungszeit der Milch in Abhängigkeit von dessen pH-Wert

Tabelle 3: Auswirkungen des Wasserzusatzes in die Kessimilch auf den Labverbrauch (Parallelfabrikation in drei Kessi; Durchschnittswerte, n = 15)*

			Kessi 1	Kessi 2	Kessi 3
Milch	(kg)	\bar{x}	1 009	1 009	1 009
Wasserzusatz	(%)		0	10	20
Labverbrauch		\bar{x}	135	150	165
(ml Extrakt/Kessi)		s	7	8	9
Labungszeit	(Minuten)	\bar{x}	31,6	31,2	32,5
		s	0,7	1,0	1,3
Mehrverbrauch an Extrakt	(%)		—	+11,1	+22,2

* EFAM-Versuch im Jahre 1979 (3)

serzusatz in die Kessimilch entspricht einer Verdünnung der Enzymkonzentration, was eine Verlängerung der Gerinnungsdauer nach sich ziehen würde (Tabelle 3). In diesem Fall muss zur Einhaltung einer bestimmten Labungszeit, die Labzugabe entsprechend dem Wasserzusatz erhöht werden.

Mineralsalzzusammensetzung der Milch: Das Gerinnungsverhalten von Milch wird vor allem durch die Mineralsalzzusammensetzung und deren Löslichkeitsverhältnissen beeinflusst. Nach neueren Erkenntnissen sind hierfür hauptsächlich Calcium, Citrat, Phosphat sowie das Casein verantwortlich (8, 2). Die Milch einzelner

Kühe unterscheidet sich von Natur aus deutlich in ihrer Mineralsalzzusammensetzung. Diese Erscheinung zeigt sich am ausgeprägtesten im Falle von Euterentzündungen. Mastitis-Milch (positiver Laugentest) zeigt bekanntlich ein schlechtes Gerinnungsverhalten (4, 10).

Dem Calcium kommt bei der Labgerinnung eine zentrale Bedeutung zu. In der Milch erscheint es in den Lösungsformen «echt gelöst» (Ca^{++} , $\text{CaC}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$, CaPO_4^- etc.), «kolloidal gelöst» ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) oder «Casein-gebunden» vor. Die verschiedenen Lösungsformen stehen mengenmäßig in einem bestimmten Abhängigkeitsverhältnis zueinander, es bestehen mehrere Gleichgewichtsbeziehungen.

Wird das Verhältnis einer Lösungsform zur anderen durch eine bestimmte technologische Massnahme wie Erhitzen, CaCl_2 -Zusatz oder Ansäuern verschoben, so verändern sich auch die anderen Gleichgewichtsbeziehungen (Abbildungen 7 und 8). Für das Gerinnungsverhalten von Milch ist das Casein-gebundene Calcium von grösster Bedeutung — die Labfähigkeit ist bei dessen grösserem Anteil verbessert.

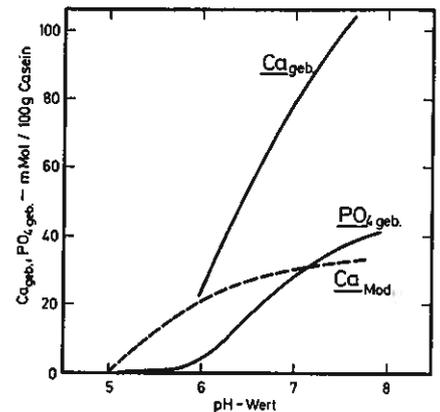


Abb. 7: Abhängigkeit des Casein-gebundenen Calciums (Ca geb.) bzw. Phosphates ($\text{PO}_4 \text{ geb.}$) vom pH-Wert der Milch nach ZITTE, C. A. et al. (12)

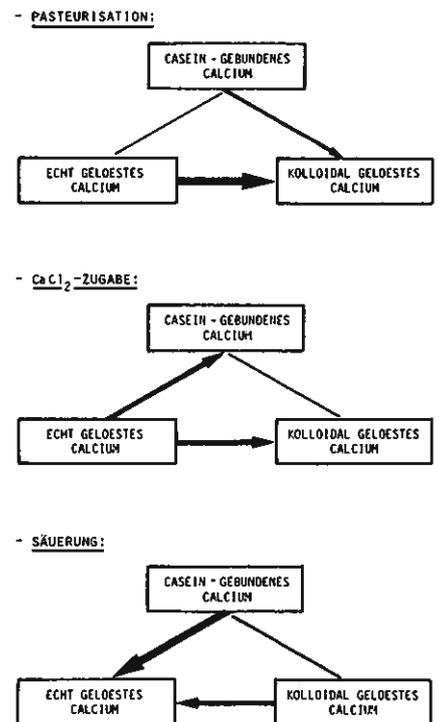


Abb. 8: Auswirkungen einiger technologischer Massnahmen auf die Löslichkeitsverhältnisse des Calciums in Milch

4. Säuregerinnung

Die Säuregerinnung beruht auf einer starken Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes der reaktionsfähigen Gruppen an der Oberfläche

der Casein-Micellen. Eine Erhöhung der H-Ionenkonzentration (pH-Senkung), sei dies durch die Säurebildung der Milchsäurebakterien (z. B. bei Joghurt) oder durch Säurezusatz, bewirkt eine undissoziierte Verbindung zwischen den Karboxylgruppen

Bei der Käseherstellung handelt es sich in der Regel um eine kombinierte Wirkung von Lab und Säure. Die Synärese einer Labgallerte kann je nach Käsetyp durch einen entsprechenden Säuerungsverlauf im jungen Käse mehr oder weniger gefördert werden. Mit der genauen Kenntnis der bei der Gerinnung ablaufenden Vorgänge, verfügt der Käser über ein wirksames Mittel zur Beeinflussung der Teigeigenschaften im Käse.

SAURER BEREICH	ISOELEKTRISCHER BEREICH	BASISCHER BEREICH
$^+H_3N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COOH}{ }}{C}}-H$	$H_2N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COOH}{ }}{C}}-H$	$H_2N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COO^-}{ }}{C}}-H$
$\xrightleftharpoons[+OH]{+H^+}$	$\xrightleftharpoons[+OH]{+H^+}$	
pH < 4,10	pH = 4,10 - 4,60	pH > 4,60

Abb. 9: Verhalten des Caseins bei Säure- bzw. Laugenzugabe

des Caseins und den H-Ionen der Säure: $R-COO^- + H^+ \rightarrow R-COOH$. Die negative Ueberschussladung des Caseins wird dabei aufgehoben, die Casein-Micellen verlieren damit ihre Hydrathülle (8). Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits dargelegt wurde, befinden sich auf der Oberfläche der Casein-Micellen nicht nur negativ geladene Karboxylgruppen, sondern auch positiv geladene Aminogruppen. Bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration ist die Dissoziation der Karboxylgruppen so weit zurückgedrängt, dass die Anzahl der negativen und der positiven Ladungen auf den Micellen-Oberflächen gleich ist. Dieser Punkt wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet. Bei der Milch liegt er in einem pH-

Bereich von 4,1—4,6. In diesem Zustand besitzen alle Eiweissstoffe ein Minimum an Löslichkeit.

Der isoelektrische Punkt ist gleichbedeutend mit der geringsten Ladung, das Caseinteilchen hat bei diesem pH-Wert die schwächste Hydrathülle. Die Säuregerinnung der Milch ist daher eine isoelektrische Fällung des Caseins als Folge der Anlagerung von H-Ionen und der Abspaltung von Casein-gebundenem Calcium.

Im Gegensatz zur Labgerinnung ist die Säuregerinnung der Milch ein reversibler Vorgang. Durch entsprechende Laugenzugabe erhält das Casein wieder eine elektrische Ladung und wird in Lösung gebracht.

* * *

Literaturverzeichnis

- 1 FARREL, J. R.: J. Dairy Sci., **56**, 1195—1206 (1973)
- 2 FLÜELER, O.: Diss.-Nr. 6045, ETH-Zürich (1977)
- 3 FLÜELER, O., SCHÄR, H. und KAUFMANN, H.: Interne Berichte Nr. 32 und 39, EFAM-Liebfeld (1979/80)
- 4 GUTHY, K.: Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch, **33**, 105—107 (1979)
- 5 KIRCHMEIER, O.: Z. f. Lebensm.-Untersuchung und -Forschung, **149**, 211—217 (1972)
- 6 KIRCHMEIER, O.: Milchwissenschaft, **24**, 336—343 (1969)
- 7 KNOOP, A. M. und PETERS, K.-H.: Kieler Milchw. Forschungsberichte, **27**, 227—248 (1975)
- 8 KNOOP, A. M. und PETERS, K.-H.: Milchwissenschaft, **31**, 338—345 (1976)
- 9 MERCIER, J. C., GROSCLAUDE, F. et RIBADEAU-DUMAS, B.: Milchwissenschaft, **27**, 402—407 (1972)
- 10 RASELLI, R.: Vet. Med. Diss. Bern, 1958
- 11 STORCH und SEGELCKE zit. nach HOSTETTLER, H. et al.: Schweiz. Milchzeitung, **81**, Wiss. Beil. 23, 24 (1955)
- 12 ZITTLE, C. A., DELLA MONICA, E. S., RUDD, R. K. und CUSTER, J. H.: Archs. Biochem. Biophys., **76**, 343-353 (1958)