

## Prozessentwicklung zur Fraktionierung der Milchfettkugelmembran

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie Prof. Dr. Ulrich Kulozik
<b>Industriegruppen:</b>	VDMA - Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e.V., Frankfurt Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technische Universität München e.V.
	Projektkoordinator: Franz-Josef Koße Privatmolkerei Naarmann GmbH, Neuenkirchen
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 302.400,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Milchfett wird durch eine Milchfettkugelmembran (MFKM) stabilisiert, die beim Buttern von Rahm in die Buttermilch übergeht und dort angereichert vorliegt. Buttermilch fällt in der industriellen Milchverarbeitung in Deutschland in enormen Mengen an (ca. 680.000 t/a), so dass eine Aufbereitung einzelner Inhaltsstoffe von großem wirtschaftlichen Interesse ist.

Die MFKM bildet eine komplexe Suprastruktur aus, die sich primär in Lipide und Proteine untergliedern lässt und die mit einem funktionellen Potential in Verbindung gebracht wird. Neben guten Emulgier- und Schaumbildungseigenschaften wird vielen MFKM-Komponenten zudem ein physiologischer Nutzen zugesprochen. In Hinblick auf die Untersuchung funktioneller und technologischer Eigenschaften von MFKM-Bestandteilen liegt momentan ein einseitiger Fokus auf den Lipiden, der sich insbesondere dadurch erklärt, dass bisher keine Methoden zur Isolation und Gewinnung der MFKM-Proteine im präparativen Maßstab existieren, obwohl diese mit ca. 70 % der MFKM-Trockenmasse mengenmäßig dominieren und daher von größerer Bedeutung sein können.

Gängige MFKM-Konzentrate sind meist Mischungen der Lipid- und Proteinfractionen ohne definierte Zusammensetzung aufgrund stark variierender Vorbehandlungen des Ausgangsmaterials. Es existiert keine genaue Kenntnis darüber, welche der Einzelbestandteile für die bisher beschriebenen funktionellen Eigenschaften verantwortlich sind. Auch können unterschiedliche Gewinnungsmethoden zur selektiven An- oder Abreicherung einzelner MFKM-Proteine sowie zu mangelnder Isolierung der MFKM von den Caseinen und Molkenproteinen aus dem Milchserum führen. Die verfügbaren Verfahren zur MFKM-Gewinnung in isolierter Form sind noch unzureichend, um funktionelle Eigenschaften eindeutig festzustellen und die selektive Gewinnung von MFKM-Proteinen und -Lipiden ist bisher nur ansatzweise untersucht. Die Kenntnis und Steuerbarkeit der Zusammensetzung von MFKM-Konzentraten ist jedoch von großer Bedeutung, weil die verschiedenen Proteine der MFKM auch mit unterschiedlichen biofunktionellen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden. So wurde in epidemiologischen bzw. medizinischen Studien ein möglicher Zusammenhang zwischen dem MFKM-Protein Butyrophilin und

einer antagonistischen Wirkung für das Entstehen von Multipler Sklerose konstatiert. Eine entsprechende selektive Anreicherung könnte in diesem Zusammenhang von enormer Bedeutung sein.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, zunächst Methoden zur effizienten Isolierung von MFKM-Material zu entwickeln und zu charakterisieren. Des Weiteren sollte eine Trennung der Proteine und Phospholipide aus der MFKM sowie eine weitere Fraktionierung der MFKM-Proteine mittels Membran-Adsorptions-Chromatographie (MAC) unter Aufrechterhaltung von deren technologischem und biofunktionellem Potenzial realisiert werden. Erst wenn eine ausreichende Menge an reinem Proteinmaterial verfügbar ist, können die einzelnen Funktionalitäten separat untersucht werden. Das zentrale wissenschaftliche Ziel war ferner, weitere Informationen über die komplexe und bislang unzureichend erforschte MFKM-Zusammensetzung zu generieren.

#### **Forschungsergebnis:**

Die Isolierung und Gewinnung von funktionellem MFKM-Material aus Buttermilch unter Aufrechterhaltung der Nativität aller MFKM-Bestandteile ist bislang unzureichend erforscht. Daher wurde in dem ersten Teil des Forschungsvorhabens das in der Literatur als Standardmethode zur MFKM-Isolierung beschriebene Rahmwaschen herangezogen, um Caseine und Molkenproteine abzutrennen. In Abhängigkeit des Waschwasservolumens konnten nach 3-4 Waschschritten nahezu alle Magermilchproteine ausgewaschen werden. Gleichzeitig wurde aber ein Verlust an MFKM-Proteinen von 60 % (PAS 6/7) bis teilweise 90 % (BTN) im Vergleich zur nicht gewaschenen Nullprobe festgestellt. Zwar werden auftretende Verluste an MFKM-Material punktuell in der Literatur angesprochen, quantitative Aussagen bezüglich des spezifischen Verlusts an MFKM-Proteinen fehlen allerdings. Woher genau diese Verluste an MFKM-Proteinen kommen und welche Auswirkungen das Rahmwaschen auf die Fettkugestabilität und MFKM-Zusammensetzung hat, ist ebenso in unzureichender Weise dargelegt. Aus diesem Grund war es notwendig, zunächst den Waschprozess hinsichtlich des Verlusts an MFKM-Protein genauer zu charakterisieren und zu bewerten. Durch die Variation an Prozessparametern (Anzahl der Waschschriffe, Fettgehalte des zu waschenden Rahms, Art der Waschlösung) sowie die Untersuchung einzelner Prozessschritte (Drehkolbenpumpe, Röhrenwärmetauscher, Separator) konn-

te der Einfluss des Rahmwaschens auf die Fettkugestabilität bestimmt werden. Die mittels Partikelgrößenmessungen analysierte Koaleszenz von Fettkugeln während des Waschprozesses war abhängig von dem im Rahm enthaltenen MFKM-stabilisierenden Material. Zudem wurden die durch Koaleszenz resultierenden Verluste an MFKM-Proteinen allein auf die hohen Scherkräfte im Separator zurückgeführt.

Aufgrund der mangelnden Ausbeute an isoliertem MFKM-Material und der unzureichenden Umsetzung des Rahmwaschens im industriellen Prozess wurde alternativ die Membrantrenntechnik herangezogen. Die großtechnische MFKM-Gewinnung durch Mikrofiltration von Buttermilch wird zwar schon realisiert, erfüllt aber aufgrund der vergleichbaren Größenordnung von Caseinmizellen und MFKM-Bruchstücken nicht die Erwartungen hinsichtlich Ausbeute und Reinheit des Endmaterials. Eine vorherige Dissoziation von Caseinmizellen führte bei geeigneter Wahl der Membranporengröße zur vollständigen Abtrennung aller Caseine und Molkenproteine, gleichzeitig musste aber ein hoher Verlust an MFKM-Material (50 - 70 %) festgestellt werden.

Eine alternative Isolierungsmethode basierend auf der Kombination aus labinduzierter Gelbildung von Buttermilch und einer anschließenden Diafiltration von Buttermilch-Molke führte hingegen im Vergleich zur Methode des Rahmwaschens und der Dissoziationsmethode zu einem MFKM-Isolat mit deutlich höherem MFKM-Proteingehalt. Aufgrund von Einlagerungen der MFKM-Fragmente in den Caseinbruch bei der Gelbildung konnte aber auch hier ein Verlust an MFKM-Proteinen nicht verhindert werden, aber durch Variation der Gelbildungsparameter (pH-Wert, Temperatur, Caseinkonzentration) zumindest auf 10 - 40 %, abhängig von der Art des MFKM-Proteins, minimiert werden. Diese Ausbeute an MFKM-Material ist im Vergleich zu den bisherigen Isolaten deutlich höher zu bewerten. Zudem kann das Verfahren nicht nur im analytischen, sondern auch im großtechnischen Maßstab realisiert werden.

Eine weitere große Herausforderung des Projekts war, eine anschließende erfolgreiche Trennung der MFKM-Komponenten in hohem Maße zu erreichen. Methoden zur gezielten Fällung von Phospholipiden (PL), basierend auf der Klärung von Molke, haben gezeigt, dass ein selektives Ausfallen der PL nicht erfolgt. Aufgrund starker hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Membrankomponenten wurden hohe Verluste an

MFKM-Protein im verbleibenden Überstand detektiert. Durch den Einsatz von Urea zur Reduktion des hydrophoben Effekts konnten die starken Wechselwirkungen abgeschirmt und ein hoher Anteil an MFKM-Protein im Überstand bei gleichzeitig verstärkter PL-Fällung erreicht werden. Aufgrund negativer Beeinflussung der Nativität einzelner Fraktionen wurde diese Methode nicht für die nachfolgende Proteinfractionierung mittels MAC eingesetzt.

Um das übergreifende Ziel der Prozessentwicklung zur Fraktionierung von MFKM-Komponenten zu erreichen und um Aussagen über die Gewinnung von einzelnen MFKM-Proteinen machen zu können, wurde ein alternativer Lösungsansatz entwickelt. Durch eine Kombination aus MFKM-Desintegration (5 x 1.500 bar) und anschließender Ultrazentrifugation (100.000 x g) wurde ein PL-abgereichertes MFKM-Proteinisolat gewonnen und für die MAC-Versuche eingesetzt. Im Rahmen dieser Proteinfractionierung wurden die Art des Membranadsorbers (Kationen-/Anionenaustauscher), der Start-pH sowie das Ionenmilieu variiert und auf diese Weise versucht, die Protein-Elution gezielt zu beeinflussen. Unterschiede in der Proteinzusammensetzung und -konzentration der jeweils gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE bezüglich der MFKM-Proteine detektiert. Eine erfolgreiche Trennung und Gewinnung der einzelnen MFKM-Proteine in ausreichenden Mengen gelang bisher jedoch nicht.

Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen, dass eine wirtschaftliche MFKM-Gewinnung basierend auf bisherigen Standardmethoden nicht realisierbar war. Stattdessen konnten neue Prozesse entwickelt werden, welche für eine MFKM-Isolierung aus Buttermilch wesentlich effizienter geeignet sind. Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Isolierungsmethoden und nachfolgenden Fällungseigenschaften der MFKM-Komponenten aufgeklärt, die für weiterführende Versuche zur Fraktionierung der MFKM-Proteine und Gewinnung reiner Isolate genutzt werden können. Das Projekt bildet trotz eingeschränktem Erreichen der Ziele eine neue und im Vergleich zum Stand des Wissens fundiertere Basis zum Aufbau und zur Zusammensetzung der nativen MFKM. Dieses Wissen ist von großem praktischem Nutzen, da es der Industrie neue Einschätzungen und Möglichkeiten zum Umgang und zur Nutzung von MFKM-Bestandteilen eröffnet.

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Der milchverarbeitende Sektor in Deutschland erwirtschaftet mit knapp 37.000 Beschäftigten an etwa 200 Betriebsstätten einen jährlichen Umsatz von ca. 22 Mrd. €. Die Ergebnisse versetzen Unternehmen in die Lage, die aufgezeigten Potenziale der Buttermilch und der darin enthaltenen Milchfettkugelmembran ohne den Umweg aufwändiger Versuchsreihen gezielt zu nutzen; daneben ergeben sich auch neue Nutzungsmöglichkeiten für den Maschinen- und Anlagenbau zur Behandlung von Buttermilch.

Das Projekt liefert wirtschaftlich relevante Erkenntnisse zur Aufreinigung der mengenmäßig interessanten Proteine aus Buttermilch. Das Vorhaben leistet damit einen wichtigen Beitrag zur verfahrenstechnischen Realisierung der Isolierung von MFKM-Material aus Buttermilch. Auf Basis dieses Kenntniszugewinns können neue Anlagen- und Prozesskonzepte entwickelt werden, auf die insbesondere mittelständische Unternehmen aufgrund fehlender Infrastruktur und Detailkenntnis angewiesen sind.

Die Ergebnisse des vorliegenden Projekts sind wegweisend für die zukünftige Entwicklung und Untersuchung von funktionellen MFKM-Isolaten. Weitere Potenziale liegen in der Emulgierfähigkeit, Schaumbildung und vermuteten Biofunktionalität der Einzelkomponenten der MFKM, die auch in benachbarten Industriezweigen, z.B. der kosmetischen oder pharmazeutischen Industrie, genutzt werden können. Ferner kann durch eine verbesserte Steuerbarkeit der Zusammensetzung eine kontrollierbare Qualität derjenigen Produkte erwartet werden, die bereits MFKM-Konzentrate enthalten.

### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Altenhofer, C., Holzmüller, W., Wolfertstetter, F., Wolfschoon Ribeiro, D., Kulozik, U., Pfaffl, M. W. und Viturro, E.: Temporal variation of milk fat globule diameter, fat and cholesterol content and milk epithelial cell gene expression in dairy cows. Intern. J. Dair. Technol. 68, doi: 10.1111/ 1471-0307.12220 (2015).

3. Holzmüller, W. und Griebel, A.: Labinduzierte Gelbildung von Buttermilch als erster Schritt zur Isolierung von Milchfettkugelmembran-Material, Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-93918263-4, 103-105, (2013).
4. Holzmüller, W. und Saemann, L.: Beeinflussung grenzflächenaktiver Eigenschaften von MFKM-Material aus Buttermilch-Molke durch hitzeinduzierte Wechselwirkungen mit Molkenproteinen, Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN-Nr.978-939182 75-7, 96-99, (2014).
5. Holzmüller, W. und Müller, M.: Einfluss des Rahmwaschens auf die Milchfettkugelmembran-Proteine. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-52-8, 102-104 (2012).
6. Holzmüller, W.: Isolierung von Proteinen aus der Milchfettkugelmembran. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-43-6, 129-131 (2011).

**Weiteres Informationsmaterial:**

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
forschung, Abt. Technologie  
Weihenstephaner Berg 1, 85350 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3535  
Fax: +49 8161 71-4384  
E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 9079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.