



Mikrobiologische und chemische Prozesskontrolle zur Herstellung von Kolostrumfraktionen mit Hilfe der Membrantechnologie

Masterarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades Diplomingenieur
an der Universität für Bodenkultur, Wien

eingereicht von
HU Chenghui, Bakk.techn

betreut von:
Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.rer.nat.techn. Kneifel Wolfgang
DI Dr.rer.nat.techn. Silvia Apprich

Wien, im Mai 2012

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
DANKSAGUNG	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kolostrum	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Historische Anwendung	3
1.1.3 Inhaltsstoffe des Kolostrums	3
1.2 Das Proteinsystem des Kolostrums	6
1.2.1 Zusammensetzung	6
1.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes	7
1.2.2.1 Kjeldahl-Verfahren	7
1.2.2.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	9
1.2.2.3 Bestimmung des Kaseingehaltes	9
1.3 Lactoferrin (LF)	10
1.3.1 Vorkommen	10
1.3.2 Struktur	11
1.3.3 Wirkungen	12
1.3.3.1 Antibakterielle Eigenschaften	12
1.3.3.2 Antivirale Eigenschaften	13
1.3.3.3 Antikanzerogene Wirkung	15
1.3.4 Gewinnung & Einsatz	16
1.3.5 Nachweismethode	16
1.3.5.1 Immunpräzipitation	16
1.3.5.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	17
1.3.5.3 Immun-Affinitätschromatographie (IAC)	18
1.3.5.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	19
1.4 Immunglobulin G (IgG)	20
1.4.1 Vorkommen	20
1.4.2 Struktur	21
1.4.3 Wirkungen	21
1.4.3.1 Passive Immunisierung des Kalbes	22
1.4.3.2 Neutralisation	23
1.4.3.3 Komplementaktivierung	23
1.4.3.4 Opsonisierung	23
1.4.4 Gewinnung	24
1.4.5 Nachweismethode	25

1.4.5.1 Radialer-Immundiffusions-Test.....	25
1.4.5.2 Radioimmunassay (RIA).....	25
1.4.5.3 Immunologischen Trübungstest	25
1.4.5.4 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	26
1.4.5.5 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	26
1.5 Membranfiltration.....	26
1.5.1 Allgemeines	26
1.5.2 Mikrofiltration und Ultrafiltration	28
1.5.3 Nanofiltration	29
1.5.4 Proteinfractionierung mittels Membranfiltration	30
1.6 Mikrobielle Kontamination in Milchprodukten und mikrobiologische Parameter ..	31
1.6.1 Gesamtkeimzahl	32
1.6.2 Verfahren zur Keimzahlbestimmung.....	33
1.6.2.1 Keimzahlbestimmung auf PCA (Plate Count Agar) nach KOCH.....	34
1.6.2.2 Keimzahlbestimmung mit Membranfiltration	34
1.6.2.3 Keimzahlbestimmung durch das MPN-Verfahren	34
1.6.2.4 Automatisiertes Verfahren zur Keimzahlbestimmung	35
1.6.3 Enterobacteriaceae.....	35
Methode zum Nachweis - Bestimmung der Enterobacteriaceae auf VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar nach MOSSEL.....	36
1.6.4 Lactobacillen	36
Methode zum Nachweis - Bestimmung der Gesamt-Lactobacillen auf MRS (de Man, Rogosa und Sharpe) Agar	36
1.6.5 Sporenbildner (Bacillus).....	37
Methode zum Nachweis – Bestimmung von Bacillen (Endosporen) auf CASO Agar	38
2 PROBLEMSTELLUNG.....	39
3 MATERIAL UND METHODEN	41
3.1 Proben.....	41
3.2 Das zwei Schritt Membran-Filtrationssystem	41
3.3 Immunologische Untersuchungen von Kolostrumprodukten mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	42
3.3.1 Bestimmung der Lactoferrin-Konzentration in Kolostrum und Kolostrumprodukten mittels ELISA.....	42
3.3.1.1 Geräte und Material.....	43
3.3.1.2 Durchführung	44
3.3.1.3 Auswertung.....	46
3.3.2 Bestimmung der IgG- Konzentrationen in Kolostrum und Kolostrumprodukten mittels ELISA.....	46
3.3.2.1 Geräte und Material.....	46
3.3.2.2 Durchführung	47

3.3.2.3 Auswertung.....	47
3.4 Chemische Untersuchungen von Kolostrum und Kolostrumprodukten.....	48
3.4.1 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	48
3.4.1.1 Geräte und Reagenzien.....	48
3.4.1.2 Durchführung.....	48
3.4.1.3 Berechnung.....	51
3.4.2 Bestimmung des Kaseingehaltes.....	52
3.4.2.1 Geräte und Reagenzien (zusätzlich zur GN-Bestimmung).....	52
3.4.2.2 Durchführung.....	52
3.4.2.3 Berechnung.....	53
3.4.3 Bestimmung der Trockensubstanz.....	54
3.4.3.1 Prinzip.....	54
3.4.3.2 Geräte und Hilfsmittel.....	54
3.4.3.3 Durchführung.....	54
3.4.3.4 Berechnung.....	55
3.4.4 Aschebestimmung.....	55
3.4.4.1 Prinzip.....	55
3.4.4.2 Geräte und Reagenzien.....	55
3.4.4.3 Durchführung.....	56
3.4.4.4 Berechnung.....	56
3.5 Mikrobielle Untersuchungen in Kolostrum und Kolostrumprodukten.....	56
3.5.1 Gesamtkeimzahlbestimmung auf PCA (Plate Count Agar) nach KOCH.....	56
3.5.1.1 Geräte und Hilfsmittel.....	56
3.5.1.2 Nährboden.....	57
3.5.1.3 Verdünnungslösung.....	58
3.5.1.4 Probenvorbereitung.....	58
3.5.1.5 Beimpfung.....	59
3.5.1.6 Bebrütung.....	59
3.5.1.7 Auswertung.....	59
3.5.2 Bestimmung der Enterobacteriaceae auf VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar nach MOSSEL.....	60
3.5.2.1 Geräte und Hilfsmittel.....	60
3.5.2.2 Nährboden.....	60
3.5.2.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung.....	61
3.5.2.4 Bebrütung.....	61
3.5.2.5 Auswertung.....	61
3.5.3 Bestimmung der Gesamt-Lactobacillen auf MRS (de Man, Rogosa und Sharpe) Agar.....	62
3.5.3.1 Geräte und Hilfsmittel.....	62
3.5.3.2 Nährboden.....	62
3.5.3.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung.....	63
3.5.3.4 Bebrütung.....	63
3.5.3.5 Auswertung.....	63

3.5.4 Bestimmung von Bacillen (Endosporen) auf CASO Agar	63
3.5.4.1 Geräte und Hilfsmittel	63
3.5.4.2 Nährboden	63
3.5.4.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung.....	64
3.5.4.4 Bebrütung	64
3.5.4.5 Auswertung.....	64
4 ERGEBNISSE.....	65
4.1 Charakterisierung von Rohkolostrum und Vergleich mit Rohmilch.....	65
4.1.1 Zusammensetzung der untersuchten Rohkolostrumproben.....	65
4.1.2 Charakterisierung von Rohkolostrum und Rohmilch.....	66
4.1.3 Vergleich zwischen Rohkolostrum und Rohmilch.....	68
4.2 Wahl der geeigneten Membran hinsichtlich der Entkeimungsfähigkeit	70
4.3 Wahl der geeigneten Membran hinsichtlich der Entkaseinierungsfähigkeit.....	71
4.4 Vergleich der Ausbeute an TS, Ges.Protein, IgG und LF durch Mikrofiltration mit verschiedenen Membranen	72
4.5 Einfluss der Verdünnung der Magerkolostrumproben vor Mikrofiltration.....	74
4.6 Operationstemperatur bei Mikrofiltration	76
4.7 Nanofiltration zur Aufreinigung der biologisch aktiven Fraktionen	77
5 DISKUSSION	79
6 ZUSAMMENFASSUNG	84
7 ABSTRACT	86
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	88
9 ANHANG.....	97

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Wolfgang Kneifel (Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie) für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Dr. Silvia Apprich für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Masterarbeit. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und die Engelsgeduld.

Vielen Dank auch an Herrn Alexander Bogdan, der mir aufgrund seiner Erfahrungen eine große Hilfe war.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Konzentrationsänderungen von Molkenprotein während den ersten 16 Gemelke nach der Geburt in der Milch von 60 Holstein-Friesian Kühen (Levieux et al., 1999).....	2
Abbildung 2 Visualisierung von Lactoferrin-Strukturen mittels SWISS-PDB-Viewer.11	
Abbildung 3 Schematische Darstellung der antiviralen Mechanismen von Lactoferrin (van der Strate et al., 2001).....	14
Abbildung 4 Sandwich-ELISA Aufbauschema (Ulrich Busch,2010).....	17
Abbildung 5 Struktur von Immunglobulin G (Lang & Lang, 2007).....	22
Abbildung 6 Schematische Darstellung des Trennverhaltens von Membranverfahren (Melin & Rautenbach, 2007).....	27
Abbildung 7 Zuordnung der druckgetriebenen Membranverfahren (Melin & Rautenbach, 2007).....	28
Abbildung 8 Proteinfractionierung mittels Membranfiltration: Das „zweistufige Membran System“ zur Verarbeitung von bovinem Kolostrum.....	42
Abbildung 9 Mittlere Zusammensetzung von Kuhkolostrum (w/w %) und Schwankungsbereichen	65
Abbildung 10 Histogramm mit Normalverteilungskurve: Die Variabilität des Gehalts an	67
Abbildung 11 Vergleich der relevanten Eigenschaften von Rohkolostrum und Rohmilch	69
Abbildung 12 Graphische Darstellung der Entkeimungswirkung von verschiedenen Mikro-Membranen	71
Abbildung 13 Entkaseinierungsfähigkeit von verschiedenen Mikro-Membranen.....	72
Abbildung 14 Einfluss von unterschiedlichen Porengrößen auf die Ausbeute an TS, Ges.Protein, IgG und LF im Kuhkolostrum und Kuhmilch bei Mikrofiltration (30°C, 0,7 bar).....	73
Abbildung 15 Einfluss der Verdünnung von Magerkolostrum auf die Ausbeute an IgG und LF im Kuh-Kolostrum bei Mikrofiltration	76
Abbildung 16 Einfluss der Operationstemperatur auf die Ausbeute an IgG und LF bei Mikrofiltration.	77
Abbildung 17 Rückhaltung von IgG und LF unter verschiedenen Nanofiltrationsbedingungen.	78

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Inhaltsstoffe von Kolostrum und Milch (Foley & Otterby, 1978).....	5
Tabelle 2 bioaktive Proteine von bovinem Kolostrum und Milch: Konzentration und Molekulargewicht.....	6
Tabelle 3 Kriterien für Rohmilch nach Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte.....	33
Tabelle 4 Methoden zur Keimzahlbestimmung (Quelle: Czichos, 2009)	33
Tabelle 5 Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set, Cat. NO. E10-126, Bethyl, USA	43
Tabelle 6 Probenauftragschema.....	45
Tabelle 7 Bovine IgG ELISA Quantitation Set, Cat. NO. E10-118, Bethyl, USA	47
Tabelle 8 Charakteristik von Kuh-Kolostrum (roh) und Kuhmilch (roh).....	66
Tabelle 9 Entkeimung durch verschiedene Mikro-Membrane	70
Tabelle 10 Überblick über den Einfluss der Membran-Porengröße auf die Rückhaltung von Mikroorganismen und Kasein, die Permeabilität von IgG, LF und Ges. Molkenprotein bei Mikrofiltration der unverdünnten Magerkolostrumproben.....	74
Tabelle 11 Ausbeute an IgG und LF im Kuh-Kolostrum nach Mikrofiltration bei unterschiedlichen Verdünnung der Magerkolostrumproben	75
Tabelle 12 IgG- bzw. LF-Permeabilität bei Mikrofiltration bei unterschiedlicher Temperatur.....	76
Tabelle 13 Charakterisierung von Kolostrum: Vergleich eigener Messwerte mit Literaturwerten	79

1 EINLEITUNG

1.1 Kolostrum

1.1.1 Definition

Kolostrum ist die wissenschaftliche Bezeichnung für die „Erstmilch“ von Säugetieren. Es gibt keine präzise, allseits akzeptierte Definition für den Begriff „Erstmilch“, und keine klare Abgrenzung zwischen Kolostrum und Milch. Hier werden einige Beispiele angeführt:

Kolostrum ist die erste Milch, die von einem Säugetier in den ersten 24 – 96 Stunden – abhängig von der Tierart- in der post-partalen Phase produziert wird. Das Kuh-Kolostrum wird bis zum sechsten Gemelk nach der Geburt sezerniert (Solomons, 2002).

Kolostrum, auch Kolostralmilch genannt, ist die schon während der Schwangerschaft gebildete Milch, die 4-5 Tage nach der Geburt durch reife Muttermilch ersetzt wird (Reuter, 2004).

Bovines Kolostrum bietet passive Immunität für neugeborene Kälber in den ersten 24 Stunden ihres Lebens und wird in der Regel in den ersten 3 Tagen nach der Geburt produziert (Foley & Otterby, 1978).

Levieux et al. (1999) untersuchten die Veränderung der Konzentrationen von Immunglobulin G (IgG), beta-Lactoglobulin (β -Lg), alpha-Lactalbumin (α -La) und Serum-Albumin (BSA) in Kolostrum bzw. Milch von 60 Holstein-Friesian Kühe während den ersten 16 Gemelken nach der Geburt. Es wurde eine große Variation in den Konzentrationen beobachtet: die Konzentrationen von IgG, β -Lg und BSA beim ersten Gemelk betragen $59,8 \pm 28,5$ mg/mL, $14,3 \pm 4,6$ mg/mL und $1,21 \pm 0,44$ mg/mL, sinken aber sehr kräftig in den folgenden Melkzeiten. Die Konzentration von α -La beträgt $2,04 \pm 0,6$ mg/mL beim ersten Gemelk, nimmt in den folgenden Melkzeiten langsam und graduell ab. Die graphische Darstellung der Konzentrationsänderung ist in Abbildung 1 ersichtlich (Levieux et al., 1999).

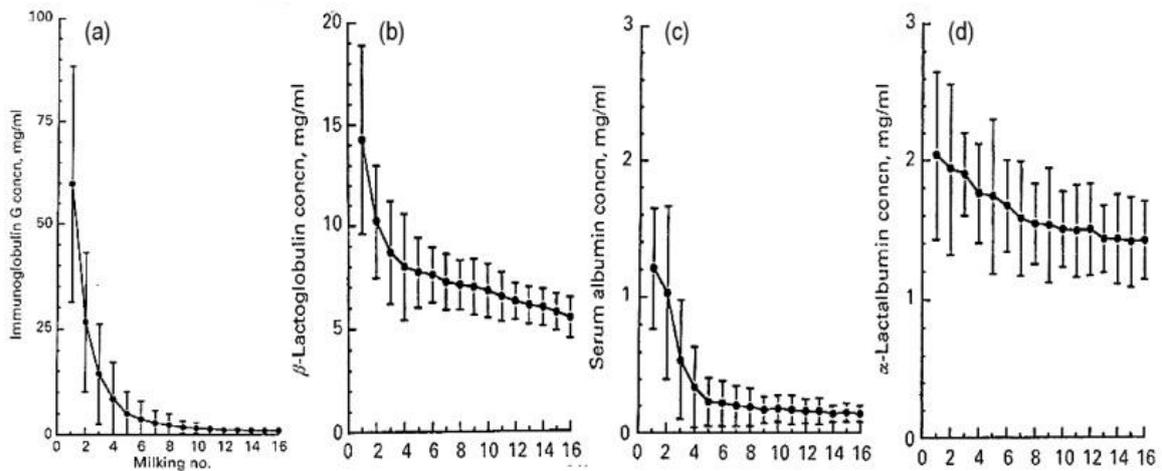


Abbildung 1 Konzentrationsänderungen von Molkenprotein während den ersten 16 Gemelke nach der Geburt in der Milch von 60 Holstein-Friesian Kühen (Levieux et al., 1999).

(a) Die IgG-Konzentration bei den ersten Gemelken beträgt durchschnittlich 59,8 mg/mL, nimmt danach stark ab und beträgt ab der 12. Melkung ca. 1 mg/mL. Die Konzentrationen vom 1. bis 15. Gemelk unterscheiden sich signifikant von der Konzentration des 16. Gemelks ($p < 0,01$). (b) Die Konzentration von beta-Lactoglobulin im Kolostrum reicht zuerst von 7,9 bis 30 mg/mL, verringert sich schnell beim 1. bis 6. Gemelk, und nimmt danach nur langsam ab. (c) Die Konzentration von beta-Lactoglobulin beim 1. bis 15. Gemelk liegt signifikant höher als die beim 16. Gemelk ($p < 0,01$). Die Konzentration von BSA nimmt zwischen 1. und 5. Gemelk stark ab und ändert sich dann nur mehr langsam. Die Konzentration des 1. bis 6. Gemelks unterscheidet sich signifikant von der Konzentration des 16. Gemelks ($p < 0,01$). (d) Die Konzentration von alpha-Lactalbumin nimmt langsam und regulär ab. Die Konzentration beim 1. bis 6. Gemelk liegt signifikant höher als die beim 16. Gemelk ($p < 0,01$).

Im Allgemeinen versteht man unter Kolostrum, die Milchsekretion direkt nach der Geburt im Laufe der ersten wenigen Tage. Es gibt eine graduelle Veränderung in der Proteinzusammensetzung zwischen Kolostrum und Milch während der ersten Woche nach der Geburt (Levieux et al., 1999). Durch die spezielle Zusammensetzung von

Kolostrum wird das Neugeborene in den ersten Tagen vor den Keimen der Umwelt geschützt und das Immunsystem angeregt (Scammell A., 2001).

Aufgrund seines hohen Proteingehaltes ist Kolostrum etwas dickflüssig und von gelblicher Farbe. Die aktiven Komponenten des Kolostrum sind hitzesensitiv, daher muss Kolostrum ohne Erhitzen oder Kochen, und nicht in Kombination mit warmen Speisen konsumiert werden (Solomons, 2002).

1.1.2 Historische Anwendung

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts beschrieb der Arzt Christoph W. Hufeland die einmalige Funktion des Kolostrums im Unterschied zu „normaler“ Milch, denn er erkannte dessen positiven Einfluss auf den allgemein hohen Gesundheitsstandard und das schnelle Wachstum neugeborener Rinder. Im Jahre 1955 wurde eine Publikation über „Immunmilch“ als Nahrungsergänzung für Menschen mit rheumatischer Arthritis veröffentlicht, wodurch die Vormilch wieder mehr ins Blickfeld geriet (Struss, 1964). In den folgenden Jahren wurden Kolostrum und seine Bestandteile vermehrt untersucht. In den späten 1980er bis Mitte der 1990er Jahre wurde veterinär-medizinisch begonnen, herkömmliches, aber auch „Hyper-immunisiertes“ Kolostrum zur Übertragung der passiven Immunität zu verwenden. Zu dieser Zeit wurde auch mit der kommerziellen Produktion begonnen, wobei jedoch nur sehr geringe Mengen von wenigen Unternehmen in Europa, USA und Australien produziert wurde. 1994 wurde GASTROGARD-RTM (ein hyperimmunisiertes Kolostrum-Protein-Konzentrat mit Anti-Rotavirus Wirkung) in Australien als Arzneimittel als Schutz gegen die Rotavirus-Diarrhöe in Säuglings- und Kleinkindern verkauft (Scammell, 2001).

1.1.3 Inhaltsstoffe des Kolostrums

Bovines Kolostrum dient vor allem als Energie- und Nahrungsquelle für das Neugeborene und enthält verschiedene Substanzen wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate,

Fett, Mineralien und Spurenelemente, die für die normale Stoffwechselfunktionen und das Wachstum notwendig sind (Blum & Hammon, 2000). Proteine aus Kolostrum können im Verdauungstrakt leicht in einzelne Aminosäuren aufgespalten und vom Kalb für die Proteinsynthese und Glukoneogenese verwendet werden (Yvon et al., 1993). Fett und Lactose im Kolostrum liefern dem Kalb Energie, die es unter anderem zur Aufrechterhaltung der normalen Körpertemperatur benötigt. Vitamine, Mineral- und Spurenelemente sind im Kolostrum viel höher konzentriert als in der Milch. Es wird angenommen, dass sie der Initiierung des Stoffwechsels dienen und an der Entwicklung des Verdauungssystems beteiligt sind (Davis et al., 1998).

Außerdem ist Kolostrum reich an Vitaminen (A, E, C, D3, B1, B6, B2, B12, Q10 und Folsäure), essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren, Wachstumsfaktoren und Hormonen. Hormone, z.B. Somatotropin, Insulin, Cortisol und Thyroxin, sowie die Wachstumsfaktoren IGF-1 (Insulin-like Growth Factor I), IGF-2 (Insulin-like Growth Factor II), EGF (Epidermal Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor) und NGF (Nerve Growth Factor) sind im Kolostrum in höheren Konzentrationen als im Blut vorhanden (Davis et al., 1998). Experimente haben ergeben, dass bovines Kolostrum viel mehr bioaktive und wachstumsfördernde Substanzen (z.B. IGF-1) enthält als bovine Milch. Dies spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Gesundheit des Neugeborenen (Kühne et al., 2000). Es gibt auch Hinweise darauf, dass EGF und IGF-1 im Kolostrum die Entwicklung des Verdauungstrakts des Neugeborenen regulieren und beeinflussen (Xu, 1996).

Kolostrum hat einen hohen Gehalt an Immunglobulinen, weil ein Kalb aufgrund der Plazentasituation nicht schon im Mutterleib einen entsprechenden Immunschutz erhält. Es ist seit langem bekannt, dass Kolostrum passiven Schutz an ein Neugeborenes gegen Darmpathogene bietet, vor allem über den Transfer von Immunglobulinen (Korhonen et al., 2000) und die relevanten Hilfsfaktoren wie z.B. Trypsininhibitoren, die die Immunglobuline vor einem proteolytischen Abbau im Darm schützen (Balfour & Comline, 1962). Viele Studien haben ergeben, dass die Immunglobuline des bovines

Kolostrums von nicht-immunisierten Kühen Schutz- und therapeutische Wirkungen gegen unspezifische Darmerkrankungen neugeborener Tiere und Menschen haben. Diese Wirkung beruht vor allem auf der antimikrobiellen Aktivität der Antikörper und des Komplementsystems (Korhonen et al., 2000; Nousiainen et al., 1994). Die Zusammensetzung von Kolostrum im 1. bis 3. Gemelk nach der Geburt im Vergleich zur Milch ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe von Kolostrum und Milch (Foley & Otterby, 1978)

Inhaltsstoffe	1.Gemelk	2.Gemelk	3.Gemelk	Milch
Dichte	1,056	1,040	1,035	1,032
pH	6,32	6,32	6,33	6,50
Ges. Trockenmasse(%)	23,9	17,9	14,1	13,9
Fett (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
Ges. Protein (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Kasein (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
IgG (mg/mL)	48,0	25,0	15,0	0,6
Lactose (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
Asche (%)	1,11	0,95	0,87	0,74
Vitamin A (µg/100 mL)	295	190	113	34
Vitamin E (µg/g Fett)	84	76	56	15
Riboflavin (µg/mL)	4,83	2,71	1,85	1,47
Choline (mg/mL)	0,70	0,34	0,23	0,13

Die Zusammensetzung und physischen Eigenschaften von frischem Kolostrum variiert erheblich in Abhängigkeit von Faktoren der Umwelt und des Managements, die genauen Faktoren wurden von Reinicke (2006) in einer Dissertation genau beschrieben: Genetische Faktoren, Alter, Laktationsnummer, Vakzination des Muttertieres, Jahreszeit bzw. die Umgebungstemperatur, Gesundheitszustand des Euters und der Kuh, Dauer der

Trockenstehzeit und Ernährung in der Trockenstehzeit, Stress, usw.. Die Qualität wird also von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst (Reinicke, 2006).

1.2 Das Proteinsystem des Kolostrums

1.2.1 Zusammensetzung

Die Proteine im Kolostrum lassen sich grob in Kaseine und Molkenproteine unterteilen. Kasein besteht aus einer Mischung mehrerer Proteine (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) und bildet im Kolostrum zusammen mit Calciumphosphat und anderen Bestandteilen sogenannte Micellen, die das Calciumphosphat gelöst halten und die Milch im Magen zu einem Klumpen aggregieren (Kunz et al., 1990). Die Hauptmolkenproteine sind zwei kleine globuläre Proteine, beta-Lactoglobulin (β -Lg) und alpha-Lactalbumin (α -La), die restlichen Molkenproteine bestehen aus Immunglobulinen (Ig), Glycomakropeptiden, bovines Serum Albumin (BSA), Lactoferrin, Proteosepepton und vielen Enzymen (Korhonen et al., 1998). Die unterschiedliche Zusammensetzung der bioaktiven Proteine in bovinem Kolostrum und Milch ist in Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2 bioaktive Proteine von bovinem Kolostrum und Milch: Konzentration und Molekulargewicht

Molkenproteine	Konzentration [mg/mL]		Molekular Gewicht [Dalton]
	Kolostrum	Milch	
Kasein (α_{s1} , α_{s2} , β , und κ)	26	28	14.000-22.000
β -Lactoglobulin	8,0	3,3	18.400
α -Lactalbumin	3,0	1,2	14.200
Immunglobuline	20-150	0,5-1,0	150.000-1000.000
Glycomakro-Peptide	2,5	1,2	8.000
Lactoferrin	1,5	0,1	80.000
Lactoperoxidase	0,02	0,03	78.000
Lysozyme	0,0004	0,0004	14.000

Serum albumin	1,3	0,3	66.300
Wachstumsfaktoren	50µg-40mg/L	<1µg-2mg/L	6.400-30.000

Quelle: Young W. Park, 2009: Bioactive components in milk and dairy products(Pihlanto & Korhonen, 2003); (Korhonen & Pihlanto, 2007)

1.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Methoden zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes basieren auf verschiedenen Prinzipien:

- Erfassung des Stickstoffgehaltes (Kjeldahl-Methode)
- Chemische Reaktion der Peptidbindung und anschließende photometrische Messung (z.B. Biuret-Methode)
- Chemische Reaktionen bestimmter Aminosäuren der Proteine und anschließende photometrische Messung (z.B. Bestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz; in erster Linie reagiert Tyrosin)
- Messung der UV-Absorption (Erfassung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin; die Absorptionsmaxima liegen bei etwa 280 nm)
- Trübungsmessung durch Ausflockung gelösten Eiweißes durch Proteinfällungsmittel

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln hat die Kjeldahl-Methode die größte Bedeutung erlangt (Matissek & Steiner, 2005)

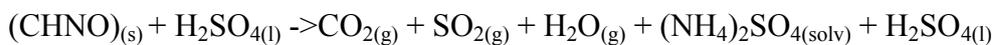
1.2.2.1 Kjeldahl-Verfahren

Das Kjeldahlverfahren ist eine 1883 entwickelte, quantitative und häufig verwendete Bestimmungsmethode des Stickstoffgehaltes. Durch den Aufschluss der organischen Substanzen mit siedender Schwefelsäure werden alle N-Verbindungen mit der Oxidationszahl -3 (Amine, Aminosäuren, Imine, Ammoniumverbindungen usw.) in

Ammoniumsulfat überführt. Nicht bzw. nicht vollständig erfasst werden Stickstoff-Sauerstoffverbindungen (z.B. Nitrate, organische Nitroverbindungen). Solche Verbindungen kommen in Milch und Milchprodukten jedoch praktisch nicht oder nur in vernachlässigbaren Mengen im Verhältnis zum Gesamt-N-Gehalt vor, sodass die Kjeldahl-Methode den Gesamtstickstoffgehalt erfasst. Um den Kjeldahl-Aufschluss zu beschleunigen, müssen Oxidationskatalysatoren (bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten wird Kupfersulfat als Katalysator verwendet) zugesetzt werden. Ferner wird Kaliumsulfat zur Erhöhung der Siedetemperatur der Schwefelsäure zugegeben, um dadurch den Aufschluss zu beschleunigen.

Durch Kochen mit Natronlauge wird das Ammoniak aus dem Ammoniumsulfat verdrängt, überdestilliert und in eine Säure-Vorlage (Borsäurelösung) eingeleitet. Anschließend wird das Ammoniak mit einer Salzsäure-Maßlösung titriert.

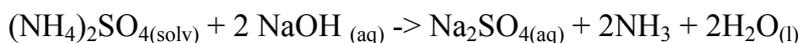
Aufschluss:



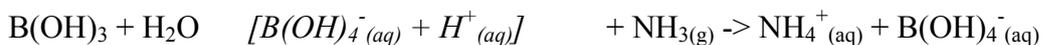
CuSO₄, TiO₂ fungiert als Katalysator und reduziert die Aktivierungsenergie

Na₂SO₄ und K₂SO₄ erhöht den Siedepunkt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit

Destillation:



Auffangen:

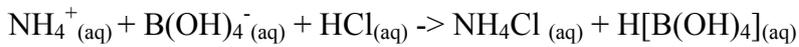


Wird eine starke Säure verwendet, so muss diese genau abgemessen werden, da die nach dem Einleiten von Ammoniak verbleibende Säure mit einer Base fertig titriert wird.

Wird hingegen eine schwache Säure verwendet (beispielsweise Borsäure), so kann die beim Auffangen entstandene starke Base mit einer Säure titriert werden, ohne dass

überschüssige Auffangssäure mit erfasst wird. Dies bringt den Vorteil, dass die schwache Säure nicht genau abgemessen werden muss

Titration



1.2.2.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Unter Gesamtprotein versteht man den Gehalt an Protein und weiterer Stickstoffverbindungen, der sich aus dem Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl durch Multiplikation mit einem produktspezifischen Faktor ergibt. Beim Gesamtprotein werden die NPN-Verbindungen als Protein mit berechnet.

Produktspezifische Faktoren

Milch, Milcherzeugnisse, Käse, Molke	6,38
Futtermittel	6,25
Gelatine	5,55

1.2.2.3 Bestimmung des Kaseingehaltes

Soll der Gehalt bestimmter Proteinfractionen ermittelt werden, so müssen diese von den anderen Bestandteilen zuerst abgetrennt werden.

Zuerst wird der Gesamt-Stickstoffgehalt bestimmt. Zusätzlich wird in einer Probe das Kasein mit Essigsäure-Acetat-Puffer durch pH-Erniedrigung bis zum isoelektrischen Punkt ausgefällt, abfiltriert und im Filtrat ebenfalls der Stickstoffgehalt (Nicht-Kasein-Stickstoff, NCN) ermittelt. Aus der Differenz der beiden Stickstoffwerte wird der Kaseingehalt der Probe berechnet.

1.3 Lactoferrin (LF)

1.3.1 Vorkommen

Lactoferrin (LF) ist ein etwa 80 kDa großes, eisenbindendes Glykoprotein, das der Transferrin-Familie zugeordnet wird (Sorrentino et al., 1999). 1939 wurde Lactoferrin in Kuhmilch entdeckt und als „rotes Protein“ identifiziert, konnte jedoch nicht weiter isoliert werden (Soerensen & Soerensen, 1939). 1960 wurde Lactoferrin von Groves und Johansson aus humaner Milch isoliert und als „transferrin-ähnliches Glykoprotein“ definiert. In der Zwischenzeit wurde es in verschiedenen anderen Säugetierspezies (Rind, Pferd, Büffel, Schwein, Maus, Ziege) nachgewiesen (Groves, 1965; Johansson, 1960).

Lactoferrin ist ein Bestandteil des natürlichen Schutzsystems für Tier und Mensch und befindet sich in unterschiedlichen Konzentrationen in fast allen Körpersekreten und Schleimhäuten. Im menschlichen Körper liegt Lactoferrin hauptsächlich in zwei Reservoiren vor: einem „stationären Pool“ auf den Schleimhautoberflächen und einem „zirkulatorischen Pool“ in den neutrophilen Granulozyten (Neutrophile, die häufigsten weißen Blutkörperchen) (Baggiolini et al., 1970). Das Lactoferrin des stationären Pools entsteht in den exokrinen Drüsen des Respirations-, Digestions- und Reproduktionstraktes, z.B. Bronchialschleim, Speichel und Vaginalsekrete (Naidu, 2000). Das in den Granula der neutrophilen Granulozyten gespeicherte Lactoferrin wird vor allem bei bakteriellen Infektionen am Ort der Entzündung freigesetzt. Die normalerweise relativ geringe Konzentration des Lactoferrins steigt also nicht durch Stimulation der Biosynthese von neuem Lactoferrin, sondern durch die vermehrte Degranulation der Leukozyten (Brock, 2002). Lactoferrin wird besonders in den Milchdrüsen von Säugetieren exprimiert. In der Milch, insbesondere im Kolostrum, kommt Lactoferrin in großen Konzentrationen vor. Die Konzentration von Lactoferrin in Kuhmilch beträgt zwischen 0,02 bis 0,2 mg/mL (Steijns & van Hooijdonk, 2000), in Kuhkolostrum beträgt die Konzentration ca. 1,5 mg/mL (Young, 2009).

Der Lactoferrin- Gehalt ist jedoch von der Tierart und Laktationsphase abhängig (Masson & Heremans, 1971). Desweiteren ist die Regulation der Lactoferrin-Synthese gewebspezifisch (Levay & Viljoen, 1995).

1.3.2 Struktur

Lactoferrin besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 692 Aminosäuren und zwei N- glycosidisch gebundenen Glykanen, mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa (Sorrentino et al., 1999). Zur Darstellung der Lactoferrin-Struktur dient das Programm „SWISS-PDB-Viewer“ (siehe Abbildung 2).

Die Aminosäurekette ist in zwei symmetrische globuläre Bereiche gefaltet, den sogenannten N- terminalen und den C- terminalen Lappen. Die zwei homologen Lappen sind durch eine kurze α - Helix Struktur verbunden. Jeder Lappen enthält wiederum zwei Domänen, die zwischen sich eine Spalte – die Bindungsstelle für dreiwertiges Eisen-Ion (Fe^{3+}), formen. In Koordination mit einem Bicarbonat-Ion oder einem Carbonat-Ion kann jeder Lappen ein Fe^{3+} -Ion reversibel binden, sodass pro Lactoferrin Molekül zwei eisenbindende Stelle existieren (Brock, 2000 ; Naidu, 2000; Steijns & van Hooijdonk, 2000).

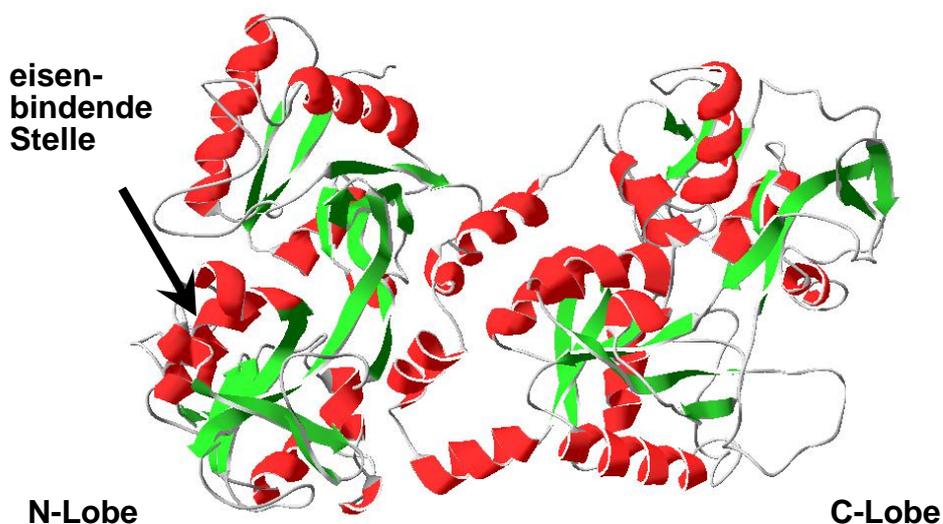


Abbildung 2 Visualisierung von Lactoferrin-Strukturen mittels SWISS-PDB-Viewer.

Protein: rekombiniertes Human Lactoferrin exprimiert in *Aspergillus awamori*. PDB ID: 1B0L, Quelle: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Sun et al., 1999). Die einsträngige Aminosäurekette ist zweilappig. Die α - Helix und β - Faltblatt Strukturen sind jeweils rot und grün dargestellt. Die eisenbindende Stelle (Spalte zwischen zwei Domänen eines Lappens) ist mit einem Pfeil markiert.

Wenn Lactoferrin zu 15% - 20% mit Eisen gesättigt ist, wird es als holo- Lactoferrin bezeichnet. Es kann auch in eisenungesättigter Form existieren, und als apo- Lactoferrin bezeichnet werden. In der apo- Form wird es meistens in die Milch sekretiert (Brisson et al., 2007). Lactoferrin besitzt eine höhere Eisenaffinität, die Eisenbindung ist auch bei niedrigem pH-Wert möglich. Erst ab pH unter 4 erfolgt die Freisetzung des Eisens (Peterson et al., 2000). Aus diesem Grund spielt Lactoferrin bei vielen septischen Vorgängen eine wichtige Rolle, da in diesem Fall niedrige pH- Werte vorliegen.

1.3.3 Wirkungen

Neben der Eisenbindungsfähigkeit spielt Lactoferrin noch bei vielen physiologischen Vorgängen eine regulatorische Rolle und kann daher als multifunktional bezeichnet werden.

1.3.3.1 Antibakterielle Eigenschaften

Lactoferrin besitzt die Fähigkeit, freies Eisen, das Bakterien für ihr Wachstum benötigen, zu binden, und somit das Wachstum vieler Bakterienarten zu inhibieren (Brock, 2002). Durch Zugabe von ausreichend Eisen führt es zur Sättigung der Eisenbindungskapazität von LF, und der bakteriostatische Effekt kann aufgehoben werden (Griffiths & Humphreys, 1977). Manche Bakterienspezies können das gebundene Eisen mit Hilfe von Lactoferrinrezeptoren wieder herauslösen und es auf diese Art selbst wieder verstoffwechseln (Yu & Schryves, 2002).

In der Literatur wird noch ein weiterer antibakterieller Mechanismus beschrieben. Nahe dem N- Terminus besitzt Lactoferrin eine antimikrobielle Sequenz. Dieses Peptid

entsteht durch die Spaltung von Lactoferrin durch Pepsin (Tomita M. et al., 1991; Tomita M. et al., 1994). Die Sequenz besteht aus 18 Aminosäureresten, die durch eine Disulfidbrücken-Bindung zwischen zwei Cysteinresten zu einer Schleife geformt werden. Diese Form wird Lactoferricin genannt. Lactoferricin kann insbesondere die gram-negative bakterielle Zellmembran angreifen und penetrieren, da sie viele basische Reste enthält. Als kationisches Peptid besitzt Lactoferricin eine hohe Affinität zu negativ geladenen Elementen in der Zellwand der Bakterien. Bei den gram-negativen Keimen sind diese Elemente die Lipopolysaccharide (LPS). Sie besitzen häufig die Fähigkeit, LPS aus der Zellmembran freizusetzen und sie anschließend zu binden. Dadurch wird die Membran beschädigt, und die Membranpermeabilität verändert sich (Arnold et al., 1977; Yamauchi et al., 1993).

1.3.3.2 Antivirale Eigenschaften

Lactoferrin zeigt antivirale Aktivität sowohl gegen DNA- und RNA-Viren, unter anderem Rotavirus, Respiratorisches Synzytial-Virus, Herpes-Viren und HIV. Die antivirale Wirkung von Lactoferrin steigt vor allem in den frühen Phase der Infektion. Lactoferrin verhindert das Eindringen des Virus in die Wirtszelle, entweder durch Blockieren zellulärer Rezeptoren oder durch direkte Bindung an die Viruspartikel (van der Strate et al., 2001).

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein umhülltes Virus und enthält ein positives, einzelstrangiges RNA Genom. Eine antivirale Wirkung von Lactoferrin auf HCV-Replikation wurde beobachtet, allerdings ging diese antivirale Wirkung nach der Wärmebehandlung verloren; weiters erwies sich Lactoferricin - das typische Verdauprodukt von Lactoferrin, das stark bakterizid und fungizid ist – unwirksam gegen HCV, was darauf hinweist, dass die natürliche Konformation von Lactoferrin benötigt wird, um seine antiviralen Effekt auszuüben (Ikeda M. et al., 2000). Lactoferrin stört wahrscheinlich die virale Adhäsion, Adsorption und Penetration des Virus in die Zelle. Es kommt beispielsweise zu einer direkten Bindung des Lactoferrins an das

HCV-Hüllen-Protein, E1 und E2, wodurch Lactoferrin die Infektion in der frühen Phase verhindert (Yi et al., 1997).

Lactoferrin ist auch ein potenter Hemmer verschiedener Virusarten, des Cytomegalavirus (CMV) (Hasegawa et al., 1994), HI-Virus (Harmsen et al., 1995), Rotavirus (Superti et al., 1997), Poliovirus (Marchetti et al., 1999), und Herpesviridae (HSV) (Hasegawa et al., 1994). Fast alle Studien zeigen, dass Lactoferrin die Infektion der Wirtszelle verhindert, nicht durch Hemmung der Viren-Replikation nach Eindringen der Viren in die Zielzelle, sondern durch direkte Bindung an Viruspartikeln, wie HCV, HSV und HIV und somit die Infektion hemmt. Ein weiterer Mechanismus für die antivirale Aktivität von Lactoferrin ist die Bindung an Zell-Moleküle, die das Virus als Rezeptor oder Co-Rezeptor nutzt, z.B. die Bindung von Lactoferrin an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG). Viele Viren neigen dazu, zuerst auf HSPGs von Wirtszellen anzudocken, dann auf ihre spezifischen viralen Rezeptor zu binden und anschließend in die Wirtszelle einzudringen. Die Bindung von Lactoferrin zu HSPGs verhindert diesen ersten Kontakt und damit eine nachfolgende Infektion der Wirtszelle (Lang et al., 2011). Die folgende Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung der antiviralen Mechanismen von Lactoferrin.

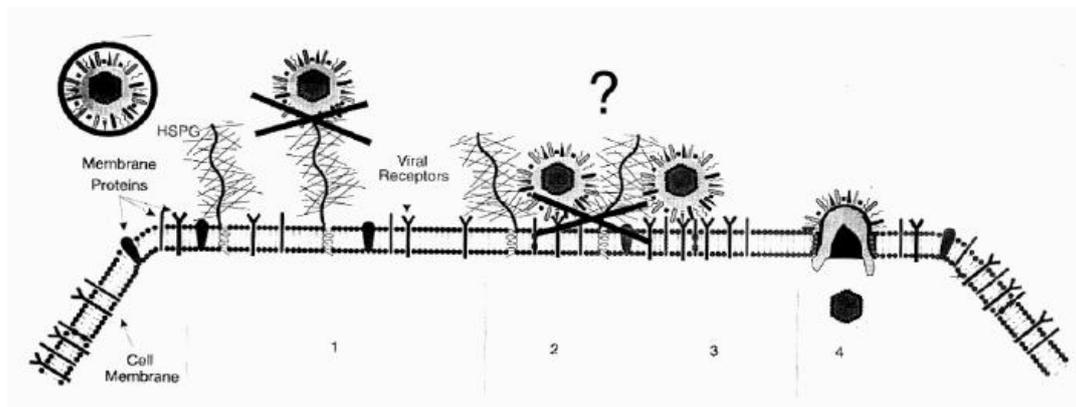


Abbildung 3 Schematische Darstellung der antiviralen Mechanismen von Lactoferrin (van der Strate et al., 2001).

Lactoferrin kann die Infektion der Wirtszelle durch direkte Bindung an Viruspartikeln verhindern. Außerdem wird das Andocken des Virus dadurch verhindert, dass Lactoferrin an HSPGs oder virale Rezeptoren der Wirtszelle bindet.

Ein indirekter antiviraler Mechanismus des Lactoferrin erfolgt unter der Aufregulation der antiviralen Reaktion des Immunsystems. In vivo- Experimente zeigten, dass in Folge einer Lactoferrintherapie häufig auch die Zahl der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten / Makrophagen und Granulozyten ansteigt. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle während der frühen Phase der Virusinfektion, bevor das spezifische Immunsystem hochreguliert wird und die antivirale Aufgabe übernimmt (Shau et al., 1992; Damiens et al., 1998; Kuhara et al., 2006;).

1.3.3.3 Antikanzerogene Wirkung

Viele wissenschaftliche Arbeiten gehen davon aus, dass Lactoferrin *in vitro* inhibierende Eigenschaften bei der Tumorgenese aufweist.

Einige Untersuchungen zeigten, dass bovines apo-Lactoferrin und Lactoferricin Metastasierung durch unterschiedliche Mechanismen hemmen. Der vermutliche Grund liegt in den Eisen-Bindungskapazitäten von bovinem Lactoferrin. Freies Eisen kann als Mutagen wirken, wodurch oxidative Schäden an der Nukleinsäure-Struktur induziert werden (Yoo et al., 1997).

Die experimentellen Daten von Bezault et al. (1994) zeigen, dass humanes Lactoferrin das Wachstum solider Tumore in der Maus hemmt. Die antimetastatische Aktivität von holo-Lactoferrin und apo-Lactoferrin ist aber fast gleich. Weiters kann humanes Lactoferrin die Lungen-Kolonisierung (experimentelle Metastasierung) in syngenem Mäusen wesentlich reduzieren, während Transferrin, ein verwandtes eisenbindendes Protein, keinen Effekt auf die Lungen-Kolonisierung hatte. Die möglichen antikanzerogenen Mechanismen von Lactoferrin beruhen vermutlich nicht auf der Eisenbindung (Bezault et al., 1994), sondern auf der Regulierung der Aktivität der natürlichen Killerzellen (Damiens et al., 1998), sowie der Beeinflussung der Apoptose (Yoo et al., 1997).

1.3.4 Gewinnung & Einsatz

Im Jahr 1986 wurde Lactoferrin in Säuglingsnahrung erstmals kommerziell eingesetzt. Heute wird Lactoferrin auf industrieller Basis aus Kolostrum oder Molke isoliert, gereinigt und in verschiedenen Bereichen z.B. Säuglingsnahrung, Nahrungsergänzungspräparaten, Kosmetika, Zahnhygieneprodukten oder Zusätze zu Futtermittel eingesetzt (Tomita et al., 2002).

Zur Gewinnung des nativen Lactoferrins werden mehrere Verfahren beschrieben. Viele in der Literatur beschriebenen Methoden basieren auf der Säulenchromatographie, wie z.B. durch Affinitäts (Heparin-Sepharose)-Chromatographie (Bläichberg & Hernell, 1980); Ionen (Kationen) Austausch-Chromatographie (Franis et al., 1995), oder die kostenaufwändige Isolierung über monoclonale Antikörper (Kawakami et al., 1987). Die Aufreinigung kann jedoch auch über hydrophobe Interaktion (Yoshida 1989), Gelfiltration (Nakai et al., 1987) oder Adsorptive Membranchromatographie (Plate et al., 2006) erfolgen.

1.3.5 Nachweismethode

1.3.5.1 Immunpräzipitation

Ende der 1960er Jahre wurde die „Einfache-Radiale-Immunodiffusion“ und „Raketen-Immunelektrophorese“ zur quantitativen Bestimmung von Lactoferrin eingesetzt (Laurell, 1966). Der Immundiffusionstest stellt ein mit einfachen Mitteln durchführbares immunchemisches Verfahren zum Nachweis von bestimmten Proteinen dar. Als Reagenzien verwendet man spezifische Antigene, die mit den zu bestimmenden Proteinen stöchiometrisch unter Ausbildung von Präzipitaten reagieren. Die dabei entstehenden Präzipitate können quantitativ ausgemessen werden (Becker et al., 1968). Das Prinzip der Methode „Raketen-Immunelektrophorese“ beruht auf einer Antigen-Antikörper-Präzipitation während der Wanderung der Proteine im elektrischen

Gleichstromfeld von einer Elektrode zur anderen. Das Gel enthält den Antikörper. Dadurch, dass Antigen im Überfluß auf das Gel aufgebracht wird, entsteht zunächst nur eine partielle Präzipitation. Diese Immunkomplexe bleiben wasserlöslich. Zur Anode hin bilden sich miteinander vernetzte Immunkomplexe in Form eines raketenförmigen und wasserunlöslichen Präzipitatbogens, der um so höher wird, je höher die Proteinkonzentration in der Probe ist (Schwerd & Groß, 1989).

1.3.5.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Heute werden verschiedene, kommerziell erhältliche ELISA-Testkits zur quantitativen Bestimmung von Lactoferrin in bovinem Kolostrum verwendet. Die meisten der angebotenen ELISA-Testsysteme zeigen bei der routinemäßigen Austestung großer Serien Vorteile gegenüber anderen Methoden. Dieser Nachweis ist empfindlicher und präziser. ELISA ist die Abkürzung für Enzyme Linked Immunosorbent Assay und bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. ELISA werden in vielen Bereichen der Analytik als schnelle Screening Tests erfolgreich eingesetzt. Mit Hilfe des ELISA können z.B. Viren, Antikörper, Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, usw.) nachgewiesen werden. Die Analysen sind im Vergleich zu den aufwändigen chromatographischen Verfahren (z.B. HPLC, GC-MS, LC-MS) mit minimalem Geräteeinsatz kostengünstig durchzuführen.

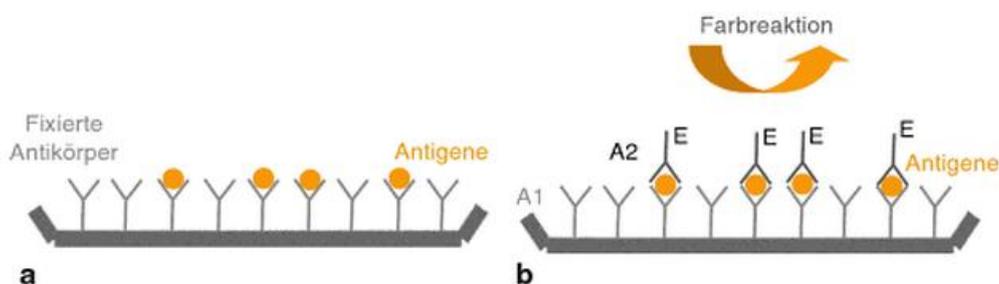


Abbildung 4 Sandwich-ELISA Aufbauschema (Ulrich Busch,2010)

Antigene der Probe werden von zwei spezifischen Antikörpern erkannt und mittels enzymatischer Farbreaktion nachgewiesen.

Beim Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper (siehe Abbildung 4), die spezifisch an unterschiedliche Stellen eines Antigens binden, eingesetzt. Der erste Antikörper (Coating- Antikörper) wird durch hydrophobe Wechselwirkungen an eine feste Phase (Innenfläche der Wells einer Mikrotiterplatte) gebunden. Danach wird die Probe in die Wells gegeben und eine bestimmte Zeit lang inkubiert. Das Antigen bindet während dieser Zeit an den spezifischen Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen um die ungebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. Anschließend wird ein zweiter Antikörper zur Detektion eingesetzt an welchen ein Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP)) gekoppelt ist. Dieser zweite enzymmarkierte Antikörper bindet an den primären Antigen-Antikörper-Komplex und es entsteht ein Komplex aus Antikörper, Antigen, Antikörper und Enzym. Danach wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Ein entsprechendes Substrat für das Enzym wird zugegeben, dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Chemolumineszenz oder Fluoreszenz erfolgen kann. Die Signalintensität ist normalerweise proportional der Antigenkonzentration. Der quantitative Nachweis erfolgt mit Hilfe einer Kalibrationskurve, dazu werden eine Reihe von Proben mit bekannter Konzentration (Standards) analysiert und das Messsignal gegen die Konzentration aufgetragen.

1.3.5.3 Immun-Affinitätschromatographie (IAC)

Schnelle quantitative Bestimmung von Lactoferrin in komplexen Matrices ist mittels Immun-Affinitätschromatographie (IAC) erreichbar. Durch Immobilisierung von „anti-Lactoferrin“-Antikörpern auf Silikon-Säulen werden unspezifische Wechselwirkungen eliminiert.

1.3.5.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die quantitative Analyse von Lactoferrin kann auch mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden.

Die HPLC ist eine Methode der Flüssigchromatographie, die zur Trennung, Identifikation und Quantifizierung von Substanzen durch Stoffverteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase eingesetzt wird. Bei der HPLC wird die Hochdruckpumpen (bis 400 bar) zum Fördern der mobilen Phase eingesetzt. Durch die Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase wandern die einzelnen Komponenten der Probe verschieden schnell durch die Säule und werden somit voneinander getrennt. Bei der Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) wird eine polare stationäre Phase (z.B. Kieselgel) genutzt. Polare Stoffe adsorbieren stärker als unpolare Stoffe an die polare stationäre Phase und halten sich daher bevorzugt auf der stationären Phase auf. Bei der Umkehrphasen-HPLC (*reversed phase*; RP-HPLC) verwendet man eine unpolare stationäre Phase (z.B. Kieselgel, an dessen Oberfläche Alkylgruppen gebunden sind). In diesem Fall bewegen sich die polaren Substanzen in der mobilen Phase schneller als die unpolaren (Kremer et al., 2011).

Clawin-Rädecker et al. (2000) haben die säurelöslichen Gehalte der einzelnen Molkenproteine (α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und B, Serumalbumin und Immunglobulin) in Milch mittels RP-HPLC-Methode analysiert. Die Bestimmung wurde entsprechend der von Resmini et al. (1989) entwickelten Methode für die Ermittlung des säurelöslichen β -Lactoglobulins durchgeführt: Nach isoelektrischer Fällung der Kaseine bei pH 4,6 wurden die lösliche Molkenproteine liquidchromatographisch an einer Umkehrphase getrennt und nach Fluoreszenz-Detektion über entsprechende Standards quantifiziert. Diese Methode ermöglicht die gleichzeitige Trennung und Quantifizierung der Molkenproteine in Kuhmilch.

Dračkov et al. (2009) haben die Lactoferrin-Konzentration in Milch von 27 tschechischen Ziegen mittels RP-HPLC-Methode mit Diodenarray-Detektor bei 205 nm gemessen, die Konzentration beträgt durchschnittlich 120 $\mu\text{g/mL}$ (Dračkov et al., 2009).

1.4 Immunglobulin G (IgG)

1.4.1 Vorkommen

Die Immunglobuline, auch Antikörper genannt, sind globuläre Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern spielen. Die Quelle dieser Immunglobuline sind B-Zellen, im Verlauf einer Immunreaktion können sich B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren, und diese sind darauf spezialisiert, große Mengen von Immunglobulinen zu synthetisieren und in Körperflüssigkeiten zu sezernieren. Sie erkennen einerseits verschiedenste Antigene mit sehr hoher Spezifität und Affinität, und lösen andererseits gezielte immunologische Abwehrreaktion aus (Schütt & Broeker, 2011). Die Immunglobuline lassen sich in 5 Klassen einteilen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, Sie sind die humorale (lösliche) Antwort der erworbenen Immunität im Verlauf einer Infektion (Neumann, 2008).

IgG ist die dominante Immunglobulinklasse im Serum. IgG diffundiert als Monomer (Ihr Molekulargewicht beträgt ca. 150 kDa) in die Extrazellulärflüssigkeit und erreicht dort ähnliche Konzentrationen wie im Serum. IgG ist durch die längste Halbwertszeit (etwa 3 Wochen) aller Antikörperklassen charakterisiert und das ist einer der Gründe, weshalb es sich besonders gut zur Substitutionstherapie bei Antikörpermangel eignet (Schütt & Broeker, 2011).

1.4.2 Struktur

Immunglobulin G (siehe Abbildung 5) sind wie alle anderen Antikörpermoleküle aus zwei identischen leichten mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa je Kette, und zwei identischen schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa je Kette aufgebaut, die miteinander durch Disulfidbrücken verbunden sind (Neumann, 2008).

1.4.3 Wirkungen

Aufgrund der Tatsache, dass IgG ein sehr kleines Molekül ist, kann es leicht aus Blutgefäßen in Körperhöhlen, Interzellularräume und Körperoberflächen diffundieren. IgG agglutiniert und präzipitiert Antigene und ist ein sehr bedeutender Antikörper für die Antigen-Antikörper-Reaktion. Nach dieser Reaktion werden Antigene durch Fresszellen lysiert (Lack, 2006). Bei Mensch ist IgG der einzige Ig-Isotyp, der von der Mutter durch die Plazenta in den kindlichen Kreislauf übertreten kann. Die übrigen Ig sind zu groß und können nicht aus der Plazenta austreten. Im Unterschied zum Menschen sind Kälber in den Tagen nach der Geburt nicht geschützt, weil es bei Wiederkäuern keine derartige Übertragung von Immunglobulinen von der Mutter auf das Kind gibt. Erst mit der Aufnahme des Kolostrums und der Resorption von dessen hochwertigen Immunfaktoren erhält das Neugeborene einen sogenannten „passiven Immunschutz“ (Schütt & Broeker, 2011).

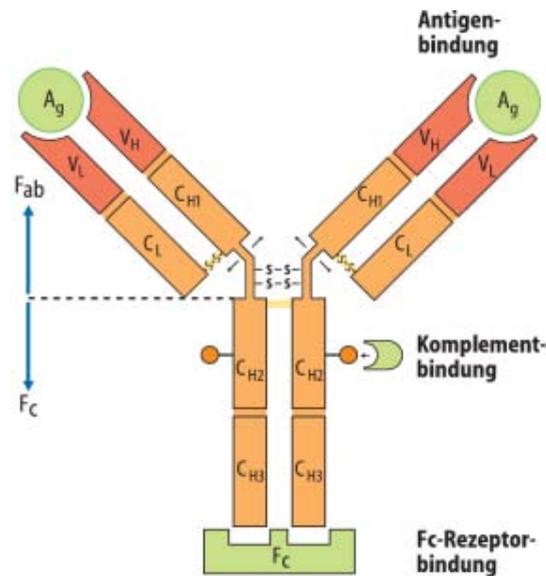


Abbildung 5 Struktur von Immunglobulin G (Lang & Lang, 2007)

Das Molekül besteht aus 4 Polypeptidketten (2 identisch leichte Ketten und 2 identisch schwere Ketten) und ist symmetrisch aufgebaut. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das Molekül kann weiter in variable (Antigenbindende Teil: Fab-Fragment) und konstante (Komplementbindende Teil: Fc-Fragment) Domänen unterteilt werden. H: schwere Ig-Kette; L: leichte Ig-Kette; C: konstante Domäne; V: variable Domäne; Fab: fragment of antigen bonding; Fc: constant fragment.

1.4.3.1 Passive Immunisierung des Kalbes

Da das Immunsystem neugeborener Kälber noch nicht voll entwickelt ist, muss das Immunsystem durch Kolostrum und somit durch maternale Antikörper, die im Dünndarm absorbiert werden, gestärkt werden (Banks, 1982).

Im Gegensatz zu Erwachsenen können neugeborene Kälber die im Kolostrum vorhandenen Immunglobuline unzerstört resorbieren, da die proteolytischen Aktivität ihres Darminhalts noch niedrig sind und im Kolostrum Trypsininhibitoren vorhanden sind (Tizard, 2000).

1.4.3.2 Neutralisation

Neutralisation, Komplementaktivierung und Opsonisierung sind die drei wichtigsten regulierenden Funktionen von IgG. IgG können die die Bakterien-Toxine neutralisieren und das Eindringen von Viren verhindern, indem sie die Anheftung eines Bakteriums oder eines Virus an Oberflächenrezeptoren einer Wirtszelle blockieren. Weiters können IgG direkt an die Virusoberfläche binden, die Struktur des Virus verändern und das Virus abtöten. Dieser Mechanismus erlaubt es, ein Virus auch dann noch zu neutralisieren, wenn es bereits an die Oberfläche der Wirtszelle gebunden hat (Ehlent & Von Kanel, 2010).

1.4.3.3 Komplementaktivierung

Nach der Bindung an ein Antigen können IgG das Komplementsystem über den klassischen Weg aktivieren, wenn aggregierte IgG-Moleküle an ein einziges Pathogen heften (Ehlent & Von Kanel, 2010). Im Verlauf der Komplementaktivierung entstehen durch enzymatische Fragmentierung der nativen Komponenten mehrere Spaltprodukte. Ihr funktionelles Zusammenwirken löst die Entzündungsreaktion aus (Hahn et al., 2008).

1.4.3.4 Opsonisierung

IgG können ein Fremdantigen über das Fab-Fragment für weitere immunologische Hilfsmechanismen abfangen und markieren. So können das Fc-Fragment durch Phagozyten wie z.B. Makrophagen erkannt und das Antigen somit phagozytiert werden. Die Phagozytose können beschleunigt werden wenn IgG bereits Komplement aktiviert haben, da die Phagozyten die Fc-Rezeptoren und die Komplementrezeptoren gleichzeitig erkennen können (Schütt & Broeker, 2011).

1.4.4 Gewinnung

In der Literatur werden vielen Methoden (z.B. Fällung, Affinitätschromatographie oder DEAE-Ionenaustauschchromatographie) beschrieben, um IgG zu gewinnen. Die Zugabe von entsprechenden Mengen an Ammonium- oder Natriumsulfat führt zur Fällung von IgG aus Serum, Plasma oder Hybridomkulturüberstand von fast allen Säugetieren. Der Vorteil liegt darin, dass er einfach zu implementieren und die Ausbeute von IgG sehr hoch ist, obwohl das ausgefallene IgG in der Regel immer mit anderen Proteinen verunreinigt ist. Außerdem ist das gewonnene IgG-Präparat sehr stabil und ist daher ideal zur langfristigen Lagerung (Page & Thorpe, 2002) geeignet. Einige Stämme von *Staphylococcus aureus* synthetisieren Protein A, eine Gruppe spezifischer Liganden, die an die Fc-Region von IgG binden. Protein G (abgeleitet aus den Gruppe C und G von *Streptokokken*) bindet auch an IgG-Fc. Protein A und G sind daher sehr nützlich für die IgG Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass Protein A nicht an alle IgG Subklassen bindet. Protein G bindet zwar an alle IgG Subklassen, die Bindungsaffinität ist aber relativ gering (Page & Thorpe, 1996). Aus dem Serum kann IgG auch durch ein einfaches „Ein-Schritt-Ionenaustauschchromatographie“-Verfahren gereinigt werden. Die Methode ist weit verbreitet und funktioniert nach dem Prinzip, dass IgG einen höheren isoelektrischen Punkt als die meisten Serumproteine besitzt. Wenn der pH-Wert ausreichend niedrig gehalten wird (unter dem isoelektrischen Punkt der meisten Serumproteine), werden die IgG nicht an den Anionenaustauscher (z.B. Diethylaminoethyl kovalent an Sepharose) gebunden und von anderen Serumproteinen getrennt. Die hohe Kapazität der Anionenaustausch-Säulen ermöglicht großflächige Reinigung von IgG aus dem Serum (Page & Thorpe, 1996).

1.4.5 Nachweismethode

Zur quantitativen Erfassung des IgG-Spiegels stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Sowohl Gränzer (1986) als auch Weaver et al. (2000) beschäftigten sich mit einem Methodenvergleich der quantitativen Immunglobulinbestimmung beim Rind.

1.4.5.1 Radialer-Immundiffusions-Test

Die Einfache-Radiale-Immundiffusion ist das in der Literatur am häufigsten verwendete Nachweisverfahren für Immunglobuline und stellt bis heute die Referenzmethode dar. (Mancini, 1965; Lack, 2006). Das Prinzip der Methode wurde vorher erwähnt (siehe 1.3.5.1).

1.4.5.2 Radioimmunassay (RIA)

1987 berichteten Weiss et al. die Entwicklung eines Festphasen-Radioimmunoassays (Mikrotiterplatten-RIA) zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern: Mit Antigen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit verdünnten Serumproben inkubiert und nicht gebundene Antikörper durch anschließendes Waschen entfernt. Dann erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatten mit radioaktiv markiertem Protein A, welches sich an die spezifisch gebundenen IgG-Antikörper anlagerte. Nach erneutem Waschen wurde die gebundene Radioaktivität gemessen, wobei die Anzahl der gemessenen Intensität pro Minute proportional zur Antikörperkonzentration war.

1.4.5.3 Immunologischen Trübungstest

Einige Firmen wie *Boehringer Mannheim* und *Wako* bieten Produkten zur quantitativen Bestimmung von IgG im Serum durch „Immunologischen Trübungstest“: Beim Mischen einer Probe mit Puffer und Anti-IgG-Antikörper reagiert das in der Probe enthaltene IgG spezifisch mit dem Anti-IgG-Antikörper zu einem unlöslichen Aggregat. Das führt zu einem erhöhten Trübungsgrad, der optisch bestimmt werden kann, und

proportional zu der IgG-Konzentration in der Probe ist. (Quelle: Produktbeschreibung, Autokit IgG, Wako Chemicals GmbH)

1.4.5.4 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Mit der Entwicklung von ELISA-Systemen wurden moderne Diagnostika zur Evaluierung von IgG-Konzentrationen in bovinen Blutserum- und Kolostrumproben entwickelt. Stengel (1998) und Amon (1999) etablierten entsprechende ELISA-Systeme für die Untersuchung des IgG-Gehaltes in Proben boviner Herkunft. Der Hintergrund dieses Verfahrens wurde vorher schon beschrieben (siehe 1.3.5.2).

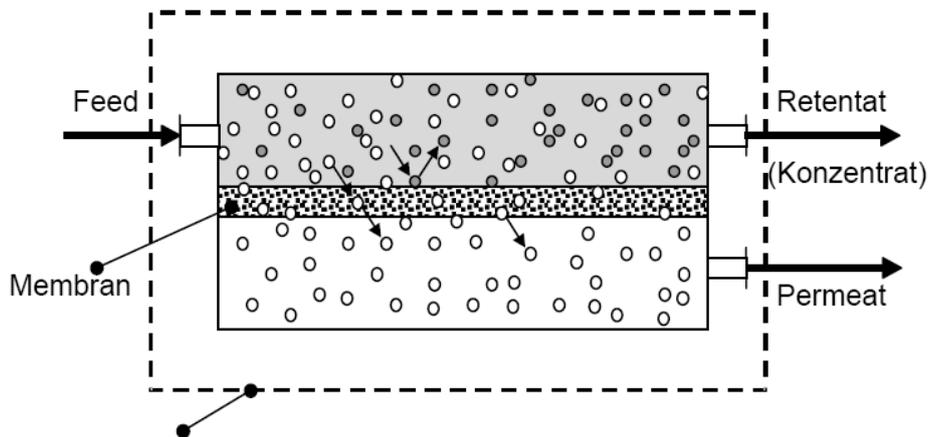
1.4.5.5 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Umkehrphasen-HPLC kann auch zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline (Ig) in der Molke eingesetzt werden. Die Methode ist schnell, einfach und höchst effektiv (EI-Loly M.M., 2007). Grundlagen zur HPLC-Messmethode wurden vorher schon beschrieben (siehe 1.3.5.4).

1.5 Membranfiltration

1.5.1 Allgemeines

Unter Membranen versteht man flächige, teildurchlässige Strukturen, die für zumindest eine Komponente eines sie berührenden Fluids – einer Flüssigkeit oder eines Gases – permeabel, für andere hingegen undurchlässig sind (Melin & Rautenbach, 2007). Als Membranfiltration wird eine Trennmethode bezeichnet, bei der Partikeln oder gelöste bzw. suspendierte Teilchen oder Moleküle aus einer Lösung mittels Membranen separiert werden können. Das Prinzip der Membranfiltration ist in der nachfolgenden Abbildung 6 dargestellt.



Modul: geschlossene Einheit in der Membranen angeordnet sind.

Abbildung 6 Schematische Darstellung des Trennverhaltens von Membranverfahren (Melin & Rautenbach, 2007).

Die Verwendung von Membranen zur Fraktionierung von Medien bietet einige Vor- und Nachteile gegenüber anderen Techniken wie z.B. Zentrifugation:

Vorteile:

- leichtes Up-Scaling
- milde Reaktionsbedingungen
- einfache Handhabung
- geringer Energieaufwand

Nachteile:

- begrenzte Lebensdauer der Membran
- geringe Selektivität
- Membranfouling (Partikelablagerungen an oder in den Poren der Membran)

Die Möglichkeit, gezielte Stofftrennungen bei niedrigen Temperaturen bzw. Umgebungstemperaturen ohne Phasenänderung durchzuführen, führt dazu, dass die Membranfiltration in vielen Anwendungsbereichen eine kostengünstige Lösung ist. Die verwendeten Membranen werden einerseits nach Größe oder Molmasse der größten

noch durchgelassenen Komponenten, andererseits nach dem Trennprinzip charakterisiert.

Zur Abtrennung suspendierter Partikel und Tropfen werden poröse Membranen (siehe Abbildung 7) eingesetzt, anhand der Porengröße werden Sie in verschiedene Gruppen unterteilt (Melin & Rautenbach, 2007).

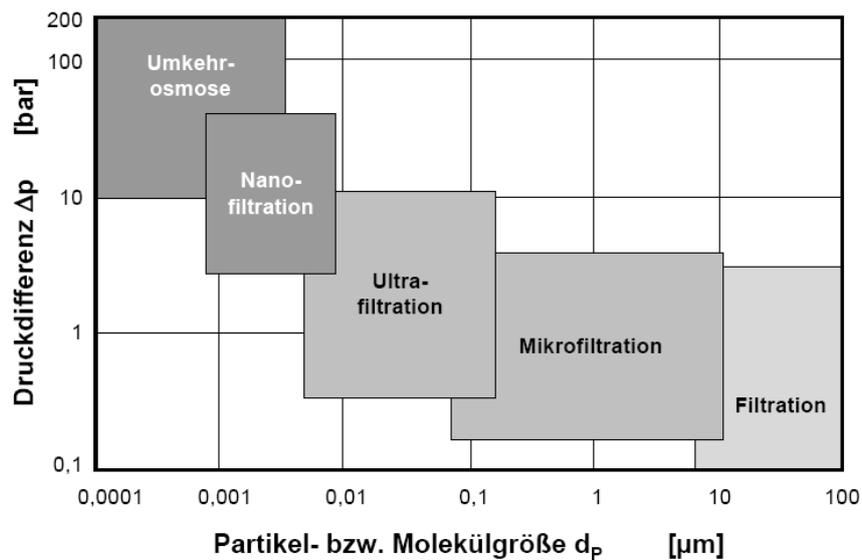


Abbildung 7 Zuordnung der druckgetriebenen Membranverfahren (Melin & Rautenbach, 2007).

1.5.2 Mikrofiltration und Ultrafiltration

Bei Mikro- und Ultrafiltration werden die poröse Membranen als Filter eingesetzt, um Partikel aus flüssigen Lösungen zu trennen. Die Stofftrennung erfolgt aufgrund einer Druckdifferenz auf beiden Seiten der Membran. Der Unterschied zwischen der Mikro- und der Ultrafiltration liegt in den verschiedenen Porengrößen und in der treibenden Kraft für den Stofftransport. Die Porengröße der Membranen liegt bei der Mikrofiltration zwischen 0,08 - 10 μm , während die Poren einer Ultrafiltrationsmembran zwischen 0,008 μm und 0,12 μm groß sind. Die typische transmembrane Druckdifferenz einer Mikrofiltration beträgt ca. 50 – 500 kPa, eine

Ultrafiltration arbeitet meistens mit transmembranen Druckdifferenzen zwischen 100 und 1000 kPa (Goedecke, 2006).

Die Mikrofiltration ist im großtechnischen Maßstab in der Lebensmitteltechnik, der pharmazeutischen Industrie und in der Abwasseraufbereitung anzutreffen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die mikrobiologische Untersuchung z.B. zur Bestimmung der Trinkwasserqualität. Die Ultrafiltration wird hauptsächlich für Konzentrierung, Fraktionierung und Reinigung von makromolekularen Substanzen verwendet (Wilhelm, 2005).

1.5.3 Nanofiltration

Die Nanofiltration ist ein druckgetriebenes Membranverfahren zur Aufarbeitung flüssiger Lösungen. Die Porengröße liegt normalerweise zwischen 0,01 und 0,001 μm . Die typische transmembrane, hydrostatische Druckdifferenz der Nanofiltration beträgt ca. 500 – 3000 kPa.

Eine wesentliche Besonderheit der Nanofiltrationsmembranen ist die Ionenselektivität. Durch die negative Membranladung können einwertige Ionen die Membran überwiegend passieren, während mehrwertige Ionen (z.B. Sulfate und Carbonate) in hohem Maße zurückgehalten werden, obwohl die Membranporen deutlich größer als die Ionen sind (Melin & Rautenbach, 2007).

1.5.4 Proteinfractionierung mittels Membranfiltration

Die Proteinfractionierung mit Mikrofiltration gewinnt in der Milchwirtschaft mehr und mehr an Bedeutung. Dabei wird Kasein aufkonzentriert, während die Hauptfraktionen der Molkenproteine z.B. β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin die Membran passieren können. Dazu sind in der Regel Mikrofilter mit Porengrößen im Bereich 0,05 – 0,2 μm im Einsatz (Thomet & Bütikofer, 2004).

Das Retentat von Magermilch nach der Filtrationsanlage ist ein Kaseinkonzentrat mit einem geringen Anteil (nur noch 5 bis 10%) an Molkenproteinen. Es kann zu den verschiedensten Produkten weiterverarbeitet werden (Bachmann et al., 2003). Bei der Mikrofiltration-Konzentrierung gehen die meisten Molkenproteine ins Permeat über. Die gewonnenen Milchfraktionen liegen in der Regel noch in nativem Zustand vor (Maubois, 2001).

1.6 Mikrobielle Kontamination in Milchprodukten und mikrobiologische Parameter

Es gibt im Prinzip 3 Kontaminationsquellen: die Kuh, das Euter und alles, womit die Milch in Berührung kommt. Wenn Milch im Euter gebildet wird, ist sie praktisch steril. Noch bevor sie das Euter verlässt, wird sie mit Bakterien infiziert, die über den Zitzenkanal eintreten. Diese Bakterien sind normalerweise harmlos und in sehr geringer Anzahl vorhanden. Im Fall einer bakteriellen Euterentzündung (Mastitis) wird die Milch jedoch stark mit Bakterien kontaminiert. Beim Umgang mit der Milch auf dem Bauernhof kann sie mit verschiedenen Mikroorganismen kontaminiert werden.

Die Hygiene bei der Milchgewinnung wirkt sich nicht nur auf die Keimzahl sondern auch auf die Keimflora aus. In der frisch gemolkenen Milch mit niedriger Keimzahl (etwa 10.000 Kolonie bildende Einheiten (KbE) / mL) dominieren die Keime der Euteroberfläche (vor allem Mikrokokken, Staphylokokken) (Busse, 2000). Bei hohen Keimzahlen (über 100.000 KbE / mL) überwiegen meist die gramnegativen Keime aus den Melkanlagen. Fehler bei der Reinigung der Melkanlage und des Milchgeschirrs sind durch Kühlung nicht mehr zu korrigieren, da sich die Gramnegativen aus den Anlagen ohne Verzögerung auch in gekühlter Milch relativ rasch vermehren (Zangerl, 2007). Eine rasche Kühlung auf unter 4°C trägt wesentlich zur Milchqualität bei. Dies reduziert das Bakterienwachstum deutlich und verbessert die Haltbarkeit der Milch (Bake, 2003). In der Verordnung (EG) Nr. 1662/2006 wurden die maximalen Temperaturen für die Milchlagerung am Erzeugerbetrieb und während des Transports festgesetzt (8°C bei täglicher Ablieferung, 6°C bei nicht täglicher Ablieferung, 10°C während des Transports). Bei der Lagerung im Verarbeitungsbetrieb darf die Milch bis zur Verarbeitung eine Temperatur von 6°C nicht überschreiten, wenn sie nicht innerhalb von 4 Stunden nach Einlangen verarbeitet wird.

1.6.1 Gesamtkeimzahl

Unter „Gesamtkeimzahl“ versteht man die Anzahl der keimfähigen Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Schimmelpilze) insgesamt, die in einer definierten Menge an Probenmaterial unter bestimmten Bebrütungsbedingungen ermittelt wird. Es werden aerobe und fakultative anaerobe Keime erfasst (Krömker, 2007).

Die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von pathogenen Mikroorganismen oder toxischen Stoffwechselprodukten mikrobieller Herkunft ist der Gesamtkeimzahl direkt proportional. Hohe Gesamtkeimzahlen in Lebensmitteln weisen auf mangelnde Produktionshygiene (z.B. bei der Kühlung, Behandlung oder Desinfektion) hin (Sinell, 2004).

Die mikrobielle Kontamination des Kolostrums hat auch Auswirkung auf die Qualität von Kolostrumprodukten, weil die Bakterien im Kolostrum die passive Aufnahme von Kolostral-Antikörper über den Darm beeinflussen, wodurch die passive Übertragung der Immunität durch Kolostrum auf das Neugeborene abgeschwächt wird (James et al., 1981; Poulson et al., 2002). Swan et al. (2007) untersuchte das mikrobielle Wachstum in über 200 bovinen Kolostrumproben. Die Proben wurden aus 12 Molkereien in Minnesota und Wisconsin gesammelt, und nach der aseptischen Entnahme sofort analysiert. Das geometrische Mittel der Gesamtkeimzahl betrug ca. $1,61 \times 10^7$ KbE/mL (Swan et al., 2007).

Normen für die Rohmilch- und auch Kolostrumqualität sind europaweit einheitlich in der Verordnung (EG) Nr. 1662/2006 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs festgelegt. In Österreich gilt im Speziellen die Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte von 2006. In Tabelle 3 sind die Grenzwerte für Kuhmilch, die für diese Arbeit relevant sind, aufgelistet.

Tabelle 3 Kriterien für Rohmilch nach Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte

Milch	Kriterium	Anforderung
rohe Kuhmilch	Keimzahl 30°C Somatische Zelle	$\leq 100.000 / \text{mL}^a$ $\leq 400.000 / \text{mL}^b$
Rohmilch von anderen Tierarten	Keimzahl 30°C	$\leq 1.500.000 / \text{mL}^a$
Rohmilch von anderen Tierarten zur Herstellung von Rohmilchprodukten	Keimzahl 30°C	$\leq 500.000 / \text{mL}^a$

^a Geometrischer Mittelwert über zwei Monate bei mindestens zwei Probenahmen je Monat

^b Geometrischer Mittelwert über drei Monate bei mindestens einer Probenahmen je Monat

Quelle: Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte, 2006

1.6.2 Verfahren zur Keimzahlbestimmung

Grundsätzlich können Keime auf zwei Arten quantifiziert werden. Einerseits kann die Partikelzahl bzw. –masse bestimmt werden, andererseits können Funktionen der lebenden Zellen dazu benutzt werden. Es gibt eine Vielzahl von Quantifizierungsmöglichkeiten, die in der nachfolgenden Tabelle 4 dargestellt sind.

Tabelle 4 Methoden zur Keimzahlbestimmung (Quelle: Czichos, 2009)

Lebendzellzahl	-direkte Quantifizierung	<ul style="list-style-type: none"> • Koch'sches Plattengussverfahren • Spatelplattenverfahren • Glasperlenverfahren • Tropfverfahren • Membranfilterverfahren • Most-probable-number-Methode (MPN-Methode)
	-indirekte Quantifizierung	<ul style="list-style-type: none"> • Messung der Konzentration von DNA, Protein, ATP und anderen für die Zelle essentiellen Molekülen • Messung der metabolischen Aktivität pro Zeiteinheit über Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums
Partikelzählung	-direkte Quantifizierung	<ul style="list-style-type: none"> • Mikroskopische Zählung in geeigneten Zählkammern
	-indirekte Quantifizierung	<ul style="list-style-type: none"> • Trübungsmessung im Photometer • Gewichtsbestimmung

1.6.2.1 Keimzahlbestimmung auf PCA (Plate Count Agar) nach KOCH

Das Koch'sche Plattengussverfahren ist eine übliche Methode zur Bestimmung der Keimzahl. Das Nährmedium ist frei von Hemmstoffen, wird zuerst im Autoklaven sterilisiert, nach dem Abkühlen (auf etwa 50°C) wird der flüssige Agar zu den in Petrischalen vorgelegten Proben ausgegossen und durch Schwenken vermischt. Im Idealfall bildet jeder vermehrungsfähige Mikroorganismus bei Kultivierung eine sichtbare Kolonie. Derartige Koloniebildenden Einheiten sind mit freiem Auge sichtbar. Die Probe muss vor der Kultivierung entsprechend verdünnt werden, um zu sog. „auszählbaren“ Platten zu kommen (nur Koloniezahlen, die zwischen 10 und 300 KbE/Platte liegen, werden für die Keimzahlbestimmung verwendet).

1.6.2.2 Keimzahlbestimmung mit Membranfiltration

Die Probe wird in einer Filtrationseinheit über einen speziellen Membranfilter filtriert. Die Bakterien bleiben auf der Membranoberfläche haften. Die Membran wird dann in eine Schale gelegt, die zuvor mit speziellem Nährmedium befüllt wurde. Anschließend wird die Schale verschlossen und bei einer bestimmten Temperatur eine bestimmte Zeit inkubiert. Das Nährmedium ist so beschaffen, dass sich in der Inkubationszeit nur die gesuchten Bakterien vermehren und ihre Anwesenheit durch Bildung von Kolonien verraten. Diese Kolonien werden nach der Inkubationszeit gezählt und geben so Aufschluss über die Anzahl der Bakterien in der Probe.

1.6.2.3 Keimzahlbestimmung durch das MPN-Verfahren

MPN-Tests (Most Probable Number = höchstwahrscheinliche Anzahl) sind eine einfache Möglichkeit, die Keimzahl in einer Probe zu bestimmen. Ein vorgegebenes Volumen einer Probe bzw. deren Verdünnung wird in testfertige, Reagenz enthaltene Röhren gefüllt. Die Röhren werden verschlossen und bei einer bestimmten Temperatur eine bestimmte Zeit inkubiert. Das Reagenz ist so beschaffen, dass sich in

der Inkubationszeit nur die gesuchten Keime vermehren und ihre Anwesenheit durch Farbumschlag, starke Trübung, Gasbildung oder Fluoreszenz verraten. Die Anzahl von Röhren mit positiven Reaktionen einer Reihe gibt Aufschluss über die höchstwahrscheinliche Anzahl der Bakterien in der Probe.

1.6.2.4 Automatisiertes Verfahren zur Keimzahlbestimmung

Heute bieten viele Firmen die Möglichkeit, die routinemäßige Keimzahlbestimmungen in der Lebensmittelindustrie automatisch durchzuführen: Das TEMPO® ist beispielsweise ein vollautomatisierte System zur Keimzahlbestimmung von Qualitätsindikatoren. Das System basiert auf der MPN-Methode und automatisiert diese arbeitsintensive Methode und standardisiert viele Schritte der Probenvorbereitung, Interpretation und Befundung. Die Vorteile dieses Systems sind neben Schnelligkeit und Präzision eine höhere Zuverlässigkeit im Vergleich mit anderen existierenden Methoden.

1.6.3 Enterobacteriaceae

Die Enterobakterien sind gram-negative, sporenlose, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien. Der Name (enteron = Darm) geht auf die Tatsache zurück, dass einige repräsentative Formen der Familie der Enterobakterien Darmbewohner sind. Enterobakterien können Kohlenhydrate, hauptsächlich Glucose, unter Bildung von Säuren und Gas abbauen. An ihre Umgebung stellen sie hohe Ansprüche: Bei niedrigen pH-Werten vermehren sie sich nicht mehr. Sie sind nicht resistent gegenüber hohen Temperaturen und nur bedingt resistent gegenüber tiefen Temperaturen (Gefriertemperaturen), Trockenheit und Bestrahlung. Die Familie der Enterobakterien umfasst mindestens 30 verschiedene Gattungen, darunter *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Yersinia* und *Enterobacter* als die wichtigsten Vertreter (Rolle & Mayr, 1993; Sinell, 2004)

Da die Enterobakterien in der Lebensmittelproduktion zu den Schad- und Verderbskeimen gehören, ist ihr Vorhandensein in Milch und Milchprodukten unerwünscht.

Methode zum Nachweis - Bestimmung der Enterobacteriaceae auf VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar nach MOSSEL

Alle Enterobakterien bauen Glucose unter Säurebildung ab. Die Säurebildung wird auf VRBD-Agar (Violet Red Bile Dextrose Agar = Kristallviolett- Neutralrot- Galle-Glucose- Agar nach MOSSEL) durch den Umschlag des Indikators Neutralrot von farblos nach rot angezeigt. Starke Säurebildung führt außerdem zu einem Präzipitationshof um die betreffenden Kolonien durch Ausfällung von Gallensäuren.

1.6.4 Lactobacillen

Milchsäurebakterien sind eine Gruppe von verwandten Bakterien, die Milchsäure als Endprodukt der Zuckervergärung bilden. Zu den Milchsäurebakterien gehören unter anderem folgende Gattungen: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus*.

Lactobacillen stellen hohe Ansprüche an das Nährmedium wie z.B. vergärbare Kohlenhydrate, Aminosäuren, Peptide, Vitamine und Fettsäuren. Bei der Vergärung von Zuckern entstehen bei homofermentativen Arten Milchsäure und bei heterofermentativen Arten Milchsäure, Essigsäure oder Ethanol und Kohlendioxid. In Milchprodukten gehören sie zur Reifungsflora (Bake, 2003).

Methode zum Nachweis - Bestimmung der Gesamt-Lactobacillen auf MRS (de Man, Rogosa und Sharpe) Agar

MRS Agar wurde von deMan, Rogosa und Sharpe entwickelt, um alle Stämme von *Lactobacilli* zu kultivieren, insbesondere die anspruchsvollen, langsamer wachsenden

Typen wie *L. brevis* und *L. fermenti*. Das Medium ist geeignet zur Kultivierung von Milchsäurebakterien im Allgemeinen, einschließlich *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc*. Natriumacetat inhibiert bei niedrigem pH die meisten Mikroorganismen, einschließlich anderer Streptokokken und Schimmelpilze.

1.6.5 Sporenbildner (*Bacillus*)

Die Vertreter der Gattung *Bacillus* sind – vor allem im Boden – weit verbreitet. In Milchprodukten stammen *Bacillus*-Arten überwiegend aus der Rohmilch oder aus Zusatzstoffen pflanzlicher Herkunft (z.B. Gewürze, Stärke, Reis). In bestimmten Produktionsanlagen (z.B. Eindampfungsanlagen, Wärmeaustauschern) können sie sich während langer Standzeiten vermehren.

In Form ihrer hitzeresistenten Sporen überleben *Bacillus*-Arten die Pasteurisierung. Zur Abtötung dieser Sporen sind Ultrahocherhitzungs- oder Sterilisationsverfahren notwendig. Außer streng aeroben Arten (z.B. *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*) treten in Milch und Milchprodukten auch fakultativ anaerobe auf, z.B. *B. cereus*, *B. coagulans* und *B. licheniformis*.

Bacillus cereus ist von besonderer Bedeutung. Manche Stämme können sich auch in kühlgelagerter Milch vermehren und Geschmacksveränderungen hervorrufen. In sauren Milchprodukten ist er nicht von Bedeutung, da er wie die meisten *Bacillus*-Arten säureempfindlich ist.

Entwickelt sich *Bacillus cereus* in genussfertigen Lebensmitteln bis zu Keimzahlen von über 10^4 pro g Lebensmittel, kann eine unspezifische Lebensmittelvergiftung hervorgerufen werden (Quelle: Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik, 1985; Schweizer Hygienverordnung, 2004)

Methode zum Nachweis – Bestimmung von Bacillen (Endosporen) auf CASO Agar

Zellen von *Bacillus* bilden unter physikalischen oder chemischen Stressbedingungen Endosporen aus. Diese sind hitzeresistent und keimen wieder aus, wenn sich die äußeren Bedingungen zum Positiven hin verändern. Der Casein-Soja-Pepton-Agar besteht im Wesentlichen aus Casein-Pepton und Sojamehlpepton, wodurch auch sehr anspruchsvolle Bakterien auf diesem Medium wachsen können.

2 PROBLEMSTELLUNG

Das Hauptziel dieser Masterarbeit war es, die Wirkung von verschiedenen prozessrelevanten Faktoren auf der Leistung des „zweistufigen Membran-Systems“ für Verarbeitung von bovinem Kolostrum hinsichtlich hygienischer, immunologischer und chemischer Aspekte zu überprüfen, um ein steriles und kaseinfreies Kolostrumprodukt ohne einen wesentlichen Verlust wertvoller nativer Proteine zu erhalten.

In diesem Zusammenhang sollten folgende Fragen gestellt werden:

Welchen Einfluss haben die Porengröße der Membranen, die Verdünnungsstufen der Feedlösungen und die Operationstemperatur auf die Ausbeute an IgG und LF sowie auf die Entkeimungs- und Entkaseinierungsfähigkeit des Prozesses während der Mikrofiltration? Mit welchem Operationsmodell (direkter Nanofiltration oder Diafiltration mit Nanomembran) und durch welche Prozesseinstellungen werden höhere Ausbeuten an IgG und LF bei der Nanofiltration erzielt?

Um diese Fragen zu klären, wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Gesamtproteingehalt, Kaseingehalt, IgG-Gehalt, LF-Gehalt, Keimzahl, Trockenmasse und pH-Wert von Rohkolostrumproben und Rohmilchproben .
- Rohkolostrumproben wurden durch Zentrifugation entfettet und mittels Mikromembran mit verschiedenen Porengrößen unter konstanten Bedingungen filtriert. Die Entkeimungsfähigkeit verschiedener Membranen wurde beurteilt. Gleichzeitig wurde der Gehalt an Kasein von Magerkolostrum und MF-Permeat gemessen, um die Entkaseinierungsfähigkeit des Prozesses zu beurteilen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Ausbeute an IgG und LF gelegt. Für weitere Versuche wurde jene Membran ausgewählt, die die besten Eigenschaften zeigte.
- Magerkolostrumproben wurden mit Salzlösung auf unterschiedliche Verdünnungsstufen verdünnt. Der Einfluss der Verdünnungsstufe auf die IgG bzw. LF Ausbeute wurde beurteilt. Eine geeignete Verdünnungsstufe für Magerkolostrum vor der Mikrofiltration wurde festgelegt.
- Um die Auswirkung von steigenden Temperaturen auf die Ausbeuten an IgG und LF bei der Mikrofiltration zu untersuchen, wurden Magerkolostrumproben bei

gleicher Verdünnung bei unterschiedlichen Temperaturen unter gleichen Bedingungen filtriert. Die Temperatur, bei der die maximale Ausbeute an IgG und LF bei der Mikrofiltration erreicht wurde, wurde für die weitere Untersuchung gewählt.

- Die Auswirkungen vom Operationsmodell der Nanofiltration (direkte Nanofiltration und Diafiltration über Nanomembran) und von den Prozesseinstellungen (Temperatur, Druck usw.) auf die Ausbeute an IgG und LF wurden analysiert. Die Konzentrationen an IgG und LF im NF-Konzentrat wurden gemessen und daraus die Ausbeute bei der Nanofiltration ermittelt.

Anhand der vorhandenen Ergebnisse wurden unterschiedliche Kombinationen der Prozessparameter für den zweistufigen Membranprozess beurteilt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Proben

Die im Rahmen dieser Masterarbeit untersuchten Rohkolostrumproben stammten von Bio-Bauernhöfen in Bayern und Österreich, die auf Trockenstellen (die Phase zwischen der vorangegangenen Laktation und der Geburt des folgenden Kalbes) verzichteten.

Nach dem Melken wurde das Kolostrum unverzüglich eingefroren und mindestens 30 Tagen in Quarantäne gehalten. Geliefert wurde es in ca. 2 kg schweren, gefrorenen Blöcken, die bei -30°C gelagert wurden.

Vor Beginn des Membranfiltrationsprozesses wurden die Proben bei 30°C – 40°C aufgetaut und entsprechend verdünnt. Nach der Prozessdurchführung wurden die entsprechenden Proben gezogen, in 50 mL Röhrchen gefüllt und diese dann für die weitere Qualitätsüberprüfung wieder tiefgefroren.

3.2 Das zwei Schritt Membran-Filtrationssystem

Der Ablauf dieses Membranfiltrationsprozesses ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die unerwünschten Bestandteile des Kuhkolostrums (Mikroorganismen und Kasein) wurden zuerst von der Mikromembran zurückgehalten. Die MF-Permeate wurden weitergehend mittels Nano-Membran behandelt, um die erwünschten Molkenproteine (z.B. Lactoferrin und Immuglobulin G) zu reinigen.

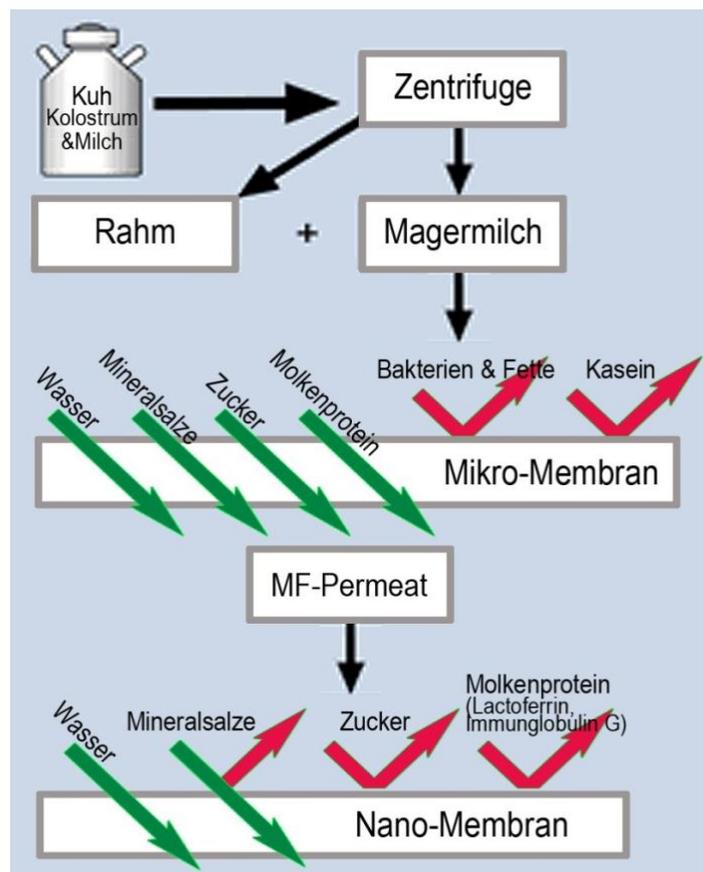


Abbildung 8 Proteinfraktionierung mittels Membranfiltration: Das „zweistufige Membran System“ zur Verarbeitung von bovinem Kolostrum.

3.3 Immunologische Untersuchungen von Kolostrumprodukten mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von IgG und LF in bovinem Kolostrum wurden zwei verschiedene ELISA-Kits verwendet.

3.3.1 Bestimmung der Lactoferrin-Konzentration in Kolostrum und Kolostrumprodukten mittels ELISA

3.3.1.1 Geräte und Material

Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set

Tabelle 5 Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set, Cat. NO. E10-126, Bethyl, USA

• Coating Puffer	SIGMA C3041-50CAP 0,05 M Carbonate-Bicarbonat, pH 9,6 SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Germany
• Waschlösung	SIGMA T9039-10PAK
• Blockierungslösung	0,05 M Tris buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027M KCl
• Sample/Conjugate Verdünnungslösung	pH 8,0; 0,05% Tween 20 SIGMA Aldrich, Co. USA
• Stopplösung	0,2M Schwefelsäure, Die Stopplösung wird durch Verdünnen der Maßlösung (2 M H ₂ SO ₄ , A2845, AppliChem GmbH, Germany) hergestellt
• Coating AK	Goat anti-bovine LF-affinity purified (1mg/mL) Cat. Nr. A10-126A
• HRP-Detektions-AK	Goat anti-bovine-HRP-Konjugat (1mg/mL) Cat. Nr. A10-126P
• Enzym Substrat:	TMB Peroxidase Substrat & Peroxidase Lösung B; Ein Zweikomponentensystem bestehend aus TMB Peroxidase Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [0,4 g/l] in einer organischen Base, und Peroxidase Lösung B, H ₂ O ₂ (0,02%) in einem Zitronensäurepuffer.
• Standards	Bovine LF/Calibrator (1 mg/mL) Cat. Nr. RC10-126

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- TECAN Photometer: TECAN Magellan, Artikelnummer I 217 618
- TECAN Washer: TECAN-Columbus Washer, Artikelnummer I 209 004
- Reinstwassersystem: Ultra Clear basic; SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH (Germany)
- 96-Well-Platten: High Binding, REF 655061; Greiner Bio One (Germany)
- Mehrkanalpipette: 8-Kanal-Pipette 30-300 µL, 146908005; Eppendorf Research[®] (Germany)
- Variable Pipette (0,5-10 µL, 2-20 µL 20-200 µL, 100-1000 µL): Eppendorf Research[®] (Germany)

- Präzisionspipetten (1000 μL): Eppendorf Research[®] (Germany)
- Eppendorfgefäße (2 mL) zur Verdünnung der Standards und Proben
- Eppendorf Tips Standard

3.3.1.2 Durchführung

Reagenzienvorbereitung

- Coating Puffer: Eine Kapsel wurde in 100 mL UHQ (Ultra High Quality) H_2O gelöst, entspricht 0,05 M Carbonat-Bicarbonat Puffer, pH 9,6. Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.
- Waschlösung, Blockierungslösung, Sample/Conjugate Verdünnungslösung: Eine Packung wurde in 1 L UHQ H_2O gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Probenaufbereitung

- Die Probe (gefrorenes Kolostrum im 50 mL Röhrchen) wurde für 20 min bei 30°C im Wasserbad aufgetaut.
- Probe wurde sorgfältig gemischt (gevortext). Von jeder Probe wurden 2 Aliquote zu je 1 mL entnommen und nach der Analyse bei -20°C eingefroren.
- Nach Herstellung aller benötigten Reagenzien erfolgte eine Verdünnung der Kolostrumproben bzw. Standards mit Sample/Conjugate Verdünnungslösung, damit alle Proben im Konzentrationsbereich des Standards liegen [7,8 – 500 ng/mL].

ELISA-Durchführung

- Die Mikrotiterplatte (high Affinity) wurde mit Capture-Antikörper beschichtet. Dazu wurde pro Well 1 μl AK [1 mg/mL] auf 100 μl Coating Puffer verdünnt, dies entspricht einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$. Für 32 Wells wurde z.B. 34 μl AK mit 3366 μl Coating Puffer gemischt. Jeweils 100 μl /Well der

Capture-Antikörperlösung wurden mittels Mehrkanalpipette entsprechend dem Auftragsschema (siehe Tabelle 6) aufgetragen und bei Raumtemperatur 60 min inkubiert.

- Nach 5 automatisierten Waschgängen mit der vorbereiteten Waschlösung mittels TECAN Washer wurde jedes Well mit 200 µl Blockierungslösung befüllt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Blockierungslösung mittels TECAN Washer abgesaugt und die Platte 5 mal gewaschen.
- Aliquote von 100 µl der vorbereiteten Proben – bzw. Standardverdünnungen (7,8 – 500 ng/mL bovine IgG bzw. Lactoferrin) wurden in je zwei Wells (Doppelbestimmung) pipettiert. Nach Abdecken der Platte erfolgte eine 60 min Inkubation bei Raumtemperatur, danach wurde die Platte 5 mal gewaschen.

Tabelle 6 Probenauftragschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL1	S4/1	P1/1	P5/1	P9/1	P13/1	P17/1	P21/1	P25/1	P29/1	P33/1	P37/1
B	BL2	S4/2	P1/2	P5/2	P9/2	P13/2	P17/2	P21/2	P25/2	P29/2	P33/2	P37/2
C	S1/1	S5/1	P2/1	P6/1	P10/1	P14/1	P18/1	P22/1	P26/1	P30/1	P34/1	P38/1
D	S1/2	S5/2	P2/2	P6/2	P10/2	P14/2	P18/2	P22/2	P26/2	P30/2	P34/2	P38/2
E	S2/1	S6/1	P3/1	P7/1	P11/1	P15/1	P19/1	P23/1	P27/1	P31/1	P35/1	P39/1
F	S2/2	S6/2	P3/2	P7/2	P11/2	P15/2	P19/2	P23/2	P27/2	P31/2	P35/2	P39/2
G	S3/1	S7/1	P4/1	P8/1	P12/1	P16/1	P20/1	P24/1	P28/1	P32/1	P36/1	P40/1
H	S3/2	S7/2	P4/2	P8/2	P12/2	P16/2	P20/2	P24/2	P28/2	P32/2	P36/2	P40/2

- Im nächsten Schritt wurden pro Well 100 µl des verdünnten (1:100.000) Detektor-Antikörpers (HRP-Konjugates) mittels Mehrkanalpipette auf die Platte pipettiert. Die Herstellung der Detektor-Antikörperverdünnung erfolgte laut

Protokoll des Herstellers (Chargen-abhängig). Es folgte eine 60 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Platte 5 mal gewaschen.

- Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung (gleiche Mengen von TMB Peroxidase Substrat und Peroxidase Lösung B wurden frisch gemixt) pro Well erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln der abgedeckten Platte für weitere 15 Minuten.
- Pro Well wurden 100 µl Stopplösung zupipettiert. Mit Zugabe der Stopplösung wurde der Farbumwandlungsprozess des Substrates blockiert und zugleich ein gelblicher Farbumschlag bewirkt.

3.3.1.3 Auswertung

- Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Absorptionsmessung der Extinktion bei 450 nm Meßwellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 490 nm mittels TECAN Photometer.
- Mit Hilfe der Software (MagellanTM und Excel) wurde eine Kalibrationskurve erstellt, in der die Standardkonzentrationen (ng/mL) logarithmisch auf der X-Achse und die Standardextinktionen linear auf der Y-Achse aufgetragen wurden. Es wurde eine 4-Parameter-Auswertung (4 parameter curve fit) durchgeführt, um die Kalibrationskurve zu erstellen. Mit Hilfe dieser Kalibrationskurve erfolgte schließlich das Ablesen der IgG- bzw. Lactoferrin- Konzentrationen durch die jeweiligen Absorptionswerte.

3.3.2 Bestimmung der IgG- Konzentrationen in Kolostrum und Kolostrumprodukten mittels ELISA

3.3.2.1 Geräte und Material

Bovine IgG ELISA Quantitation Set

Tabelle 7 Bovine IgG ELISA Quantitation Set, Cat. NO. E10-118, Bethyl, USA

• Coating Puffer	SIGMA C3041-50CAP 0,05 M Carbonate-Bicarbonate, pH 9,6 SIGMA Aldrich chemie GmbH, Germany
• Waschlösung	SIGMA T9039-10PAK
• Blockierungslösung	0,05 M Tris buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027M KCl
• Sample/Conjugate Verdünnungslösung	pH 8,0; 0,05% Tween 20 SIGMA Aldrich, Co. USA
• Stopplösung	0,2M Schwefelsäure, Die Stopplösung wird durch Verdünnen der Maßlösung (2 M H ₂ SO ₄ , A2845, AppliChem GmbH, Germany) hergestellt
• Coating AK	Sheep anti-bovine IgG-affinity purified (1mg/mL) Cat. Nr. A10-118A
• HRP-Detektions-AK	Sheep anti-bovine IgG-HRP Konjugat (1 mg/mL) Cat. Nr. A10-118P
• Enzym Substrat:	TMB Peroxidase Substrat & Peroxidase Lösung B; Ein Zweikomponentensystem bestehend aus TMB Peroxidase Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [0,4 g/l] in einer organischen Base, und Peroxidase Lösung B, H ₂ O ₂ (0,02%) in einem Zitronensäurepuffer.
• Standards	Bovine Reference Serum , 24 mg/mL IgG (RS10-103-5)

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

siehe 3.3.1.1

3.3.2.2 Durchführung

siehe 3.3.1.2

3.3.2.3 Auswertung

siehe 3.3.1.3

3.4 Chemische Untersuchungen von Kolostrum und Kolostrumprodukten

3.4.1 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

3.4.1.1 Geräte und Reagenzien

- Analysenwaage: LA 310S-OCE (Max. 310 g, Min. 10 mg, d = 0,1 mg, e = 1 mg), Sartorius AG Göttingen (Germany)
- Aufschlussgerät: BÜCHI 430 Digestor & BÜCHI 412 Scrubber; BÜCHI Laboratoriums-Technik AG (Switzerland)
- Destillationsgerät: BÜCHI 323 Distillation Unit; BÜCHI (Switzerland)
- Titriergerät: Metrohm 775 Dosimat; Metrohm (Switzerland)
- Kjeldahlkolben: BÜCHI Sample tubes, 300 mL 037377; BÜCHI (Switzerland)
- Konzentrierte Schwefelsäure: 95% Schwefelsäure 20685.364 ; VWR International S.A.S (France)
- Natronlauge, ca. 30%: ROTH Natronlauge 32% reinst T197.3; Carl Roth GmbH + Co. KG (Germany)
- Borsäurelösung, ca. 2%, 20 g Borsäure werden in 1000 mL Wasser gelöst: Borsäure gepulvert reinst 1.00162.1000; MERCK (Germany)
- Salzsäure-Maßlösung: ROTH Salzsäure 0,1 N Lösung K024.2: Carl Roth GmbH + Co. KG (Germany)
- Indikator: Mixed indicator acc. To SHER; BÜCHI(Switzerland)
- Katalysator: Kjeldahl-Tabletten Missouri 87b; MERCK (Germany)
- Wasserbad: medingen W22; Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH (Germany)

3.4.1.2 Durchführung

Probenvorbereitung

- Probe (gefrorenes Kolostrum im 50 mL Röhrchen) 20-30 min bei 30°C auftauen
- Je nach zu erwartendem Proteingehalt werden 0,1 bis 4 g gut homogenisierte Probe auf ± 1 mg genau in einem 300 mL Kjeldahl-Kolben eingewogen.

Die Einwaage ist von N-Gehalt der Probe abhängig. Nach Möglichkeit wird die Einwaage so gewählt, dass die gesamte N-Menge der eingewogenen Proben 10 mg nicht unterschreitet. Die Einwaage lässt sich unter Berücksichtigung dieses Kriteriums wie folgt berechnen:

Minimale Einwaage in mg = $1000 / x$

x = Voraussichtlicher N-Gehalt der Probe in %

Für das unverdünnte Rohkolostrum oder Magerkolostrum beträgt der N-Gehalt ca. 1,7%, d.h. die minimale Einwaage der Probe beträgt ca. 0,6 g.

Das Permeat und Konzentrat der Mikrofiltration (Porengröße 0,14 μm) enthält jeweils ca. 0,25 % und 3% Stickstoff; die minimale Einwaage der Probe beträgt daher 4 g bzw. 0,33 g.

- 2 Glaskugeln mit Pinzette zufügen
- Im Heizblock bis zur Trockne eindampfen.

Aufschluss

- 1 Kjeldahltablette ([Missouri] 87b) mit Pinzette zugeben
- Im Abzug 20 mL konz. Schwefelsäure in den Kjeldahlkolben füllen
- Aufschlussapparatur zusammenbauen

Kjeldahlkolben mit Gaswäscher verbinden, mittels Klemme befestigen, eventuelle freie Öffnung von Gaswäscher mit Gummistopfen verstopfen. Gaswäscher [Scrubber] einschalten

- Aufheizen

Stufe 2 für 30 min, dann alle 30 min Leistung stufenweise erhöhen bis Stufe 6.

Wenn sich Feststoffen (schwarze Flecken) auf der Wand befinden, muss der Prozess abgebrochen werden, und diese durch leichtes Schwenken oder Zugabe von Schwefelsäure in die flüssige Phase zurückgeführt werden.

Wenn die Lösung durchsichtig ist, eine grünliche bis bläuliche Färbung hat und keine Gelb- oder Brauntöne bzw. schwarze Teilchen mehr erkennbar sind, weiter erhitzen für 30 min.

Heizblock abdrehen, Kolben im Heizblock abkühlen lassen (um eine zu starke Temperaturveränderung zu vermeiden), danach Kolben aus der Aufschlussapparatur heben, zum Abkühlen im Abzug stehen lassen.

Destillation

Die aufgeschlossenen Proben werden in einem Destillationsgeräte von BÜCHI weiterverarbeitet. Dabei muss das Kühlerrohr der Destillationsapparatur in die Vorlage – ca. 20 mL Borsäure-Indikator-Gemisch – eintauchen.

- Vorratsbehälter kontrollieren, NaOH (30%) und H₂O eventuell nachfüllen, Wasserkühlung aufdrehen , Gerät einschalten.
- Vorheizen mit leerem Kjeldahlkolben und Erlenmeyerkolben “preheating”
- Kolben entleeren, Programm für Waschen einstellen

H₂O 100 mL

NaOH 0 mL

Delay 0 sec

Dist. 3 min

Waschen (“Start”)

- Erlenmeyerkolben für Proben vorbereiten, beschriften
- 20 mL Borsäure (2%) mittels Disperser zugeben
- 3 Tropfen Indikator zugeben (Misch-Indikator nach SHER)
- Kjeldahlkolben (mit Zange!) und Erlenmeyerkolben ins Gerät einspannen
- Programm für Destillation einstellen

H₂O 40 mL

NaOH 60 mL

Delay 0 sec

Dist. 3 min

- Start
- Gerät mit leerem Kolben waschen (Programm für Waschen einstellen)

Titration

- Ein Magnetrührstäbchen mit Pinzette zugeben
- Erlenmeyerkolben auf Magnetrührer stellen
- Hahn [Metrohm] (Titrationsgerät) einschalten
- Mit 0.1 N HCl titrieren bis zum Farbumschlag nach grau

Flussrate (dv/dt) 1-2

grün - blau (Warnbereich) - grau - orange(übertitriert)

- auf „clear“ drücken, dann weitere Probe titrieren
- wenn fertig, auf „fill“ drücken und Gerät ausschalten

3.4.1.3 Berechnung

Es ist der Gesamt-Stickstoffgehalt W_N in g/100g (%) auf 3 Stellen nach dem Komma nach folgender Gleichung zu berechnen:

$$W_N = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 100}{1000 \cdot E} [\%]$$

a= für die Probe verbrauchte mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

b= für den Blindwert verbrauchte mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

1,4 = maßanalytisches Äquivalent von N für 1 mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

E= Einwaage der Probe in g

Aus dem Gesamt-Stickstoffgehalt W_N lässt sich der Proteingehalt W_E in % mit Hilfe des produktspezifischen Faktors 6,38 nach folgender Gleichung berechnen:

$$W_E = W_N \times 6,38 [\%]$$

3.4.2 Bestimmung des Kaseingehaltes

3.4.2.1 Geräte und Reagenzien (zusätzlich zur GN-Bestimmung)

- Messzylinder, 100 mL: Silberbrand ETERNA (Germany)
- Messkolben, 100 mL: NS 14/23; Hirschmann EM Techcolor (Germany)
- Faltenfilter, mittelschnell filtrierend: S&S 595 ^{1/2} Folded Filters (150 mm, 125 mm); Schleicher & Schuell GmbH (Germany)
- Trichter
- Essigsäure, 10%: hergestellt aus Essigsäure 96%; MERCK (Germany)
- Natriumacetatlösung, 1 mol/l: hergestellt aus Natriumacetat wasserfrei (M=82,03 g/mol) 6268.0250; MERCK (Germany)

3.4.2.2 Durchführung

Probeprobereitung

- Probe (gefrorenes Kolostrum im 50 mL Röhrchen) 20-30 min bei 30°C im Wasserbad auftauen
- Wasserbad auf 40°C einstellen, 75 mL RO Wasser (je Probe) in Schottflasche erwärmen

- 10 mL Probe bzw. Blindprobe (10 mL RO Wasser) in einen 100 mL Messkolben mit Pipettierhilfe und steriler Pipette auf Analysenwaage einwiegen, mit 75 mL Wasser (40°C) verdünnen
- 1 mL 10% Essigsäure zugeben, vorsichtig mischen und 10 min stehen lassen.
- 1 mL Natriumacetat (1 mol/l) zupipettieren, mischen und 20 min abkühlen lassen
- Mit RO-Wasser auf 100 mL auffüllen; durch vorsichtiges Stürzen mischen
- Probe durch Glasrichter und Filterpapier (150 oder 125, folded) filtrieren
- Filtrat in Erlenmeyerkolben sammeln
- 50 mL klares Filtrat in den Kjeldahlkolben überführen
- 2 Glaskugeln mit Pinzette zufügen
- Im Heizblock bis zur Trockne eindampfen (Stufenweise 2, ca. 120 min)

Stickstoffbestimmung

Weiters wird der Stickstoff im Filtrat nach der Kjeldahl Methode bestimmt.

3.4.2.3 Berechnung

Es ist der Nicht-Kasein-Stickstoffgehalt (W_{NCN}) in % nach folgender Formel zu berechnen:

$$W_{NCN} = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 2 \cdot 100 \cdot F}{E \cdot 1000} = \frac{(a - b) \cdot 0,28 \cdot F}{E} [\%]$$

a= für die Probe verbrauchte mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

b= für den Blindwert verbrauchte mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

F= Faktor, mit dem das Volumen des Niederschlags berücksichtigt wird. Er beträgt bei Vollmilch 0,994 und bei Magermilch 0,998.

E= Einwaage in g

1,4 = maßanalytisches Äquivalent von N für 1 mL Salzsäure-Maßlösung, 0,1 mol/l

Berechnung des Kaseingehaltes

$$\text{Kaseingehalt} = 6,38 \times (W_N - W_{\text{NCN}}) [\%]$$

3.4.3 Bestimmung der Trockensubstanz

3.4.3.1 Prinzip

Unter der Trockensubstanz eines Lebensmittels wird die Summe aller nicht flüchtigen Bestandteile verstanden. Hierzu gehören im Wesentlichen die Lipide, Kohlenhydrate, Proteine, Mineralstoffe usw.. Die Probe wurde direkt im Trockenschrank bei 102°C bis zur Massenkonstanz getrocknet und der Rückstand durch Differenzwägung ermittelt (Matissek & Steiner, 2005).

3.4.3.2 Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage: LA 310S-OCE (Max. 310 g, Min. 10 mg, d = 0,1 mg, e = 1 mg), Sartorius AG Göttingen (Germany)
- Trockenschrank, 102°C : UT 6060 300°C; Heraeus Instruments (Germany)
- Schalen
- Exsikkator mit Trocknungsmittel: DURAN Vakkum Exsikkator 24 782 66

3.4.3.3 Durchführung

- Die Schale wurde im Trockenschrank bei 102°C für 1 h getrocknet und 15 min in den Exsikkator gestellt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Schale gewogen.
- Etwa 5 g Probe wurden in die Schale gegeben und genau gewogen. Um eine Hautbildung zu vermeiden, wurden 5 Tropfen Ethanol in die Schale gegeben.

- Die Schale wurden mit der Probe mindestens 4 h bei 102°C im Trockenschrank getrocknet, 15 min in den Exsikkator gestellt und dann gewogen.

3.4.3.4 Berechnung

Der Trockenmassegehalt W_T in % wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$W_T = \frac{A \cdot 100}{E} [\%]$$

E= Einwaage der Probe in g

A= Auswaage in g

3.4.4 Aschebestimmung

3.4.4.1 Prinzip

In der vorgetrockneten Probe werden die organischen Substanzen durch Erhitzen zerstört und der Rückstand bei 500 – 550°C geglüht

3.4.4.2 Geräte und Reagenzien

- Quarzschalen
- Tiegelzange
- Analysenwaage: LA 310S-OCE (Max. 310 g, Min. 10 mg, d = 0,1 mg, e = 1 mg), Sartorius AG Göttingen (Germany)
- Exsikkator mit Trocknungsmittel: DURAN Vakkum Exsikkator 24 782 66
- Bunsenbrenner
- Muffelofen, einstellbar auf 550°C: Carbolite, Typ OAF 11/2
- Trockenschrank, 102°C: UT 6060 300°C; Heraeus Instruments (Germany)
- Essigsäure, w= ca. 10%: hergestellt aus Essigsäure 96%; MERCK (Germany)

3.4.4.3 Durchführung

- Die Schalen wurden 1 h bei der Veraschungstemperatur mittels Bunsenbrenner geglüht, im Exsikkator abgekühlt und gewogen.
- Etwa 25 g Probe wurden in die vorbereitete Schale auf der Analysenwaage genau eingewogen, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt (um die Bildung eines Milchhäutchens zu vermeiden) und im Trockenschrank bei ca. 102°C zur Trockne eingedampft.
- Der Trockenrückstand wurde zunächst vorsichtig mittels Bunsenbrenner vorverascht. Danach wurde im Muffelofen bei 550°C solange geglüht, bis die Asche grau-weiß wurde (ca. 3 - 4 h).
- Die Schale wurde im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Das Glühen wurde wiederholt, bis die Gewichtsabnahme zwischen 2 Wägungen nicht mehr als 1 mg beträgt.

3.4.4.4 Berechnung

Der Aschegehalt W_a der Probe in % wird nach folgender Gleichung errechnet:

$$W_a = \frac{A \cdot 100}{E} [\%]$$

E= Einwaage der Probe in g

A= Auswaage in g

3.5 Mikrobielle Untersuchungen in Kolostrum und Kolostrumprodukten

3.5.1 Gesamtkeimzahlbestimmung auf PCA (Plate Count Agar) nach KOCH

3.5.1.1 Geräte und Hilfsmittel

- Heizplatte: IKA RCT basic
- Mikrowellenherd: Sharp R-937

- Autoklav: CertoClav Tisch Autoclav CV-EL 10 L O; CertoClav Sterilizer GmbH (Austria)
- pH-Meßgerät: Metrohm 691 pH Meter; Metrohm (Switzerland)
- Wasserbad: medingen W22; Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH (Germany)
- Brutschrank 30°C : BINDER BD 53; Binder (Germany)
- Dispenser, Epruvette, Flaschen für Nährböden
- Petrischalen
- Pipetten
- Quantifizierungsgerät: Stuart Colony Counter SC6
- K₂HPO₄: *di*-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei 1.05104.1000; MERCK (Germany)

3.5.1.2 Nährboden

Nährboden: Kaseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar

(Plate-Count-Agar, Art.-Nr. X930.1; ROTH Germany) mit Magermilchzusatz

Zusammensetzung:

- 5,0 g Pepton von Kasein
- 2,5 g Hefeextrakt
- 1,0 g D(+) Glucose
- 14,0 g Agar-Agar
- 1.0 g Magermilchpulver
- 1000 mL Wasser

Nährboden herstellen

22,5 g PCA-Agar und 1 g (= 0,1%) Magermilchpulver wurden eingewogen, in 1 L destillierten Wasser suspendiert, gut gemischt und unter Rühren (mit Magnetrührer) erhitzt. Das Medium sollte vollständig gelöst sein. Das Medium wurde in mit

Gewindedeckel verschließbare Flaschen abfüllt und 15 min bei 121°C autoklaviert. Das fertige Nährmedium wurde bei 4°C aufbewahrt.

Der Nährboden wurde vor Beginn der Untersuchung vollständig mittels Mikrowelle aufgeschmolzen und anschließend im Wasserbad auf etwa 50°C temperiert. (Der geschmolzene, auf etwa 50°C temperierte Nährboden soll innerhalb 1 h verarbeitet werden).

3.5.1.3 Verdünnungslösung

K₂HPO₄ [20 g/l], pH-Wert 8,4.

20 g K₂HPO₄ wurden in 1 L destilliertes Wasser gegeben. Die Verdünnungslösung wurde dann mit 10% CH₃COOH oder 1N NaOH auf pH = 8,4 eingestellt. In jede Epruvette wurden mittels Dispenser 9 mL Verdünnungslösung überführt. Die Epruvetten wurden mit Kappen verschlossen und 15 min bei 121°C, 1 bar Wasserdampfüberdruck sterilisiert, dann bei 4°C abgekühlt. Die Verdünnungslösung wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur temperiert.

3.5.1.4 Probenvorbereitung

- Probe auftauen.

Gefrorenes Kolostrum wurde bei 30°C im Wasserbad für 20-30 min aufgetaut. Die Probennahme ist eine Momentaufnahme, d.h. nach wenigen Stunden ergibt die Probe nicht mehr dasselbe Ergebnis. Somit ist es sehr wichtig, dass die Proben nach dem Auftauen sofort mikrobiologisch untersucht werden.

- Anlegen der Dezimalverdünnungen

Nach kurzem Durchmischen wurde aus der unverdünnten Probe 1 mL entnommen und zu jeweils 9 mL Verdünnungslösung pipettiert. Nach Durchmischen mittels Vortex-Gerät wurden weitere Dezimalverdünnungen angelegt. Die Verdünnung richtet sich nach der zu erwartenden Keimzahl. Für jede Verdünnungsstufe wurde eine frische Pipettenspitze verwendet.

- Vorbereiten und Beschriften der Petrischalen

Bei allen Keimzählungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Beschriftung der Platten wurde auf der Unterseite vorgenommen, z.B. „5/3/1“ für die Probe 5, Verdünnung 10^{-3} und erste Bestimmung.

3.5.1.5 Beimpfung

Beimpfung nach Gussverfahren (Keimzahlbestimmung nach KOCH)

Es wurden in je 2 Petrischalen jeweils 1 mL Probe bzw. 1 mL der entsprechenden Verdünnungen pipettiert. Anschließend wurden 15 – 20 mL des geschmolzenen und im Wasserbad auf etwa 50°C temperierten Nährbodens in die Petrischale gegossen und mit der Probe bzw. den Verdünnungen gleichmäßig vermischt. Eine gleichmäßige Durchmischung kann erzielt werden, wenn die Schale vorsichtig in Achterschleifen bewegt wird. Die Petrischalen wurden ca. 20 min stehen gelassen, bis der Nährboden verfestigt war.

3.5.1.6 Bebrütung

Die Petrischalen wurden mit dem Deckel nach unten bei 30°C , 48 h in den Brutschrank gestellt.

3.5.1.7 Auswertung

- Zählen der Kolonien

Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle sichtbaren Kolonien auf den zur Berechnung der Keimzahl heranzuziehenden Petrischalen (10-300 KbE/Platte) mittels Koloniezählgerät gezählt, wobei jede Kolonie mit einem Farbstift zu markieren ist. Laufkolonien wurden als eine Kolonie gewertet.

- Berechnung der Keimzahl

Aus der Koloniezahl der auswertbaren Verdünnungsstufen wurde das gewogene arithmetische Mittel errechnet. Die Anzahl der Mikroorganismen pro mL wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

- \bar{c} gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen
- $\sum c$ Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- n_1 Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n_2 Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe
- d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

Wurden auf den Petrischalen nur Koloniezahlen unter 10 gefunden, wurde die Keimzahl mit „weniger als $10 \times d$ “ angegeben.

3.5.2 Bestimmung der Enterobacteriaceae auf VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar nach MOSSEL

3.5.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Außer den unter 3.5.1.1 aufgeführten Geräten wurde benötigt:

Brutschrank, 37°C ; BINDER BD 53; Binder (Germany)

3.5.2.2 Nährboden

Nährboden: Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD-Agar)

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL für die Mikrobiologie

1.10275.0500; Merck KGaA (Germany)

Zusammensetzung:

- 7,0 g Pepton von Kasein
- 3,0 g Hefeextrakt
- 5,0 g Natriumchlorid

- 10,0 g D(+) Glucose
- 1,5 g Gallensalzmischung
- 0,03 g Neutralrot
- 0,002 g Kristallviolett
- 13,0 g Agar-Agar
- 1000 mL Wasser

Nährboden herstellen

39,5 g in 1 L dest. Wasser unter regelmäßigem Umschwenken auf der Heizplatte kurz erwärmen, bis das Nährmedium vollständig gelöst ist. Das Nährmedium soll erst kurz vor der Verwendung zubereitet werden. Er darf nicht autoklaviert und überhitzt werden. Der gebrauchsfertig zubereitete Nährboden ist klar und dunkelrot.

3.5.2.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung

Vorbereitung der Probe, Herstellen der Verdünnungen und Beimpfen (Gussverfahren) erfolgen nach 3.5.1.3 - 3.5.1.5. Die Petrischalen wurden jeweils mit 15 mL des vorher bereiteten, auf etwa 48°C abgekühlten VRBD-Agars gefüllt. Nach Erstarren des Agars wurden weitere 10 mL des flüssigen VRBD-Agars zur Überschichtung zugegeben.

3.5.2.4 Bebrütung

Die Petrischalen wurden im Brutschrank mit dem Deckel nach unten für 18 h bei 37°C bebrütet.

3.5.2.5 Auswertung

Nach der Bebrütung wurden die typischen Kolonien (rot, eventuell mit Präzipitationshof) gezählt. Farblose Kolonien wurden nicht gezählt. Berechnung erfolgt nach 3.5.1.7

3.5.3 Bestimmung der Gesamt-Lactobacillen auf MRS (de Man, Rogosa und Sharpe) Agar

3.5.3.1 Geräte und Hilfsmittel

Außer den unter 3.5.1.1 aufgeführten Geräten wurde benötigt:

Brutschrank, 37°C; BINDER BD 53; Binder (Germany)

3.5.3.2 Nährboden

Nährboden: deMan, Rogosa und Sharpe-Agar (MRS)

Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE, 1.10660.0500; Merck KGaA (Germany)

Zusammensetzung:

- 10,0 g Pepton von Kasein
- 4,0 g Hefeextrakt
- 1,0 g Tween 80
- 5,0 g Natriumacetat
- 0,2 g Magnesiumsulfat
- 10,0 g Fleischextrakt
- 20,0 g D(+) Glucose
- 2,0 g Diammoniumhydrogencitrat
- 0,04 g Mangansulfat
- 14,0 g Agar-Agar
- 1000 mL Wasser

Nährboden herstellen

68,2 g des Mediums wurden in 1 L dest. Wasser suspendiert, gut gemischt und bis zum Kochen erhitzt, um das Medium vollständig zu lösen. Die Lösung wurden in mit Gewindedeckel verschließbare Flaschen abfüllt und 15 min bei 121°C autoklaviert.

3.5.3.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung

Vorbereitung der Probe, Herstellen der Verdünnungen und Beimpfen (Gussverfahren) erfolgen nach 3.5.1.3 - 3.5.1.5. Die Petrischalen werden jeweils mit 10-15 mL des vorher bereiteten, auf etwa 50°C abgekühlten MRS-Agars gefüllt.

3.5.3.4 Bebrütung

Die Petrischalen wurden im Brutschrank mit dem Deckel nach unten für 24 h bei 37°C bebrütet.

3.5.3.5 Auswertung

Auszählung und Berechnung erfolgen nach 3.5.1.7

3.5.4 Bestimmung von Bacillen (Endosporen) auf CASO Agar

3.5.4.1 Geräte und Hilfsmittel

Zusätzlich zu den in 3.5.1.1 aufgeführten Geräten wird benötigt: Wasserbad 80°C

3.5.4.2 Nährboden

Nährboden: Kasein- Soja- Pepton- Agar (CASO)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar für die Mikrobiologie, 1.05458.0500; Merck KGaA (Germany)

Zusammensetzung

- 15,0 g Pepton von Kasein
- 5,0 g Pepton von Sojamehl
- 5,0 g Natriumchlorid
- 5,0 g Polysorbat 80
- 0,7 g Lecithin

- 15,0 g Agar-Agar
- 1000 mL dest. Wasser

Nährboden herstellen

40,0 g des Mediums wurden in 1 L dest. Wasser suspendiert, gut gemischt und bis zum Kochen erhitzt, um das Medium vollständig zu lösen. Die Lösung wurden in mit Gewindedeckel verschließbare Flaschen abfüllt und 15 min bei 121°C autoklaviert.

3.5.4.3 Probevorbereitung, Verdünnung und Beimpfung

Vorbereitung der Probe, Herstellen der Verdünnungen und Beimpfen (Gussverfahren) erfolgen nach 3.5.1.3 - 3.5.1.5.

Die Probe bzw. Verdünnungen wurden 10 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt, um vegetative Keime abzutöten. (Das Niveau des Wasserspiegels soll wenigstens 4 cm über dem der Milch liegen.) Aus diesen Röhrchen wurde jeweils 1 mL in Petrischalen pipettiert, mit CASO-Agar vermischt und 48 h bei 37°C aerob bebrütet. Die Kolonien wurden gezählt und auf die Anzahl koloniebildender Sporen je mL der Probe umgerechnet.

3.5.4.4 Bebrütung

Die Platten werden 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.5.4.5 Auswertung

Auszählung und Berechnung erfolgt nach 3.5.1.7

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von Rohkolostrum und Vergleich mit Rohmilch

4.1.1 Zusammensetzung der untersuchten Rohkolostrumproben

12 Kolostrumproben wurden analysiert, 1 Milchproben wurde mitanalysiert und dient nur zur Referenz. Die mittlere Zusammensetzung von Kuhkolostrum ist in nachfolgender Abbildung aufgezeigt (siehe Abbildung 9). Die untersuchten Rohkolostrumproben besteht zu etwa vier Fünftel aus Wasser und zu einem Fünftel aus Trockensubstanz. Die Trockensubstanz besteht hauptsächlich aus Protein (55%) und Fett (20%). Kohlenhydrate, Mineralstoffe und andere Stoffe haben einen Trockensubstanz-Gehalt von etwa 25%.

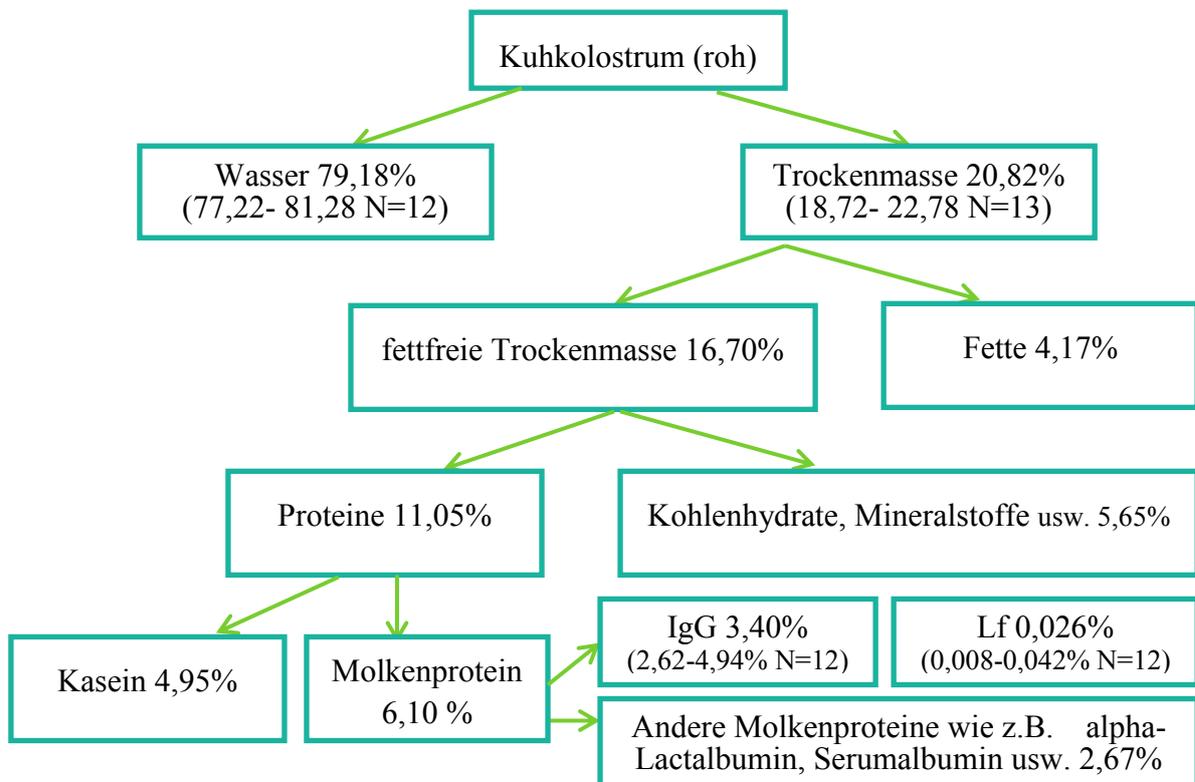


Abbildung 9 Mittlere Zusammensetzung von Kuhkolostrum (w/w %) und Schwankungsbereichen

4.1.2 Charakterisierung von Rohkolostrum und Rohmilch

Neben Gesamtproteingehalt, Kaseingehalt, IgG-Gehalt und LF-Gehalt wurden auch Keimzahl, Trockenmasse und pH-Wert von Rohkolostrumproben und Rohmilchproben gemessen, um Eigenschaften des Rohkolostrums zu charakterisieren und mit Rohmilch zu vergleichen.

Tabelle 8 Charakteristik von Kuh-Kolostrum (roh) und Kuhmilch (roh)

Messwert	Kuh-Kolostrum (roh)					Kuhmilch(roh)
	Min	Max	MW	StdAb	N	N=1
pH-Wert	6,15	6,37	6,27	0,08	12	6,70
TS [%]	18,72	22,78	20,82	1,21	12	12,90
Ges. Protein [%]	9,76	12,04	11,05	0,72	10	3,50
Kasein [%]	4,24	5,39	4,95	0,34	10	2,71
IgG [mg/g]	26,18	49,38	34,02	6,65	12	0,47
LF [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	83,10	424,74	263,60	82,31	12	174,44
GKZ [KbE/mL]	6,2 E6	2,0 E7	1,3 E7	5,2 E6	6	1,86 E4

Die Variationen des Gehalts an verschiedenen Bestandteilen im Rohkolostrum sind in Tabelle 8 dargestellt. Der pH-Wert schwankt leicht von 6,15 bis 6,37 um einen Mittelwert von 6,26. Der Trockensubstanzgehalt beträgt $20,82\% \pm 1,21\%$. Der Proteingehalt von Rohkolostrum schwankt nicht sehr stark von 9,76% bis 12,04% für Gesamtprotein bzw. von 4,24% bis 5,39% für Kasein. Die zu untersuchenden Proben enthalten durchschnittlich 11,05% Protein, der Anteil des Kaseins am Gesamtprotein macht etwa 45% aus, d.h. bei Rohkolostrum ergibt sich ein Verhältnis zwischen Molkenprotein und Kasein von 1,2 : 1. Die Immunglobulin G und Lactoferrin Konzentrationen variieren stärker im Vergleich zu anderen Bestandteilen. Der Mittelwert für IgG der 12 Rohkolostrumproben beträgt 34,02 mg/mL und die Standardabweichung beträgt 6,65 mg/mL. Der Mittelwert von LF liegt im Bereich von 263,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und die Standardabweichung beträgt 82,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Der Keimgehalt von

Rohkolostrum wurde aus 6 Proben ermittelt, der Mittelwert liegt bei ca. $1,3 \times 10^7$ KbE/mL.

Weiters werden die Messwerte als Histogramme dargestellt (Abbildung 10). Somit kann man erkennen, ob die Daten normalverteilt sind. Wie man in Abbildung 10 gut sehen kann, ist die Verteilung der Daten nahezu symmetrisch und durch eine Normalverteilung beschreibbar.

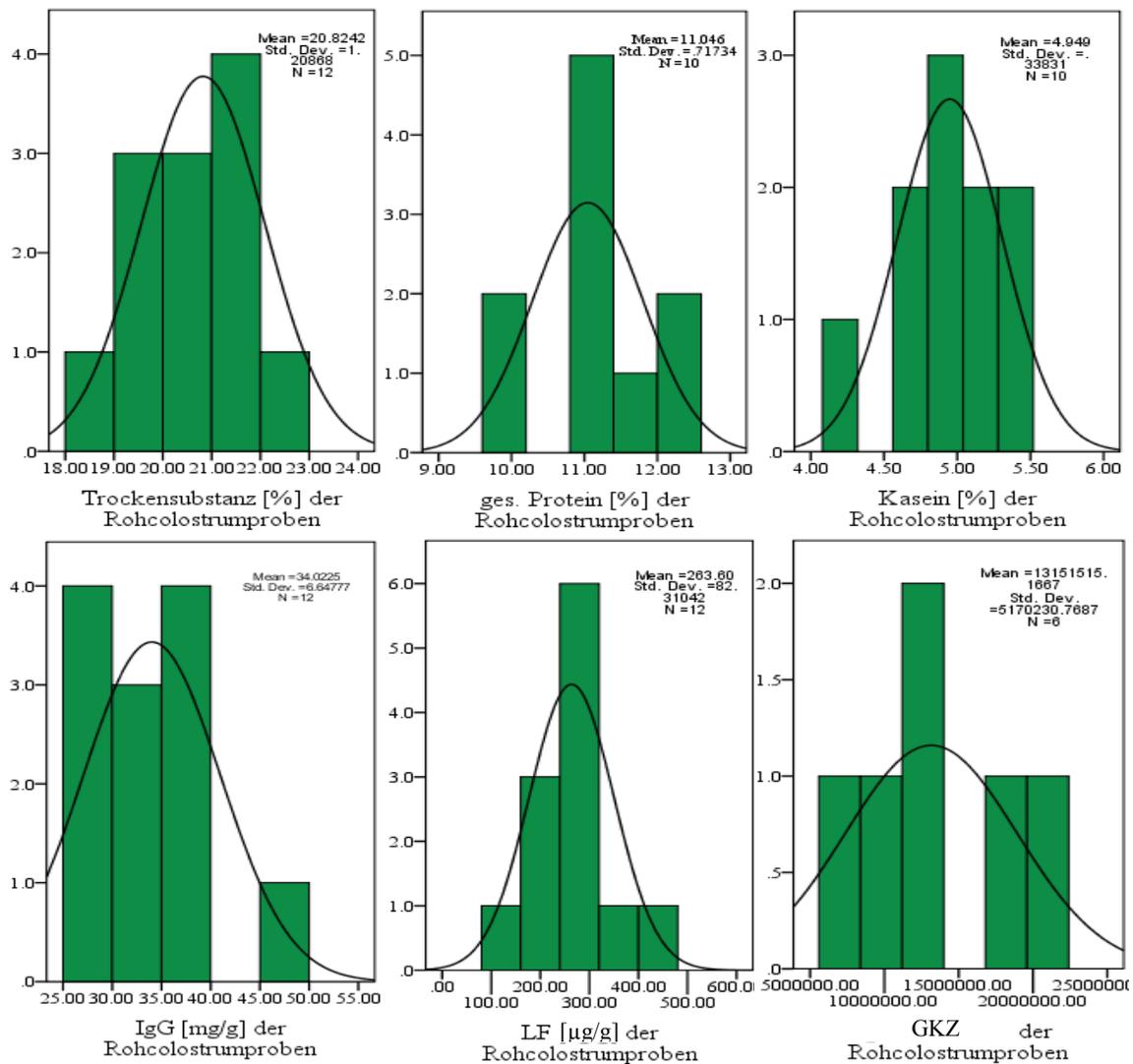


Abbildung 10 Histogramm mit Normalverteilungskurve: Die Variabilität des Gehalts an Trockensubstanz, Gesamtprotein, Kasein, Immunglobulin G, Lactoferrin und GKZ im Rohkolostrum

4.1.3 Vergleich zwischen Rohkolostrum und Rohmilch

Der Vergleich zwischen Rohkolostrum und Rohmilch wurde in Abbildung 11 wiedergegeben. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Rohkolostrum ist dickflüssig, hat eine gelbe Farbe. Im Gegensatz zum Rohkolostrum ist die Rohmilch flüssiger und weißer.
- Der durchschnittliche pH-Wert von Rohkolostrum liegt bei etwa 6,27 und ist statistisch signifikant niedriger als der pH-Wert von Rohmilch 6,70. ($t(7) = -9,313$, $P = 0,000$, $\alpha = 0,05$)
- Rohkolostrum besitzt einen statistisch signifikant höheren (doppelt so hohen) Trockensubstanzanteil ($t(11) = 6,299$, $P = 0,000$, $\alpha = 0,05$), wodurch sich sein im Vergleich zur Rohmilch dickflüssigeres Aussehen erklären lässt.
- Im Allgemeinen wird Rohkolostrum im Vergleich mit Rohmilch durch einen deutlich höheren Proteingehalt charakterisiert. Der Gehalt an Gesamtprotein der Rohkolostrumproben schwankt von 9,76% bis 12,04%, deren Mittelwert beträgt 11,05% und ist im Vergleich zur Rohmilch statistisch signifikant höher ($t(9) = 10,030$, $P = 0,000$, $\alpha = 0,05$). Außer der quantitativen sind auch qualitative Unterschiede der Proteine zwischen den beiden Milchtypen vorhanden. Der durchschnittliche Kaseingehalt des Rohkolostrums beträgt 4,95%, dessen Anteil am Gesamtprotein beträgt ca. 44,80%. Im Gegensatz dazu macht der Kasein-Anteil am Gesamtprotein der Rohmilch etwa 78% aus.
- Der IgG-Gehalt von Rohkolostrum (34,02 mg/g) ist statistisch signifikant höher als der von Rohmilch (0,47 mg/g) ($t(11) = 4,849$, $P = 0,001$, $\alpha = 0,05$).
- Rohmilch kann einen hohen Gehalt an Lactoferrin aufweisen, der jenen im Rohkolostrum enthaltenen Mengen entspricht. Der unabhängige t-Test kann keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert von

Lactoferrin des Rohkolostrums (263,60 $\mu\text{g/g}$) und der Rohmilch (174,44 $\mu\text{g/g}$) nachweisen, ($t(11) = 1,041$, $P = 0,320$, $\alpha = 0,05$).

- Im Rohkolostrum befindet sich mit $1,31 \times 10^7$ ein höherer Gehalt an koloniebildenden Einheiten; der Gehalt in der Rohmilch liegt bei $1,86 \times 10^4$. Allerdings kann der t-Test auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied nachweisen, da die Schwankung der Keimzahl im Rohkolostrum zu stark ist ($t(5) = 2,352$, $P = 0,065$, $\alpha = 0,05$).

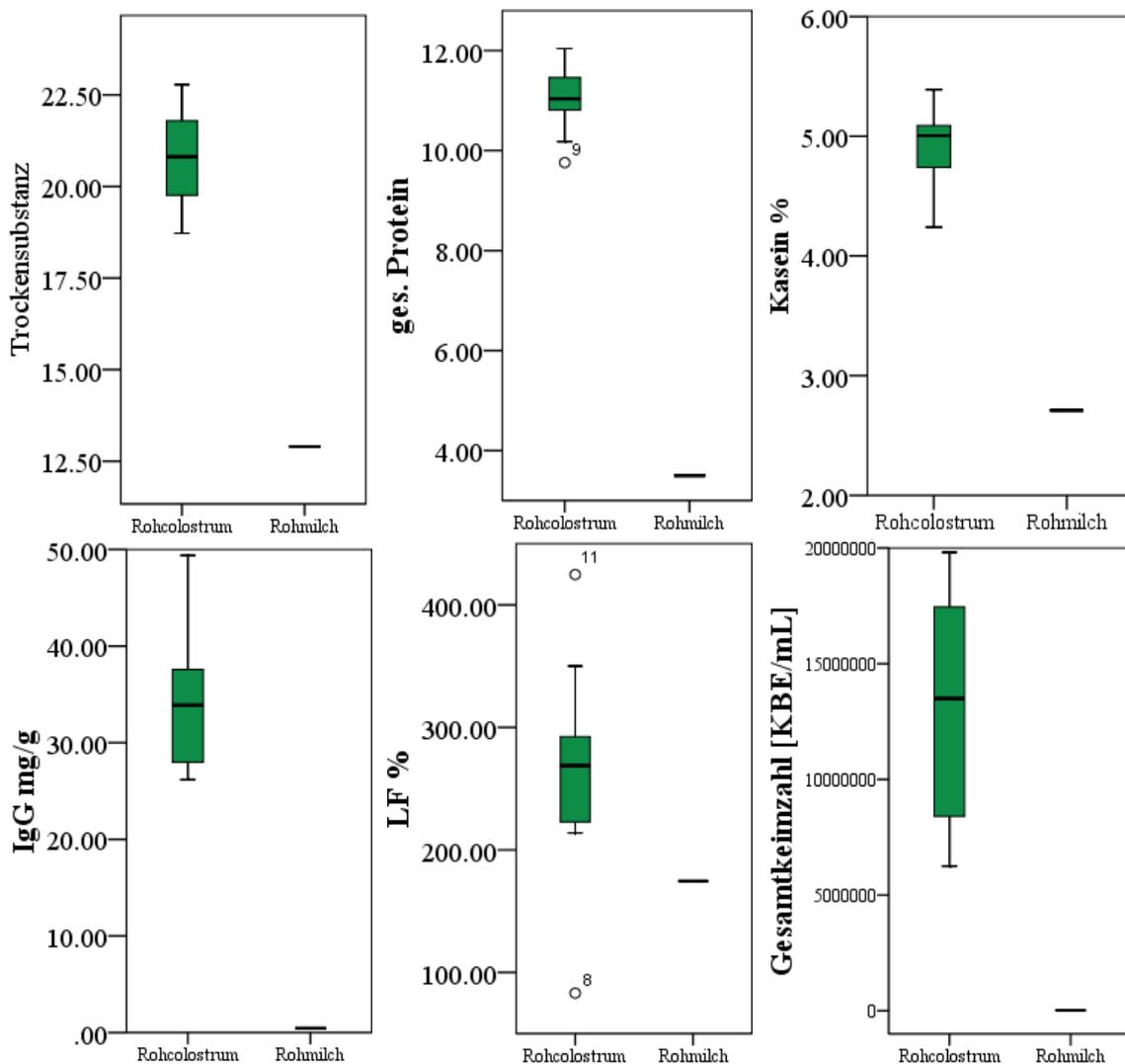


Abbildung 11 Vergleich der relevanten Eigenschaften von Rohkolostrum und Rohmilch

4.2 Wahl der geeigneten Membran hinsichtlich der Entkeimungsfähigkeit

Rohkolostrumproben wurden durch Mikro-Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen (1,4 µm, 0,8 µm, 0,2 µm und 0,14 µm) bei 30°C unter 0,7 bar filtriert, um Keime abzutrennen und gleichzeitig Kasein zu entfernen. Zusätzlich wurde eine Rohkolostrumprobe durch 0,14 µm Membran (3,5mm Kanalweite) bei 30°C unter 1,2 bar filtriert. Tabelle 9 zeigt die Entkeimungsfähigkeit der verschiedenen Membranen. Die Wirksamkeit der Keimreduktion wird in log-Stufen angegeben.

Tabelle 9 Entkeimung durch verschiedene Mikro-Membrane

Ges. Keimzahl [KbE/mL]	1,4 µm 0,7 bar	0,8 µm 0,7 bar	0,2 µm 0,7 bar	0,14 µm 0,7 bar	0,14µm 3,5mm 1,2 bar
Rohkolostrum	8,4 E6	1,7 E7	1,4 E7	1,3 E7	6,3 E6
Magerkolostrum	1,7 E7	2,6 E7	9,4 E6	1,1 E7	5,4 E6
MF Permeat	4,5 E3	< 100	< 100	< 100	105
MF Konzentrat	6,9 E7	> 3 E8	1,2 E9	9,3 E8	6,3 E7
Keimreduktion in log-Stufen (RF _{log})	3,6	5,4	5,0	5,0	4,7

Der logarithmische Keimreduktionsfaktor (RF_{log}) lässt sich wie folgt berechnen:

$$RF_{\log} = \log (\text{Anfangskeimzahl im Magerkolostrum}) - \log (\text{Endkeimzahl im MF-Permeat})$$

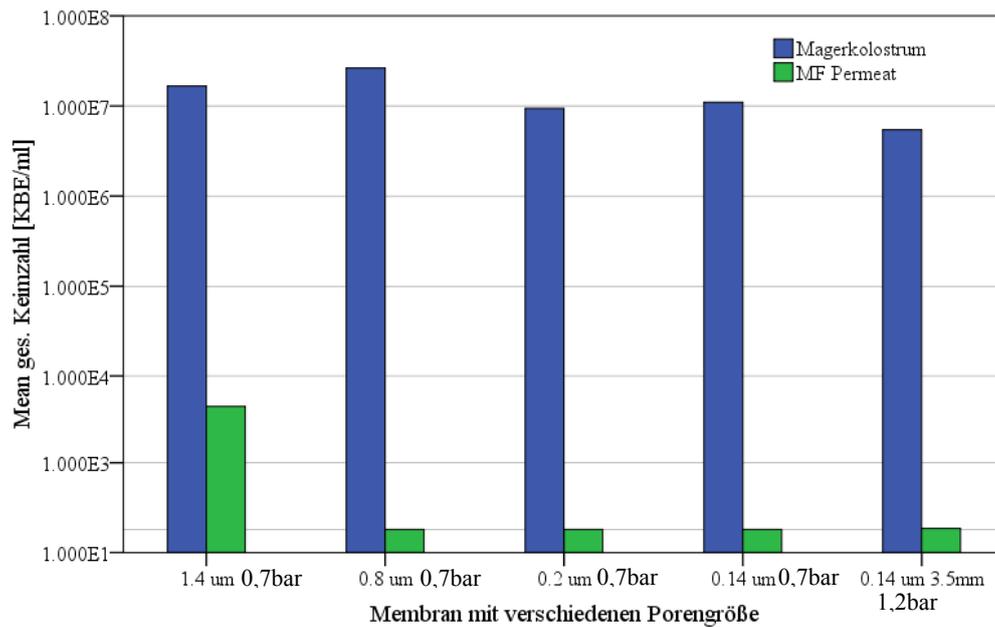


Abbildung 12 Graphische Darstellung der Entkeimungswirkung von verschiedenen Mikro-Membranen

Wie man in Abbildung 12 gut sehen kann, befindet sich ein hoher Gehalt an Mikroorganismen im Magerkolostrum. Die Membranen, welche eine Porengröße kleiner als 1 µm haben, besitzen bessere Entkeimungsfähigkeit, und die meisten Keime werden durch die Filtration zurückgehalten. Die Keimzahl im entsprechenden Permeat beträgt jeweils weniger als 100 KbE/mL.

4.3 Wahl der geeigneten Membran hinsichtlich der Entkaseinierungsfähigkeit

Die Fähigkeit, Kasein aus Magerkolostrum bzw. Magermilch zu entfernen, steigt mit der Verringerung der Porengröße der Mikro-Membran dramatisch an (siehe Abbildung 13). Mit einer 1,4 µm Membran werden 50,52% Kasein zurückgehalten. Membranen mit Porengrößen kleiner als 0,2 µm können einen Entkaseinierungseffekt von ca. 99,9% erreichen und sind damit für die Entkaseinierung besonders geeignet.

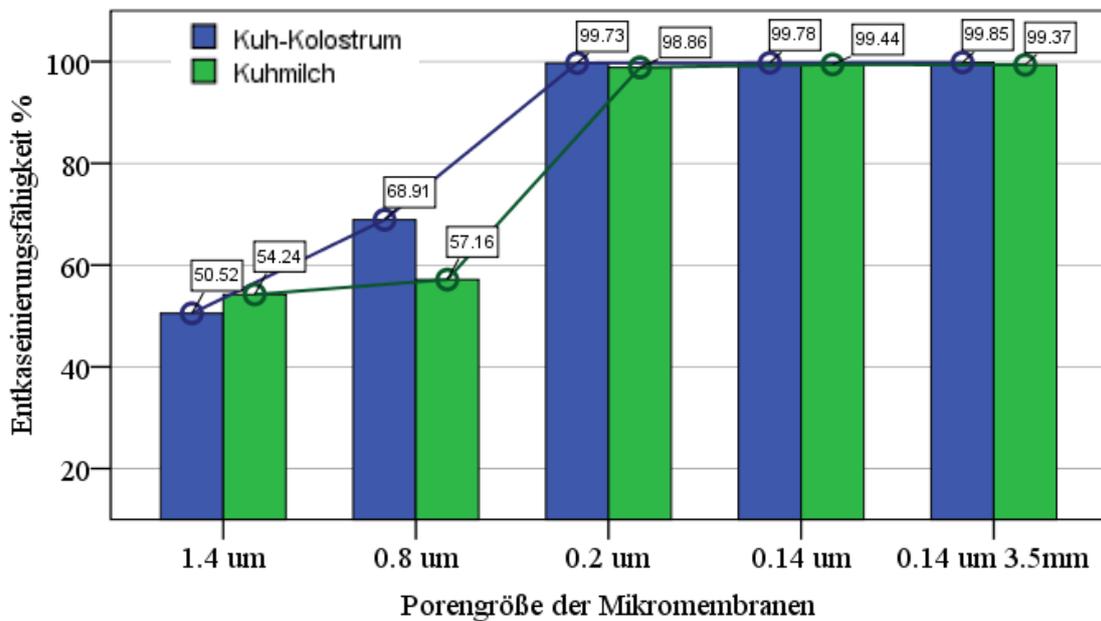


Abbildung 13 Entkaseinierungsfähigkeit von verschiedenen Mikro-Membranen

4.4 Vergleich der Ausbeute an TS, Ges. Protein, IgG und LF durch Mikrofiltration mit verschiedenen Membranen

Anhand der Tabelle 10 erkennt man, dass bei Porengrößen von 0,14 µm nur wenig IgG bzw. LF im Permeat bleiben (92,01% IgG und 90,70% LF werden gleichzeitig mit Kasein durch die Membran im Konzentrat zurückgehalten).

Die Messdaten werden auch grafisch dargestellt. Wie in der Abbildung 14 gezeigt sinken die Ausbeuten an Trockensubstanz und Protein (inklusive Ges. Protein, IgG und LF) im Kolostrum-Permeat bei Abnahme der Porengrößen der Membranen von 1,4 µm bis 0,2 µm schnell ab; danach erhöht sich die Ausbeute leicht (z.B beträgt die Ausbeute an TS jeweils 50,01% und 15,93% bei Porengröße von 1,4 µm und 0,2 µm, und steigt bei Porengröße von 0,14 µm auf 17,91%).

Bei Kuhmilch wurden die gleichen Versuche wie bei Kuh-Kolostrum durchgeführt. Milchproben wurden durch Mikromembranen verschiedener Porengrößen (von 1,4 µm bis 0,14 µm) filtriert. Die Konzentrationen der relevanten Bestandteile im Permeat

wurden gemessen, um die Ausbeute zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

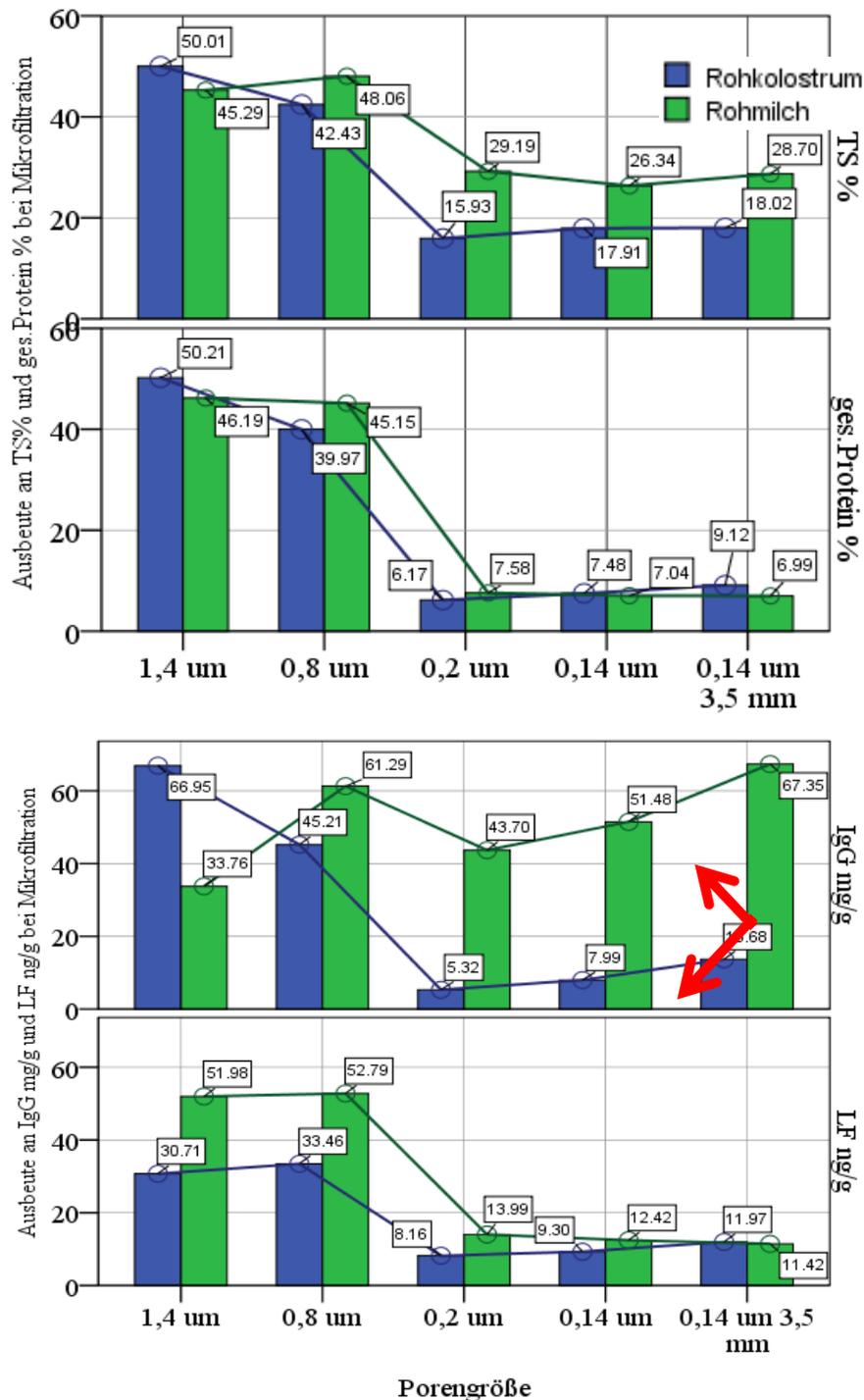


Abbildung 14 Einfluss von unterschiedlichen Porengrößen auf die Ausbeute an TS, Ges. Protein, IgG und LF im Kuhkolostrum und Kuhmilch bei Mikrofiltration (30°C, 0,7 bar)

Die Ausbeute an entsprechenden Bestandteilen in Milchproben ist mit denen im Kolostrum vergleichbar. Bei Porengrößen von 0,14 µm bleiben 26,34% TS, 7,04% Ges.-Protein und 12,42% LF im Permeat. Eine Ausnahme besteht bei IgG: mit einer Porengröße von 0,14 µm werden weniger Milch-IgG (48,52%) als Kolostrum-IgG (92,01%) von der Mikromembran zurückgehalten.

Tabelle 10 Überblick über den Einfluss der Membran-Porengröße auf die Rückhaltung von Mikroorganismen und Kasein, die Permeabilität von IgG, LF und Ges. Molkenprotein bei Mikrofiltration der unverdünnten Magerkolostrumproben

Porengröße	Rückhaltung		Permeabilität			N
	MO im Permeat	Kasein	IgG	LF	Ges.Molkenprotein	
1,4 µm	4500 KbE/mL	50,52%	66,95%	30,71%	50,79%	1
0,8 µm	< 100 KbE/mL	68,91%	45,21%	33,46%	47,16%	1
0,2 µm	< 100 KbE/mL	99,73%	5,32%	8,16%	10,97%	1
0,14 µm	< 100 KbE/mL	99,78%	7,99%	9,30%	13,13%	1
0,14 µm 3.5mm	105 KbE/mL	99,85%	13,68%	11,97%	16,38%	1

Feed-Lösung (Magerkolostrum) Verdünnung : unverdünnt

Operationstemperatur: 30°C , Transmembrandruck: 0,7 bar (bei 0,14 µm 3,5 mm 1,2 bar)

4.5 Einfluss der Verdünnung der Magerkolostrumproben vor Mikrofiltration

Nach dem Entfetten wurden die Magerkolostrumproben mit Salzlösung (KCl 0,03 mol/L, NaCl 0,02 mol/L) 1:2 und 1:7,5 verdünnt. Das unverdünnte Magerkolostrum wurde genauso wie verdünntes Magerkolostrum durch eine 0,14 µm Membran unter 0,7 bar, bei 30°C und einer Durchflussrate von 4,0 m/s filtriert. Die Ausbeute an Wirkstoffen und die Entkaseinierungsfähigkeit wurden ermittelt und miteinander verglichen.

Tabelle 11 Ausbeute an IgG und LF im Kuh-Kolostrum nach Mikrofiltration bei unterschiedlichen Verdünnung der Magerkolostrumproben

Feed-Lösung Verdünnung	IgG Permeabilität	LF Permeabilität	N
Gruppe 1: Magerkolostrum 1:1	7,99%	9,30%	1
Gruppe 2: Magerkolostrum 1:2	7,49%	3,83%	2
Gruppe 3: Magerkolostrum 1:7,5	59,71%	14,43%	4

Wie in Tabelle 11 dargestellt, beträgt die Ausbeute an IgG bei Mikrofiltration (0,14 µm, 30°C, 0,7 bar) 7,99%, wenn das Magerkolostrum unverdünnt ist. Wird Magerkolostrum vor der Mikrofiltration zuerst 1:2 verdünnt, bleibt die Ausbeute an IgG fast gleich (MW=7,49% StdAb=1,07%) ($t(1)=0,380$ $p=0,769$ $\alpha=0,05$). Die Ausbeute an IgG wird bei der Mikrofiltration jedoch wesentlich erhöht (MW=59,71% StdAb=2,61%), wenn das Magerkolostrum vor der Filtration 1:7,5 verdünnt wird.

Wird das Magerkolostrum vor der Filtration 1:2 verdünnt und anschließend mit einer Mikro-Membran filtriert, beträgt die Ausbeute an LF 3,83%. Sie ist statistisch signifikant niedriger ($t(1)=28,710$ $p=0,022$ $\alpha=0,05$) im Vergleich mit der Ausbeute, wenn das Magerkolostrum vor der Mikrofiltration unverdünnt ist.

Wenn Magerkolostrum höher verdünnt wird (1:7,5), bleibt 14,73% LF im Permeat, allerdings gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 ($t(3)=-1,156$ $p=0,331$ $\alpha=0,05$). Die folgende Abbildung 15 veranschaulicht den Einfluss der Verdünnung von Magerkolostrum auf die Ausbeute an IgG und LF im Kuh-Kolostrum bei Mikrofiltration.

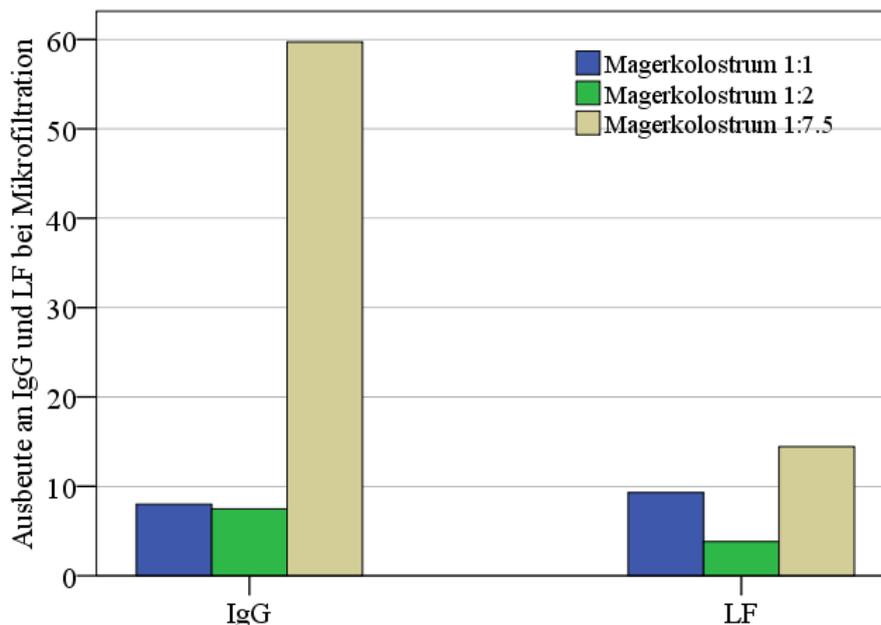


Abbildung 15 Einfluss der Verdünnung von Magerkolostrum auf die Ausbeute an IgG und LF im Kuh-Kolostrum bei Mikrofiltration

4.6 Operationstemperatur bei Mikrofiltration

Weitergehend wurde das Magerkolostrum 1:7,5 verdünnt und mit einer 0,14 µm Mikro-Membran unter 0,7 bar bei einer Durchflussrate von 4.0 m/s bei verschiedenen Temperaturen filtriert. Wie man in Tabelle 12 sehen kann, wurden die Magerkolostrumproben in 3 Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1: Filtration bei 14°C ; Gruppe 2: Filtration bei 30°C ; Gruppe 3: Filtration bei 40°C .

Tabelle 12 IgG- bzw. LF-Permeabilität bei Mikrofiltration bei unterschiedlicher Temperatur

Operationstemperatur	IgG Permeabilität	LF Permeabilität	N
Gruppe 1: 14°C	44,96 %	11,13%	1
Gruppe 2: 30°C	59,71 %	14,43%	4
Gruppe 3: 40°C	81,16 %	18,02%	1

Porengröße: 0,14 µm, Transmembrandruck 0,7 bar, Feed-Lösung Verdünnung: 1:7,5

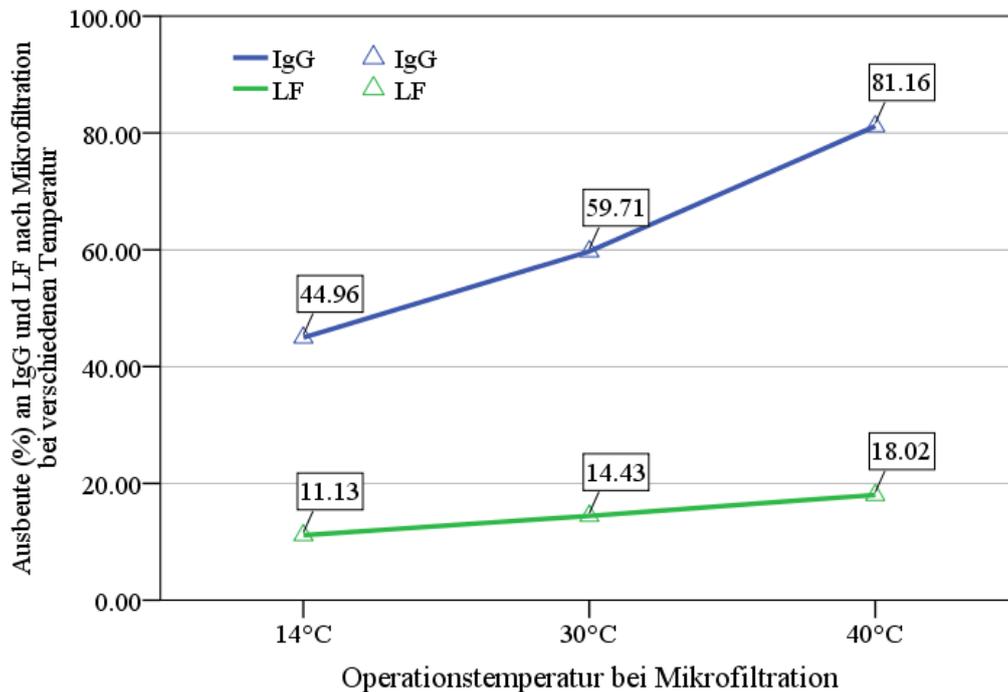


Abbildung 16 Einfluss der Operationstemperatur auf die Ausbeute an IgG und LF bei Mikrofiltration.

Wenn die restlichen Bedingungen konstant bleiben, steigt die Ausbeute an IgG bzw. LF bei Erhöhung der Operationstemperatur der Mikrofiltration von 44,96% auf 81,16% bzw. von 11,13% auf 18,02% (siehe Abbildung 16). Die Kurve bei IgG ist steiler als die bei LF, d.h. die Ausbeute an IgG im Vergleich mit LF ist „temperatursensitiver“.

4.7 Nanofiltration zur Aufreinigung der biologisch aktiven Fraktionen

Das Mikrofiltrations-Permeat wurde gesammelt und anschließend mit einer Nanomembran filtriert. Bei diesem Schritt wurden 2 Filtrationsmodelle verwendet: (1) direkte Nanofiltration unter 4,7 bar, bei 30°C mit einer 0,9 nm Membran; und (2) Diafiltration bei verschiedenen Operationstemperaturen mit unterschiedlichen Wassergehalt.

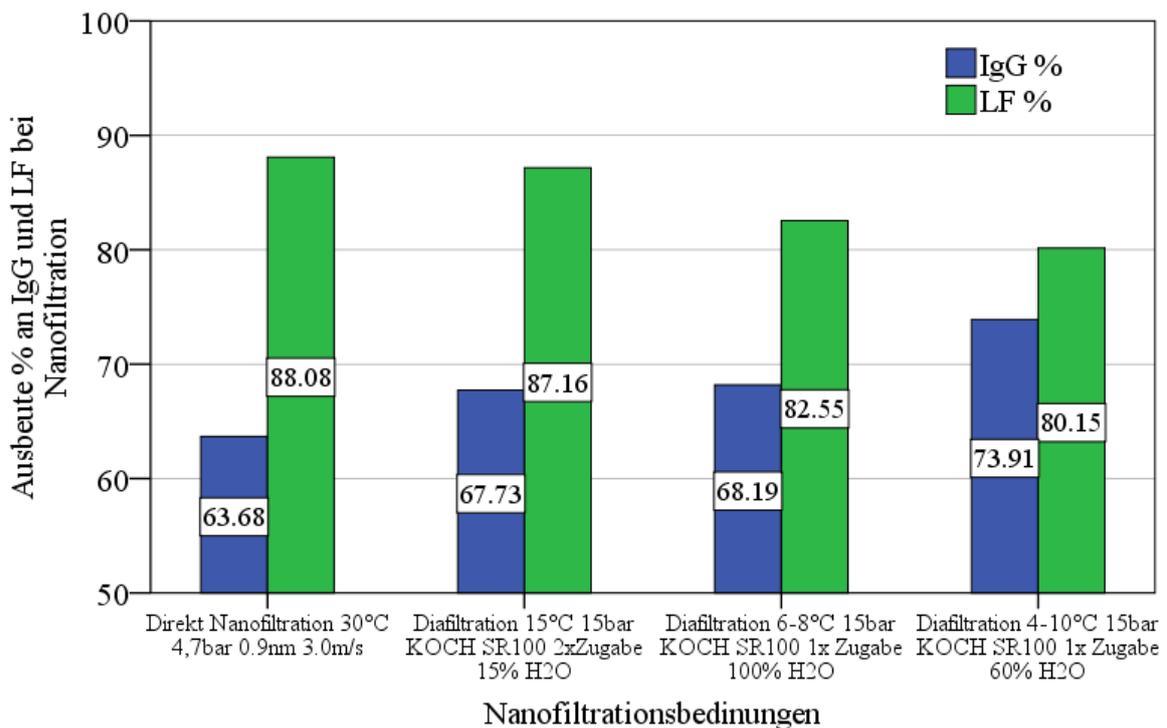


Abbildung 17 Rückhaltung von IgG und LF unter verschiedenen Nanofiltrationsbedingungen.

Anhand der Grafik in Abbildung 17 sieht man, dass bei direkter Nanofiltration (30°C , 4,7 bar, 0,9 nm, 3,0 m/s) 63,68% IgG und 88,8% LF durch die Membran zurückgehalten wurden. Bei Diafiltration (15°C , 15 bar, 2x Zugabe von jeweils 15% (w/w) Feedgewicht Wasser) erhöht sich die Rückhaltung von IgG auf 67,16%, die Rückhaltung von LF beträgt 87,16%. Bei Diafiltration bei 6-8°C , unter 15 bar, 1x Zugabe von destilliertem Wasser (100% Feedgewicht) beträgt die Ausbeute an IgG und LF 68,19% und 82,55%. Bei Diafiltration (4-10°C , 15 bar, 1x Zugabe von 60% Feedgewicht Wasser) sinkt die LF Rückhaltung auf 80,15%, während die Rückhaltung von IgG auf 73,91% steigt.

5 DISKUSSION

Charakterisierung von Kuhkolostrum

Im Allgemeinen wird Kuh-Kolostrum im Vergleich zur Kuhmilch durch niedrigeren pH-Wert, höhere Trockenmasse und deutlich höheren Proteingehalt charakterisiert. Außer den quantitativen sind auch qualitative Unterschiede in der Protein-Zusammensetzung zwischen den beiden Milchtypen vorhanden. Der Molkenprotein-Anteil am Gesamtprotein von Kuh-Kolostrum beträgt ca. 55%. Im Gegensatz dazu macht der Molkenprotein-Anteil am Gesamtprotein der Kuhmilch nur etwa 20% aus. Kuh-Kolostrum enthält einen signifikant höheren Immunglobulin G-Gehalt als normale Kuhmilch, versorgt das Neugeborene mit Immunsystem stärkenden und wachstumsfördernden Komponenten und gibt ihm Sicherheit für einen gesunden und kraftvollen Start ins neue Leben. Ohne eine Versorgung würden viele Tierjunge bereits die ersten Tage nicht überleben.

Tabelle 13 Charakterisierung von Kolostrum: Vergleich eigener Messwerte mit Literaturwerten

Ermittelte Messwerte		Literaturwert	
		Foley & Otterby, 1978	
		1.Gemelk	2.Gemelk
pH-Wert	6,27	6,32	6,32
TS [%]	20,82	23,90	17,90
Ges. Protein [%]	11,05	14,00	8,40
Kasein [%]	4,95	4,80	4,30
IgG [mg/g]	34,02	48,00	25,00
		Liang et al., 2011; Young W. Park, 2009; Severin et al., 2005	
LF	263,60 µg/mL	1,5-5 mg/mL	
		Swan et al., 2007	
GKZ [KbE/mL]	$1,31 \times 10^7$	$1,61 \times 10^7$	

Bei den Rohkolostrumproben ist ein leicht höherer Gehalt an LF vorhanden als bei den Rohmilchproben. Bei der Auswertung ist ersichtlich, dass der Gesamtkeimgehalt von Rohmilch niedriger als der von Rohkolostrum ist. So liegt die Keimzahl in roher Kuhmilch bei $1,86 \times 10^4$ KbE/ml und unterhalb dem Grenzwert für rohe Kuhmilch (EU-Verordnung Nr. 1662/2006).

Tabelle 13 stellt die Messwerte der wichtigen Parameter von Kuhkolostrum vergleichend gegenüber. Wegen der fehlenden Informationen über die Probenahme (z.B. Datum und Anzahl der Melkung) ist ein genauer Vergleich eigener Messwerte mit Literaturwerten nicht möglich. Alle Messwerte, mit der Ausnahme der von Lactoferrin, entsprechen aber in guter Näherung dem Literaturwert. Der Trockensubstanzgehalt, Gesamtproteingehalt und die Konzentration an IgG sind niedriger als die von Foley & Otterby (1978) ermittelten Werte für das 1. Gemelk der Kuh, und höher als die Werte des 2. Gemelkes. Der geometrische Mittelwert der Gesamtkeimzahl von Rohkolostrum liegt bei $1,31 \times 10^7$ KbE/ml, ist somit mit dem bekannten Literaturwert $1,61 \times 10^7$ KbE/ml vergleichbar.

Wie auch aus Tabelle 13 ersichtlich ist, liegt die Konzentration an Lactoferrin in den untersuchten Proben im Vergleich mit dem Literaturwert ca. 6 mal niedriger. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Umstellung von der Trockenphase aufs Melken, die zu einer großen Belastung für den Stoffwechsel führen kann. Genetische Faktoren, Alter, Laktationsnummer, Gesundheitszustand des Muttertieres, Jahreszeit bzw. die Umgebungstemperatur können das Niveau an Lactoferrin auch stark beeinflussen.

Porengröße der Membranen bei Mikrofiltration

In der Mikrofiltration werden Porenmembranen eingesetzt. Ob die unerwünschten Bestandteile des Kuhkolostrums (Mikroorganismen und Kasein) von der Membran

zurückgehalten werden, hängt neben den Betriebsbedingungen hauptsächlich von deren Größe und Struktur relativ zur Größe und Struktur der Membranporen ab.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen: je kleiner der Porendurchmesser, desto mehr Kasein wird von der Membran zurückgehalten. Membranen mit Porengrößen von 0,2 μm und 0,14 μm haben eine zufriedenstellende Entkaseinierungsfähigkeit unter 0,7 bar bei 30°C: > 99,8% Kasein bleiben im Konzentrat und werden daher von den Molkenproteinen separiert. Mit einer 0,14 μm Membran (3,5 mm Kanalweite) unter 1,2 bar bei 30°C wird die höchste Kasein-Rückhaltung erreicht (99,85 %)

Andererseits, wenn der Porendurchmesser der Membranen kleiner als 0,8 μm ist, wird ein Großteil der Mikroorganismen durch die Membranen mechanisch abgetrennt und somit die Haltbarkeit des Produktes erhöht. Aufgrund der begrenzten Porendurchmesser erlauben Membranfilter den absoluten Rückhalt von Bakterien. In einem Versuch wurde eine 0,14 μm Membran zur Mikrofiltration bei 30°C unter 0,7 bar angewandt. Die Gesamtkeimzahl im Magerkolostrum betrug 95.000 KbE/mL, davon Enterobacteriaceae < 10 KbE/mL, Milchsäurebakterien 6.700 KbE/mL, Bacillen und Endosporen < 100 KbE/mL. Nach der Mikrofiltration befanden sich insgesamt < 10 KbE/mL im Permeat. Die Permeabilität von IgG und LF liegt ca. bei 10%, wenn die Porengröße der Membran 0,2 μm beträgt. Die Membran mit 0,14 μm (3,5mm Kanalweite) besitzt höhere IgG bzw. LF Permeabilität und größere Kaseinrückhaltung, aber auch relativ höhere Rest-Gesamtkeimzahlen im Permeat.

Ausgehend von den vorhandenen Ergebnissen hat die Membran mit 0,14 μm die beste Leistung im Vergleich zu anderen Membranen bei gleicher Operationstemperatur, transmembranem Druck, Durchflussrate und Feed-Konzentration gezeigt.

Feed Konzentration und Operationstemperatur bei Mikrofiltration

Allerdings gibt es unter solchen Prozessbedingungen einen großen Verlust von erwünschten, biologisch wertvollen, aktiven Molkenproteinen. Im Vergleich zu

Kuh-Kolostrum beträgt die IgG-Permeabilität 51,48 % (ca. 7 mal höher), wenn Kuhmilchproben unter gleichen Bedingungen mit 0,14 µm Membran filtiert werden.

Es ist zu berücksichtigen, dass nicht allein die Größe der Molmasse, sondern auch die Struktur der zurückgehaltenen Moleküle und ihre Wechselwirkungen mit der Membran und anderen Substanzen im Feed den Cut-Off-Wert bestimmen. Milchbasierte Produkte sind wegen Proteinfouling von Membranen und Präzipitation von Mineralstoffen schwierig zu filtrieren.

Ausgehend von den vorhandenen Ergebnissen erkennt man, dass die Verluste von IgG und LF geringer sind, wenn die Feed-Lösung (Magerkolostrum) 1: 7,5 verdünnt wird, und der Mikrofiltrationsprozess bei 40°C durchgeführt wird. Steigende Temperatur führt zu einer Abnahme der Viskosität der Prozessflüssigkeit, die den Widerstand reduziert und Diffusivität erhöht. Wenn sich die Konzentration der gelösten Stoffe im Feed erhöht, erhöht sich die Viskosität und die Dichte der Flüssigkeit, und die Diffusivität von einem bestimmten gelösten Stoff nimmt ab. Außerdem führt eine höhere Feedkonzentration leichter zum Fouling der Membranen und somit zur Verblockung der Membran. Mit abnehmender Feed-Konzentration und steigender Operationstemperatur sinkt die Viskosität des Kolostrums, was zu besserem Transport von IgG und LF durch die Membran bei der Mikrofiltration führt.

Nanofiltration

Nanofiltration dient zur Aufreinigung der erwünschten Molkenproteine. Die meisten mono-Kohlenhydrate und Metallionen diffundieren durch die Membran ins Permeat und die erwünschten Molkenproteine werden so von kleineren Bestandteilen des Kolostrums getrennt.

Wegen fehlender Messdaten (z.B. die Zuckerkonzentration und Metallionenkonzentration in der Feedlösung bzw. im Konzentrat vor und nach der

Nanofiltration) kann die Fähigkeit der Nanofiltration zur Isolierung der Molkenproteine nicht beurteilt werden.

Bei der Prozessdurchführung müssen die möglichen Verluste an Molkenprotein auch berücksichtigt werden. Wird eine Nanofiltration-basierte Diafiltration (während dieses Prozesses werden 60% (w/w) destilliertes Wasser (bezogen auf Feed) kontinuierlich zugegeben) bei 4-10°C und 15 bar durch Verwendung der Membran KOCH SR 100 durchgeführt, erhält man die höchsten IgG-Rückhaltungskoeffizienten von 73,91%, allerdings ist die Rückhaltung von LF im Nanofiltrations-Konzentrat somit am geringsten bei 80,15%. Wird ein direkter Nanofiltrationsprozess bei 30°C unter 4,7 bar, 3,0 m/s mit einer 0,9 nm Membran durchgeführt, dann liegt die Ausbeute an IgG bei 63,68%. Jedoch erzielt man im Vergleich zu anderen Prozessen die höchste LF-Konzentration von 88,08%.

Welches Nanofiltrationsmodell bzw. welche Operationsbedingungen gewählt werden sollten, hängt neben der Rückhaltung von IgG und LF noch von der Isolierungsfähigkeit der Molkenproteine ab. Wenn man z.B. das Diafiltrationsmodell (4-10°C, 15 bar, 60% (w/w) Wasserzugabe) wählt und den Nanofiltrationsprozess mit Mikrofiltration kombiniert (40°C, 0,7 bar, 1: 7,5 verdünntes Feed, 0,14 µm), gewinnt man ca. 60 % IgG und ca. 16% LF im Endprodukt zurück.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kuh-Kolostrum enthält ausreichend Vitamine, Immunfaktoren und natürliche Wachstumsfaktoren. Sie unterstützen das körpereigene Abwehrsystem durch sogenannte „passive Immunisierung“. Die herkömmlichen Verfahren zur Reduzierung der Mikroorganismen in Milchprodukten (z.B. Pasteurisierung) denaturieren die wertvollen, biologisch aktiven Proteine im Kolostrum und sind daher für die Immunfaktoren-Gewinnung ungeeignet. In dieser Arbeit wird ein „Zwei Schritt-Membran-Filtrationssystem“ zur Abtrennung von Mikroorganismen und Kasein im Kuh-Kolostrum angewendet, um möglichst viele Wirkstoffe wie z.B. Immunglobulin G und Lactoferrin im Endprodukt zu erhalten. Zuerst wird Rohkolostrum mit einer Mikro-Membran filtriert, wobei Mikroorganismen, Kasein und sonstige unerwünschte, große Partikel durch die Membran zurückgehalten werden. IgG und Lactoferrin sind im Vergleich zur Membranporengröße kleiner, fließen in das Permeat und werden vom Konzentrat abgetrennt. Das Permeat wird zur Aufreinigung von Molkenproteinen nochmals durch eine Nano-Membran filtriert; IgG und LF werden zurückgehalten und bleiben im Nanofiltrationskonzentrat.

Der Prozess wird unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Verschiedene Membranen (Porengröße von 1,4 μm bis 0,14 μm) werden bei unterschiedlichen Operationstemperaturen (14 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ und 40 $^{\circ}\text{C}$) und unterschiedlichen Feed-Konzentrationen (Magerkolostrum unverdünnt, 1:2 verdünnt und 1:7,5 verdünnt) bei der Mikrofiltration eingesetzt. Nanofiltration wird jeweils als direkte Nanofiltration und Diafiltration unter verschiedenen transmembranen Drücken und bei verschiedenen Operationstemperaturen durchgeführt. Um die optimalen Prozessbedingungen zu definieren, werden der pH-Wert, der Gesamtproteingehalt, Kasein-Gehalt, Molkenproteingehalt, die Konzentration an Immunglobulin G bzw. Lactoferrin und die Gesamtkeimzahl von Rohkolostrum, Zwischenprodukten und Endprodukt gemessen. Das Kjeldahl-Verfahren wird zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet, während

ELISA-Kits (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für die Bestimmung der IgG- und LF- Konzentration eingesetzt werden. Die Gesamtkeimzahl wird mittels Koch'schem Verfahren mit Plate Count Agar ermittelt. Die Messwerte werden analysiert und verglichen. Aus den ermittelten Ergebnissen ist gut erkennbar, dass die Membran mit 0,14 µm Porendurchmesser die beste Entkeimung und Entkaseinierungsfähigkeit besitzt. Eine 1:7,5 Verdünnung der Feedflüssigkeit (Magerkolostrum) sowie die Einstellung der Operationstemperatur auf 40°C vermindert IgG bzw. LF Verluste während der Mikrofiltration. Eine direkte Nanofiltration hat eine niedrigere Ausbeute an IgG, aber eine höhere Ausbeute an LF zur Folge. Im Gegensatz dazu zeigt die auf Nanofiltration basierende Diafiltration eine bessere IgG-Ausbeute, aber höhere Verluste an LF. Insgesamt werden für IgG eine Ausbeute von ca. 60% und für LF von ca. 16% erreicht.

7 ABSTRACT

Bovine colostrum contains several beneficial substances such as vitamins, natural immune and growth factors. They help to regulate the immune responses by so-called “passive immunization”. This is crucial since newborn calves cannot receive passive transfer of immunity via the placenta before birth. The conventional preservation methods in the dairy industry (like pasteurization) would denature the valuable and biologically active proteins in bovine colostrum, and are therefore unsuitable for the extraction of immune factors. In this study, a “two-step membrane-filtration system” was implemented for the separation of microorganisms and casein in bovine colostrum from whey proteins and to concentrate active substances such as immunoglobulin G and lactoferrin in the final product.

Firstly, the raw colostrum was filtered through a micro-membrane, whereby microorganisms, casein and other undesirable larger particles were retained by the membrane. IgG and LF can pass the membrane into the permeate and were thus separated from the concentrate as they are smaller than the membrane pore size. The permeate was again filtered through a nano-membrane to increase the whey protein concentration. IgG and LF were retained in the nanofiltration concentrate.

The process was conducted under different conditions. Different membranes (pore size of 1.4 μm to 0.14 μm) were used for microfiltration at different operating temperatures (14°C , 30°C and 40°C) and at diverse concentrations of feed (skimmed colostrum was divided into three groups, the undiluted, 1:2 dilution and 1:7.5 dilution). Nanofiltration was carried out as direct nanofiltration and diafiltration, under various transmembrane pressures and at different operating temperatures.

The concentration of IgG and LF, the pH value, the total protein content, casein content and the total viable count of raw colostrum, intermediates and final product were measured to evaluate and define the optimum process conditions. The Kjeldahl method was used for determination of the protein content, while ELISA-kits (enzyme-linked

immunosorbent assay) were applied for the quantitation of IgG and LF. The total viable count was analyzed by the pour plate technique with plate count agar. The measured values were analysed and compared. From the ascertained results it is clear that the membrane with 0.14 μm pore diameter owns the best capability for reducing the microbial load and for casein elimination. Diluting the feed (skimmed colostrum) to 1:7.5 and enhancing the operation temperature to 40°C can minimize the loss of IgG and LF during the microfiltration. Through direct nanofiltration there is a lower yield of IgG, but a higher yield of LF. In contrast, with the nanofiltration-based diafiltration better yield of IgG, but higher losses of LF are obtained. In summary, an IgG-yield of approx. 60% and an LF-yield of approx. 16% can be achieved.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Mashikhi, S. A. & Nakai, S. (1987): Isolation of bovine immunoglobulines and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques. *J Dairy Sci.*, 70(12): 2486-2492.
- Arnold, R. R., Cole, M. F. & McGhee, J. R. (1977): A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197(4300): 281-286.
- Bachmann, H. P., Thomet, A. & Schafroth, K. (2003): Neues, innovatives Verfahren für die Herstellung von Käse. *Agrarforschung*, 10(10): 406-410.
- Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L. & Heremans, J. F. (1970): Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med.*, 131(3): 559-570.
- Bake, K. (2003): *Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*. (S. 79-80). Gelsenkirchen: Th. Mann.
- Balfour, W. E. & Comline R.S. (1961): Acceleration of the absorption of unchanged globulin in the new-born calf by factors in colostrum. *J Physiol.*, 160(2): 234-257.
- Banks, K. L. (1982): Host defense in the newborn animal. *J Am Vet Med Assoc.*, 181(10): 1053-1056.
- Becker, W., Rapp, W. & Schwick, H. G. (1968): Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie.*, 6(3): 113-122.
- Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J. & Furmanski, P. (1994): Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Research*, 54(9): 2310-2312.
- Bläckberg, L. & Hernell, O. (1980): Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.*, 109(2): 108-183.
- Blum, J.W. & Hammon, H. M. (2000): Bovines Kolostrum: Mehr als nu rein Immunglobulinlieferant. *Schweiz Arch Tierheilk*, 142(5): 221-228.
- Brisson, G., Britten, M. & Pouliot Y. (2007): Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: Effect of iron saturation. *International Dairy Journal*, 17 (6): 617-624.

- Brock, J. H. (2002): The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*, 80(1): 1-6.
- Busse, M., (2002): *Qualitätssicherung in der Milchwirtschaft – Qualitätssicherung in der Milchwirtschaft*. Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann
- Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren für Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe. *Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik. Band VI* (1985). Bonn: Vdlufa-Verlag.
- Clawin-Rädecker, I., Kiesner, C. & Schlimme, E. (2000): Analyse der säurelöslichen Gehalte von α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Serumalbumin und der Immunglobulinfraktion in pasteurisierter Milch. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 52 (4): 322-334
- Damiens, E., Mazurier, J., Yazidi, I. E., Masson, M., Duthile, I., Spik, G. & Boilly-Marer Y. (1998): Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1402 (3): 277-287.
- Davis, C. L., Drackley, J. K., Drackley, J. (1998): Colostrum. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf*. (S. 188-189). Iowa: Iowa State University Press.
- Dračkov et al. (2009): Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech J Food Sci.*, 27: 102-104.
- Ehlert, U. & Von Kanel, R. (2010): *Psychoendokrinologie und Psychoimmunologie*. (S. 73-76). Berlin: Springer.
- EI-Loly, M. M. (2007): Identification and Quantification of Whey Immunoglobulins by Reversed Phase Chromatography. *International Journal of Dairy Science*, 2(3): 268-274.
- Elgar, D. F., Norris, C. S., Ayers, J. S., Pritchard, M., Otter D. E. & Palmano, K. P. (2000). Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, 878 (2): 183-196.
- Foley, J. A. & Otterby, D. E. (1978): Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review. *J Dairy Sci.*, 61(8): 1033-1060.

- Francis, G. L., Regester, G. O., Webb, H.A. & Ballard, F. J. (1995): Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *J Dairy Sci.*, 78(6): 1209-1218.
- Goedeck, R. (2006): *Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis: 2. Bde.* (2. Aufl.). (S. 539-544). Weinheim: Wiley-VCH.
- Griffiths, E. & Humphreys, J. (1977): Bacteriostatic effect of human milk and bovine colostrum on *Escherichia coli*: importance of bicarbonate. *Infect Immun.*, 15(2): 396-401.
- Groves, M. L. (1965): Preparation of some iron-binding proteins and lactalbumin from bovine milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 100(1): 154-162.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schutz, T. F. & Suerbaum, S. (2008): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (S. 55-62). Berlin: Springer.
- Harmsen, M. C., Swart, P. J., de Bethune, M. P., Pauwels, R., De Clercq, E., The, T.H. & Meijer D. K. (1995): Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis.*, 172(2): 380-388.
- Hasegawa, K., Motosuchi, W., Tanaka, S. & Dosako, S. (1994): Inhibition with Lactoferrin of *in vitro* Infection with Human Herpes Virus. *Jpn J Med Sci Biol.*, 47(2): 73-85.
- Ikeda, M., Nozaki, A., Sugiyama, K., Tanaka, T., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekibara, H., Shimotohno, K., Saito, M. & Kato, N. (2000): Characterisation of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.*, 66(1): 51-63.
- James, R. E., Polan, C. E. & Cummins, K. A. (1981): Influence of administered indigenous microorganisms on uptake of [iodine-125] gamma-globulin in vivo by intestinal segments of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 64 (1):52-61.
- Johanson, B. (1960): Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14(2): 510-512.
- Neumann, J. (2008): *Immunbiologie: Eine Einführung.* (S. 36-40). Berlin: Springer.
- Kawakami, H., Shinmoto, H., Dosako, S. I. & Sogo, Y. (1987): One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *J Dairy Sci.*, 70(4): 752-759.

- Korhonen, H. (1998): Colostrum immunoglobulins and the complement system-potential ingredients of functional foods. A review article. *Bulletin of IDF*, 336: 36-40.
- Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, H. S. (2000): Bovine milk antibodies for health. *British Journal of Nutrition*, 84: 135-146.
- Kremer, B. P. & Bannwarth H. (2011): *Einführung in die Laborpraxis* (2. Aufl.). (S. 168-169) Berlin: Springer.
- Krömker, V. (2007) *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene* (S. 156-162). Stuttgart: Parey Bei Mvs.
- Kuhara, T., Yamauchi, K., Tamura, Y. & Okamura, H. (2006): Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL-18 and type I IFN in the small intestine. *J Interferon Cytokine Res.*, 26(7): 489-499.
- Kühne, S., Hammon, H. M., Bruckmaier, R. M., Morel, C., Zbinden, Y. & Blum J.W. (2000): Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *American Society of Animal Science*, 78(3): 609-620.
- Kunz, C. & Lonnerdal, B. (1990): Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *American journal of clinical nutrition*, 51(1): 37-46.
- Lack, P. (2006): *Bestimmung von Immunglobulin G und M im Serum neugeborener Kälber während der ersten zehn Lebensstage unter besonderer Berücksichtigung des Fütterungsregimes*. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Lang, F. & Lang, P. (2007): *Basiswissen Physiologie* (2. Aufl.). (S. 35-38). Berlin: Springer.
- Lang, J., Yang, N., Deng, J., Liu, K. & Yang, P. (2011): Inhibition of SARS Pseudovirus Cell Entry by Lactoferrin Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans. *PLoS ONE* 6(8): e23710. doi:10.1371/journal.pone.0023710.
- Laurell, C. B. (1966): Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem.*, 15(1), 45-52.
- Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte, Österreichische Bundesministerium für Gesundheit, 2006

- Levieux, D. & Ollier A. (1999): Bovine immunoglobulin G, β -lactoglobulin, α -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research*, 66(3): 421-430.
- Levay, P.F. & Viljoen, M. (1995): Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80(3): 252-267.
- Liang, Y., Wang, X., Wu, M. & Zhu, W. (2011) Simultaneous Isolation of Lactoferrin and Lactoperoxidase from Bovine Colostrum by SPEC 70 SLS Cation Exchange Resin. *Int J Environ Res Public Health*, 8(9): 3764-3776.
- Marchetti, M., Superti, F., Ammendolia, M. G., Rossi, P., Valenti, P. & Seganti, L. (1999): Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. *Med Microbiol Immunol*, 187(4): 199-204.
- Masson, P. L & Heremans, J. F. (1971): Lactoferrin in milk from different species. *Comperative Biochemistry and Physiology B*, 39(1): 119-129.
- Matissek R., Steiner G., (2005): *Lebensmittelanalytik: Grundzüge, Methoden, Anwendungen* (3. Aufl.). (S. 86-95). Berlin: Springer.
- Maubois, J. L.(2001): Milk microfiltraite, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivates. *Proceedings of the 3rd International Whey Conference*. (S, 59-72). Hamburg: Behr's.
- Melin, T. & Rautenbach, R. (2007): *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung* (3. Aufl.). Berlin: Springer.
- Naidu, N. (2002): *Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial*. (S. 15-42). Florida: CRC Press.
- Nousiainen, J., Korhonen, H. et al. (1994): The effect of colostrum immunoglobulin supplement on the passive immunity, growth and health of neonatal calves. *Agricultural science in Finland*, 3(5): 421-428.
- Page, M. & Thorpe, R. (1996): Purification of IgG using DEAE-Sepharose Chromatography. *The Protein Protocols Handbook* (2. Edition). (S. 987-988). New Jersey: Humana Press.

- Page, M. & Thorpe, R. (2002): Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate. *The Protein Protocols Handbook* (2. Edition). (S. 983-985). New Jersey: Humana Press.
- Palmano, K.P. & Elgar, D. F. (2002). Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, 947(2): 307-311
- Peterson, N. A., Anderson, B. F., Jameson, G. B., Tweedie, J. W. & Baker, E. N. (2000): Crystal structure and iron-binding properties of the R210K mutant of the N-lobe of human lactoferrin: implications of iron release from transferrins. *Biochemistry*, 39(22): 6625- 6633.
- Plate, K., Beutel, S., Buchholz, H., Demmer, W., Fischer-Frühholz, S., Reif, O., Ulber, R. & Scheper, T. (2006): Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1117(1): 81-86.
- Poulsen, K. P., Hartmann, F. A. & McGuirk, S. M. (2002): Bacteria in colostrum: impact on calf health. *J Vet Intern Med.*, 16: 339.
- Reinicke, A. (2006) Vergleichende Fallbeschreibung zur kolostralen IgG-Versorgung neugeborener Kälber in zwei südkalifornischen Milchbetrieben mit unterschiedlichen Managementbedingungen. Dissertation, LMU München: Faculty of Veterinary Medicine.
- Reuter, P. (2004): *Springer Lexikon Medizin* (S. 1164-1165). Berlin: Springer.
- Rolle M., Mayer A. (1993): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenlehr* (S. 426-455). Stuttgart: Enke Verlag.
- Scammel, A. W. (2001): Production and uses of colostrum. *Australian Journal of Technology*, 56(2): 74-82.
- Schütt, C. & Bröker, B. (2011): *Grundwissen Immunologie* (S. 7-11). Berlin: Springer.
- Schweizer Hygieneverordnung, 2004
- Schwerd, W. & Groß, J. (1989): Quantitative Bestimmungen von Hp, Pi, Tf und Gc aus gelagerten Blutspuren. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 102(8):531-534.

- Severin, S. & Wenshui, X. (2005) Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals. Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8): 645-656.
- Shau, H., Kim, A. & Golub, S. H. (1992): Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *Journal of Leukocyte Biology*, 51(4): 343-349.
- Sinell, H. J. (2004): *Einführung in die Lebensmittelhygiene* (3. Aufl.). (S. 17-28, 150-160). Stuttgart: Parey Bei Mvs.
- Soerensen, M. & Soerensen, S. P. L. (1939): *The protein in whey* (S. 55-99). Copenhagen: Hagerup in Komm.
- Solomons, N. W. (2002): Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrum concentrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (3): 24-28.
- Sorrentino, S., D'Alessandro, A. M., Maras, B., Di Ciccio, L., D'Andrea, G., De Prisco, R., Bossa, F., Libonati, M. & Oratore, A. (1999): Purification of a 76-kDa iron-binding protein from human seminal plasma by affinity chromatography specific for ribonuclease: Structural and functional identity with milk lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430 (1): 103-110.
- Steijns, J. M. & van Hooijdonk, A. C. (2000): Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84 (1): 11-17.
- Struss, H. (1964): Immune milk treatment of rheumatoid arthritis: A review. *Journal of Immune Milk*, 1: 23-4.
- Sun, X. L., Baker, H. M., Shewry, S. C., Jameson, G. B. & Baker, E. N. (1999): Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. *Acta Crystallographica Section D*, 55: 403-407.
- Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P. & Seganti, L. (1997): Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol.*, 186(2-3): 83-91.
- Swan, H., Godden, S., Bey, R., Wells, S., Fetrow, J. & Chester-Jones, H. (2007): Passive Transfer of Immunoglobulin G and Preweaning Health in Holstein Calves fed a Commercial Colostrum Replacer. *J Dairy Sci.*, 90(8): 3857-3866.

- Thomet, A. & Bütikofer, U. (2004): Kaseinkonzentrierung mit Mikrofiltration – Technologische Einflüsse. *ALP Science*, 479: 1-19.
- Tizard, I. R. (2000): *Veterinary immunology: an introduction* (6. Aufl.). (S. 243-262). Pennsylvania: W.B. Saunders Company Philadelphia.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. & Kawase, K. (1991): Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*, 74(12): 4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Wakabayashi, H. & Bellamy, W. (1994): Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Adv Exp Med Biol.*, 357: 209-218.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Hayasawa, H. (2002): Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol.*, 80(1): 109-112.
- Busch, U. (2010): *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik* (S. 172-174). Berlin: Springer.
- Van der Strate, B. W., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M.C. & Meijer, D.K. (2001): Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.*, 52(3): 225-39.
- Verordnung (EG) Nr. 1662/2006 der Kommission vom 6. November 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs
- Weiss, W. & Baur, X. (1987): Festphasen-Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von antigenspezifischen IgG-Antikörpern im Serum von Patienten mit Farmerlunge. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 25(10): 689-698.
- Wilhelm, S. (2008): *Wasseraufbereitung: Chemie und chemische Verfahrenstechnik* (7. Aufl.) (S. 128-130). Berlin: Springer.
- Xu, R. J. (1996): Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fertil Dev.*, 8(1): 35-48.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J. & Ellison, R. T. (1993): Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun.*, 61(2): 719-728.

- Yi, M., Kaneko, S., Yu, D. Y. & Murakami, S. (1997): Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J Virol.*, 71(8): 5997-6002.
- Yoo, Y.C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K.I. & Azuma, I. (1997): Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor matastasis in mice. *Cancer Science*, 88(2): 184-190.
- Yoshida, S. (1989): Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey. *J Dairy Science.*, 72(6): 1146-1450.
- Yu, R. H. & Schryvers, A. B. (2002): Bacterial lactoferrin receptors: insight from characterizing the *Moraxela bovis* receptors. *Biochem Cell Biol.*, 80(1): 81-90.
- Yvon, M., Levieux, D., Valluy, M. C., Pelissier, J. P. & Mirand, P. P. (1993): Colostrum protein digestion in newborn lambs. *J Nutr.*, 123(3): 586-596.
- Zangerl, P. (2007): Mikrobiologie der Produkte. In V. Krömker (Hrsg.), *Kurzes Lehrbuch der Milchkunde und Milchhygiene* (S. 156-179). Stuttgart: Parey Bei Mvs.

9 ANHANG

Probenbegleitblätter

28.10.2010, 03.11.2010, 09.11.2010, 16.11.2010, 09.12.2010,
02.02.2011, 14.02.2011, 01.03.2011, 21.03.2011, 28.03.2011, 11.04.2011, 22.04.2011

Zusammenfassung der Messdaten