

Diplomarbeit

Einsatz von haltbargemachter Molke im biologischen Weinbau

ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des akademischen Grades eines
Diplom – Ingenieur unter der Leitung von

Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Ingrid Steiner

am Institut der Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und
technische Biowissenschaften

Forschungsbereich: Lebensmittelchemie

eingereicht an der Technischen Universität Wien

Fakultät für Maschinenwesen und Betriebswissenschaften

Philipp Merlin Jost

Matrikelnummer : 0825544

Wien, _____

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	5
ABSTRACT	6
KURZFASSUNG	6
1. AUFGABENSTELLUNG	7
2. EINLEITUNG	8
2.1. Zusammensetzung der Molke	8
2.2. Geschichte und Bedeutung der Molke	9
2.3. Biologische Wertigkeit	10
2.4. Lactose -Milchzucker	11
2.5. Milchsäure - Hydroxypropansäure	12
2.6. Molkenproteine	12
2.6.1. β -Lactoglobulin	13
2.6.2. α -Lactalbumin	13
2.6.3. Rinderalbumin (BSA - bovine serum albumin)	13
2.6.4. Immunglobuline	13
2.6.5. Lactoferrin	14
2.6.6. Lysozym	15
2.6.7. Lactoperoxidase	16
2.7. Antibakterielle Wirkung von Molke bzw. Molkepulver	22
2.8. Hitzebehandlung	23
2.9. Weinbau und Rebkrankheiten	25
2.9.1. Ökologischer Weinbau	25
2.9.2. Echter Mehltau - Oidium	26
2.9.3. Falscher Mehltau – Peronospora	27
2.9.4. Grauschimmelfäule - Botrytis	28
3. MATERIALIEN	29
3.1. Molkeproben	29
3.2. Biospritzmittel	29
4. METHODIK	30
4.1. Untersuchungen an Molke	30

4.2. pH-Wert	30
4.3. Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	30
4.4. Mikroskopische Untersuchungen	31
4.5. Bestimmung der Lactoperoxidase-Aktivität	31
4.5.1. Chemikalien	31
4.5.2. Molkeproben Vorbereitung	32
4.5.3. Geräte	32
4.5.4. Bestimmung	32
5. ERGEBNISSE	33
5.1. Molke vom 8.4.2014	33
5.1.1. LPO-Aktivität der Molke vom 8.4.2014	33
5.1.2. Keimzahlen der Molke vom 8.4. 2014	36
5.2. Molke vom 29.4.2014	36
5.2.1. LPO-Aktivität der Molke vom 29.4.2014	37
5.2.2. pH-Werte der Molke vom 29.4.2014	38
5.2.3. Keimzahlen der Molke vom 29.4.2014	39
5.3. Molke vom 6.5.2014	39
5.3.1. LPO-Aktivität der Molke vom 6.5.2014	40
5.3.2. LPO-Aktivität der Molke vom 6.5.2014 mit Netzschwefel	42
5.3.3. pH-Werte der Molke vom 6.5.2014 mit Netzschwefel	42
5.3.4. Keimzahlen der Molke vom 6.5.2014	43
5.4. Molke vom 20.5.2014	43
5.4.1. LPO-Aktivität Molke vom 20.5.2014	44
5.4.2. pH-Werte der Molke vom 20.5.2014	46
5.4.3. Keimzahlen der Molke vom 20.5.2014	46
5.5. Molke vom 3.6.2014	47
5.5.1. LPO-Aktivität der Molke vom 3.6.2014	47
5.5.2. Keimzahlen der Molke vom 3.6.2014	49
5.6. Molke vom 10.6.2014	50
5.6.1. LPO-Aktivität der Molke vom 10.6.2014	50
5.6.2. Keimzahlen der Molke vom 10.6.2014	51
5.7. Molke vom 24.6.2014	51
5.7.1. LPO-Aktivität der Molke vom 24.6.2014	52
5.7.2. Keimzahlen der Molke vom 24.6.2014	53
5.8. Vergleich der unterschiedenen Molkeproben	54
6. DISKUSSION DER CHEMISCHEN UND MIKROBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	56
7. MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN WEINBLÄTTERN UND WEINTRAUBEN	57

7.1. Untersuchungen der Weinblätter (jeweils auf die Vorwoche bezogen)	58
7.2. Zusätzliche einmalige Blattbehandlung mit einer vor Versuchsbeginn 2 Wochen lang gelagerten Molke	63
7.3. Blattuntersuchung auf die Kontrolle der jeweiligen Woche bezogen	63
7.4. Untersuchungen an Trauben	67
7.5. Bilder von Trauben am Ende des Beobachtungszeitraum	69
8. DISKUSSION DER BLATTUNTERSUCHUNGEN	70
9. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	71
10. LITERATURVERZEICHNIS	72

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Professorin Dr. Ingrid Steiner bedanken. Sie hat mir mit ihrem Wissen, Anmerkungen und Ratschlägen sehr geholfen, diese Arbeit voranzutreiben und sie schlussendlich in diese Form zu bringen.

Einem besonderen Dank gilt auch Herrn Robert Paget, der nicht nur jeden Mittwoch einen Umweg in Kauf nahm, um die Molkeproben persönlich ins Institut zu bringen, sondern auch ein paar Mal bekömmlicheres Gut mit der Molke lieferte und somit mich auch kulinarisch seinem Biohof näher brachte.

Ohne Herrn Alwin Jurtschitsch und seine Mitarbeiter wären die Untersuchungen natürlich nicht möglich gewesen. Ihren Feldversuchen ist es zu verdanken, dass der praktische Aspekt der Arbeit, die Behandlung am Weinberg, so reibungslos durchgeführt werden konnte.

Dank gebührt auch Herrn Ahmed Abdelaaty, der mit seinen Vorstudien eine klare Richtung für die Laboruntersuchungen vorgab und viel Input für die weiteren Studienverläufe lieferte.

Ein herzlicher Dank gilt ebenfalls allen Mitgliedern des Institutsteams von Frau Steiner - Herrn Thomas Jung und Frau Barbara Harfner-Düringer. Sie haben mit ihrem Einsatz und ihrer Hilfestellung das Arbeiten im Labor sehr angenehm gestaltet.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Eva Holl, welche mit großer Geduld mehrmals produktive Korrekturhinweise lieferte.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass Sie mich nicht nur finanziell sondern auch emotional unterstützt haben und mir so das Studium an der TU Wien ermöglichten.

Abstract

Whey can be used in biological winery. Therefore the storage stability is a big issue. In this work, the main enzyme for the antifungal effect – the lactoperoxidase- was analyzed during several weeks. The total value of lactoperoxidase changes seasonal, but the behavior of the other parameters, like pH-value and the aerobic, mesophilic total viable count had similar trends.

A five minute pasteurization at 65 °C showed the best effect on the lactoperoxidase activity, the activity even increased by 30-40 percent. Additional treatment with potassium thiocyanate had just a very low effect and cannot be recommended for further studies.

Additional to the laboratory research, vines were sprinkled with whey during a whole growing period once a week. The effect of the spray experiments was detected by comparing the treated vine leaves and grapes with none treated or different treated ones. Overall the vines which had been sprinkled showed a resistance against botrytis whereas the other vines did not show that.

Kurzfassung

Für die Verwendung als Spritzmittel im biologischen Weinbau ist die Lagerstabilität der Molke von wesentlicher Bedeutung. In dieser Arbeit wurde das Leitenzym des fungiziden Effekts – die Lactoperoxidase, in Hinblick auf deren Veränderung bei mehrwöchiger Lagerung betrachtet. Die absolute Lactoperoxidase-Aktivität war starken saisonalen Schwankungen unterworfen, allerdings verhielten sich andere Parameter der Molke wie der pH-Wert und mesophile anaerobe Gesamtkeimzahl ähnlich.

Eine fünfminütige Pasteurisierung bei 65 °C zeigte den besten Effekt auf die Lactoperoxidase-Aktivität, dadurch wurde eine Aktivitätssteigerung zwischen 30-40% möglich. Die Zugabe von Kaliumthiocyanat zur Molke zeigte nur einen geringen Effekt und wird daher als Behandlungsmethode nicht weiterempfohlen.

Auf einem Versuchsweinberg wurden wöchentlich eine Mischung von je 1 Teil Wasser und 1 Teil Molke gesprüht und deren Wirkung mit Kontrollzeilen sowie einem alternativen Biospritzmittel verglichen. Durch die Besprühung mit Molke wurde ein schützender Effekt gegen Botrytis festgestellt, welche weder bei den Kontrollzeilen noch beim alternativen Biospritzmittel gegeben war.

1. Aufgabenstellung

Diese Diplomarbeit entstand im Zuge eines Projektes des Innovationsschecks Plus in Zusammenarbeit mit dem Weingut Jurtschitsch und dem Biohof Robert Paget.

Die Molke, welche bei der Käseproduktion des Biohofs anfiel, sollte als Pflanzenstärkungsmittel im biologischen Weinbau verwendet werden. Im Rahmen der Untersuchung ist herauszufinden, wie das Besprühen auf den Weinstock wirkt.

Aufgrund der nachgewiesenen antibakteriellen Wirkung wird vermutet, dass ein einfaches Aufsprühen auf den Rebstock vor allem gegen Pilze eine Wirkung zeigen kann.

Ein Hauptproblem dieser Behandlung ist der zeitliche Unterschied zwischen Käse- bzw. Molkeproduktion und der Aufbringung auf den Weinstock. Daher sind die Lagerfähigkeit der Molke und die mögliche Abnahme der Wirksamkeit über die Zeit als zentrale Faktoren charakterisiert worden.

Es soll die Lagerstabilität der Molke, genauer der Lactoperoxidase, einem Leitenzym für die antifungizide und antimikrobielle Wirkung der Molke, analysiert werden.

Der Einfluss von Behandlungsmethoden, wie der Pasteurisierung, auf die Lactoperoxidase wird untersucht und in den zeitlichen Kontext zur unbehandelten Molkelagerung gebracht.

Die genaue Wirksamkeit der Molke auf die Weinreben wird erforscht. Zu diesem Zwecke kamen wöchentlich Proben der Versuchsreben und Kontrollreben ins Labor und wurden mikroskopisch untersucht.

2. Einleitung

In diesem Kapitel sollen die wesentlichen Grundlagen der Untersuchung erklärt werden. Ein großer Schwerpunkt ist dabei der Molke und deren Bestandteilen gewidmet. Speziell auf das Lactoperoxidase-System und deren Mechanismus wird eingegangen. Da für die Untersuchung die Hitzestabilität der Molkeproteine und die antibakterielle, antifungizide Wirkung der Molke wichtig waren, wurde bei der Literaturrecherche gezielt in diesem Bereich gesucht.

Ein weiteres Unterkapitel widmet sich dem biologischen Weinbau und den drei dabei am Häufigsten auftretenden Pilzkrankungen.

2.1. Zusammensetzung der Molke

Molke ist ein Milchserum, das während der Herstellung von Käse oder Topfen nach Abscheidung des Käsestoffes (Kasein) und des Fettes unter Lactose Verwendung anfällt.

Man unterscheidet zwischen Süß- und Sauermolke. Süßmolke ist ein Produkt der enzymatischen Fällung des Kaseins. Der Calciumgehalt sinkt dabei, daher wird weniger Milchsäure zu Calciumlactat umgesetzt. Dies verhindert die Umwandlung in Sauermolke. Sauermolke entsteht bei Behandlung von Milch mit Lab oder Lactobazillen und hat u.a. einen niedrigeren pH-Wert. Die genaueren Unterschiede sind in Tabelle 1 aufgelistet [1].

	Süßmolke	Sauermolke
Wasser	93-94%	94-95%
Trockensubstanz	6-6,5%	5-6%
Lactose	4,5-5%	3,8-4,3%
Milchsäure	Spuren	bis 0,8%
Eiweißstoffe (insgesamt)	0,8-1%	0,8-1%
Molkeneiweiß	0,6-0,65%	0,6-0,65%
Zitronensäure	0,1%	0,1%
Asche	0,5-0,7%	0,5-0,7%
pH-Wert	6,4- 6,2	5 - 4,6

Tabelle 1: Zusammensetzung der Molke [1]

Der Fettgehalt ist von der Milch abhängig, wobei ein hoher Milchfettgehalt auch einen hohen Molkefettgehalt bewirkt - v.a. wenn die Milch nicht homogenisiert wurde. Molke enthält viele Vitamine der Gruppen B und C. Das Vitamin B2 - Riboflavin bewirkt die grün-gelbliche Farbe der Molke.

2.2. Geschichte und Bedeutung der Molke

Die Geschichte der Molke ist logischerweise sehr eng mit der Käseentstehung verbunden. Hippocrates (400 vor Christus) verwendete Molke als Mittel gegen Gicht und Leberleiden. Im römischen Reich war Molke ein oft verwendetes Mittel gegen die Nachwirkungen von Fressorgien und Verstopfungen. Die Römerinnen verwendeten es auch als Hautbehandlungsmittel. Paracelsus galt als großer Verfechter von Molke-Therapien zur Linderung oben erwähnter Leiden.

Die Entstehung der Kurbäder im 18. Jahrhundert erhöhte die Bedeutung der Molke als Gesundheitsprodukt. Bei der Wohlstandskrankheit Gicht sowie Verdauungsproblemen wurde sehr häufig Molke eingesetzt. Nach den Weltkriegen kam man aber von dem Einsatz der Molke ab. Jahrzehntlang galt Molke als Abfallprodukt und wurde abgesehen von der Milchzuckergewinnung hauptsächlich als Tierfutter verwendet. Die weitere Molke wird oft ins Abwasser geleitet. Allerdings könnte man aus Molke noch viele wirtschaftlich durchaus bedeutende Inhaltsstoffe gewinnen. Da Molke einen hohen BSB₅-Wert (30.000-60.000 mg je Liter Abwasser) besitzt, würde eine wirtschaftlichere Nutzung der Molke auch im Sinne einer ökologischen Abfallwirtschaft sein [2].

In der nachfolgenden Tabelle werden nun die Inhaltsstoffe der Molkeprodukte mit Milchprodukten verglichen und noch einmal genauer aufgeschlüsselt:

J/je 500 ml	Vollmilch	Magermilch	Naturmolke	Fruchtmolke (handelsüblich)	Fruchtmolke light
Kcal	320	175	100	215	130
Eiweiß	16 g	17,5 g	3,5 g	3 g	3,5 g
Fett	18 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
KH	23,5 g	24,5 g	20 g	50 g	28 g
Cholesterin	65 mg	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Kalium	786 mg	750 mg	645 mg	645 mg	645 mg
Kalzium	600 mg	600mg	220 mg	150 mg	185 mg
Vitamin B ₁	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg
Vitamin B ₂	0,9 mg	0,9 mg	0,7mg	0,6 mg	0,6 mg
Vitamin B ₁₂	2,05 µg	1,5 µg	20,75 µg	20,75 µg	0,75 µg

Tabelle 2 Nährwerte verschiedener Milch- und Molkegetränke im Vergleich [1]

Der Milchzucker der Milch geht bei der Käseherstellung fast zur Gänze in die Molke über. Bei der Konsumierung großer Mengen dieses Zuckers erreicht ein Teil davon die Darmbakterien des Dickdarms und dient diesen dann als Kohlenhydratquelle. Die Zucker (vorwiegend Lactose) werden in Milchsäure umgewandelt. Der pH-Wert des Darmabschnittes sinkt und das Milieu wird für unerwünschte Mikroorganismen wie Krankheitserreger unangenehmer zu besiedeln.

2.3. Biologische Wertigkeit

Molke hat eine sehr hohe biologische Wertigkeit. Dieser Wert gibt Auskunft wie gut der menschliche Körper die in einem Lebensmittel enthaltenen Proteine in körpereigene Eiweißstrukturen umbauen kann. Dies hängt u.a. von der Ähnlichkeit der Aminosäuren-Zusammensetzung der Nahrung mit der des Menschen zusammen. Der Basiswert von 100 (die biologische Wertigkeit eines Hühnereies) wurde hierbei vom Freiburger Mediziner Karl Thomas gewählt.

Biologische Wertigkeit [g/100g]	Grundnahrungsmittel
104 - 110	Molke Eiweiß (Lactalbumin)
100	Hühnerei
92	Thunfisch
91	Rindfleisch
88	Kuhmilch
85	Käse
84	Soja
80	Geflügelfleisch
76	Kartoffel
73	Bohnen
72	Mais
66	Reis
60	Hafer
59	Weizen

Tabelle 3: Biologische Wertigkeit verschiedener Lebensmittel [3]

Um die Molke vor raschem Verderben zu schützen, sind hauptsächlich 3 Verfahren üblich:

-) sofortige Kühlung auf $<4^{\circ}\text{C}$,
-) Wärmebehandlung bei $71\text{-}74^{\circ}\text{C}$ für mindestens 15 Sekunden,
-) Zugabe von Konservierungsstoffen nach dem Entrahmen, z.B. $0,05\text{Massen}\% \text{H}_2\text{O}_2$ oder $0,5\%$ Natrium oder Magnesiumsulfid (diese Zugaben sind aber oft in Hinblick für den Endverbraucher bedenklich anzusehen).

2.4. Lactose -Milchzucker

Lactose ist ein Zweifachzucker, bestehend aus Glucose und Galactose. Im Allgemeinen ist Lactose eine farblose, kristalline Substanz mit süßlichem Geschmack. Sie ist weniger wasserlöslich als manche andere Zucker. Vorliegen kann Lactose entweder als α -Lactose-Monohydrat oder als β -Lactose. Beide haben etwas unterschiedliche Kristallisations- und Löslichkeitseigenschaften.

Bei Säugetieren ist Lactose ein wichtiger Bestandteil der Muttermilch. Es hilft bei der Aufrechterhaltung einer optimalen Darmflora, da es im Darm nur langsam gespalten wird und somit auch den Dickdarm mit Nährsubstrat versorgen kann. Die Bildung von Milchsäure und Essigsäure durch Darmbakterien sorgt für ein saures Milieu, dies verhindert das Wachstum von manchen pathogenen Keimen. Die Calciumresorption des Darmes wird durch die Lactose auch verbessert. In großen Mengen hat Lactose allerdings eine abführende Wirkung.

Für die Verdaulichkeit des Zuckers ist die Spaltung der Lactose in die Einfachzucker, Glucose und Galaktose notwendig. Das dafür verantwortliche Enzym Laktase wird im Erwachsenenalter nur in geringen Mengen gebildet. Bei einem Mangel der Laktase kann die Lactose nicht verdaut werden. Man spricht dann von einer Lactoseunverträglichkeit bzw. Lactoseintoleranz. Diese ist bei manchen Menschen historisch bedingt stärker ausgeprägt als bei anderen. Bei den Nordeuropäern und einigen afrikanischen Stämmen hat sich historisch parallel zu Beginn der Viehzucht und Landwirtschaft eine Mutation durchgesetzt, die Laktase auch im Erwachsenenalter zur Verfügung stellt. In anderen Bevölkerungsgruppen, wie zum Beispiel den Bewohnern Chinas und Südostasiens, herrscht hingegen eine Lactoseintoleranz bei über 94% der Bevölkerung, wohingegen bei der schwedischen Bevölkerung 2% von Lactoseintolerant betroffen sind [4].

Der Lactosegehalt von Kuhmilch liegt bei $4,7\text{g}/100\text{g}$, der von Ziegenmilch bei $4,2\text{g}/100\text{g}$. Bei den Molken, welche bei den Versuchen verwendet wurden, wäre der Lactosegehalt je nach Art der Käseherstellung unterschiedlich gewesen, es wurde aber auf eine genauere Bestimmung verzichtet, da die Lactosegehalte im gegenständlichen Projekt peripher sind.

2.5. Milchsäure - Hydroxypropansäure

Milchsäure tritt in zwei verschiedenen Enantiomeren auf, der L(-)- bzw. der D(+)-Milchsäure. Die linksdrehende L-Milchsäure kommt im Blut, Organen und Muskulatur von Tieren und Menschen vor, wohingegen die rechtsdrehende D-Milchsäure v.a. beim mikrobiologischen Abbau von Traubenzucker entsteht.

Als physiologische Milchsäure wird die rechtsdrehende Milchsäure (L(+)-Milchsäure) bezeichnet. Physiologisch deshalb, weil sie vom menschlichen Organismus besonders gut verwertet werden kann, sie ist außerdem ein Stoffwechselabbauprodukt des menschlichen Körpers. Rechtsdrehende Milchsäure dient der Energiegewinnung im Stoffwechsel und übernimmt eine Schutzfunktion auf der Darmschleimhaut. Die linksdrehende Milchsäure (D(-)-Milchsäure) muss im Körper erst mithilfe eines Enzyms umgewandelt werden, ehe diese verdaut werden kann. Über die Nahrung zugeführte linksdrehende Milchsäure kann nur schwer vom menschlichen Körper aufgenommen werden.

Milchsäure wird auch als Lebensmittelzusatzstoff (E270) verwendet, um den pH-Wert zu verändern und so eine bessere Konvertierbarkeit zu bewirken. Es gibt keine gesetzliche Höchstmenge der Zugabe von Milchsäure (außer bei unbehandelten Lebensmitteln oder Lebensmitteln ohne Zusatzstoffe). Viele Produkte basieren auf der Milchsäuregärung wie z.B. Joghurt, Kefir, Sauerkraut und andere fermentierte Gemüse [5].

2.6. Molkenproteine

Das Eiweiß ist die wertvollste Molkekomponente, da es neben dem Hühnerei die höchste biologische Wertigkeit besitzt. Allerdings führt eine Denaturierung, durch z.B. Hitze zu einer Zerstörung der natürlichen Proteinstruktur.

Im Gegensatz zu Kaseinen enthalten die Molkenproteine weniger Glutaminsäure und Prolin, was einerseits zur Erhöhung des isoelektrischen Punktes und andererseits zur Ausbildung ausgeprägter Sekundärstrukturen führt [6].

Molkenproteine sind kugelförmige, meist mit einer α -Helix ausgestattete Proteine. Die Hauptkomponenten sind β -Lactoglobulin (~56%) und das α -Lactalbumin (~21%). Weitere Komponenten sind Serumalbumin (~7%), Immunglobuline (~14%), Lactoferrin (~2%), Lactoperoxidase (<1%) und Lysozym (0,1%).

Dieser Mix hat einige physiologisch interessante Eigenschaften und wurde schon zur Prävention von Krebs (v.a. Brustkrebs) oder Behandlung von HIV-Patienten verwendet. Sie senken den Cholesterinspiegel, stärken die Muskeln und reduzieren das Risiko für Knochenbrüche [7].

2.6.1. β -Lactoglobulin

In isolierte Form hat β -Lactoglobulin eine geringe Löslichkeit und eine geringe Ionenstärke. Es gibt einige genetische Variationen, wobei das β -Lactoglobulin A davon die Häufigste ist. Die Struktur ist hauptsächlich eine β -Faltblatt-Struktur, gebildet aus 162 Aminosäuren. Die quartäre Struktur ist vom pH-Wert abhängig. Die genaue biologische Funktion des β -Lactoglobulin ist noch immer unklar, es bindet kleine hydrophobe Liganden wie Retinol, Cholesterin und Fettsäuren. Man vermutet, dass es hauptsächlich als Nahrungsquelle fungiert sowie für den Transport von Fettsäuren durch den Magen, da es eine hohe Stabilität bei geringen pH-Werten aufweist. Lactoglobulin hat regulative Eigenschaften auf den Phosphor-Metabolismus von Säugetieren [7].

2.6.2. α -Lactalbumin

α -Lactalbumin ist ein Co-Enzym bei der Lactose-Synthese und daher für Neugeborene besonders wertvoll. Der Aufbau mit 123 Aminosäuren ähnelt es der des Lysozyms. Die globale Struktur wird mit 4 Disulfidbindungen stabilisiert. α -Lactalbumin hat eine vorbeugende Wirkung für manche Krebsarten, da die Zellteilung dadurch reguliert wird. Auch bei der Behandlung von chronischen Stresskrankheiten wird es eingesetzt, da eine Wirkung bei der Regulierung des Serotoninspiegels vorhanden ist [7].

2.6.3. Rinderalbumin (BSA - bovine serum albumin)

Rinderalbumin wird nicht in den Milchdrüsen produziert, sondern stammt aus dem Blutkreislauf des Muttertieres. Es enthält 582 Aminosäuren, besitzt 17 intermolekulare Disulfidbrücken und eine Thiolgruppe. Aufgrund der Größe und Struktur kann Rinderalbumin freie Fettsäuren, andere Lipide und sogar Geschmacksstoffe binden. Diese Fähigkeit wird aber durch eine Denaturierung gehemmt. BSA wird bei der Diagnose und der Behandlung von Tumoren verwendet. In der Immunologie dient das Protein oft zur Kalibration. Die Eigenschaft der Bindung an Fettsäuren, die als Fett im Körper gespeichert sind, führt zur Rückführung dieser in die Lipidsynthese [7].

2.6.4. Immunglobuline

Immunglobuline sind eine komplexe Proteingruppe, die von B-Lymphozyten produziert werden und vor allem Abwehrfunktionen innehaben. Sie sind in allen physiologischen Flüssigkeiten von Säugetieren enthalten. Manche heften sich an die Oberfläche und verhalten sich als Rezeptoren, andere haben die Funktion von Antikörpern. Vom Aufbau her sind sie Mono- bzw. Polymere eines vierkettigen Moleküls mit zwei leichten Polypeptidketten und zwei schwereren Ketten. Das in der Milch und Molke am häufigsten vorkommende Immunglobulin ist das

Immunglobulin G. Immunglobin wirkt gegen Gastritis sowie Karies und stärkt das passive Immunsystem [7].

2.6.5. Lactoferrin

Lactoferrin ist, wie bereits der Name beschreibt (*lacteus - milchig, ferrum - Eisen*) ein eisenbindendes, monomeres Glycoprotein, welches zwei Carbohydrat-Gruppen beinhaltet. Es gehört zur Gruppe der Transferrine, besteht aus 708 Aminosäuren und kann in Fe^{3+} reversibel binden. Der Aufbau erfolgt in zwei globulären Domänen, welche N- bzw. C-Lappen genannt werden. Der N-Lappen ist mit den Aminosäureresten 1-333, der C-Lappen mit den Aminosäureresten 345-692 aufgebaut. Die beiden Bereiche können jeweils ein Fe^{3+} Ion binden und sind durch eine kurze Alpha-Helix verbunden.

In vielen Körperflüssigkeiten von Säugetieren ist Lactoferrin vorhanden, wie Speichel, Tränen oder Schweiß. Das Lactoferrin ist üblicherweise bei Rindern bis zu 15-20% mit Eisen gesättigt. Die Konzentration von Lactoferrin in humaner Muttermilch mit 2 g/l deutlich höher als z.B. in Kuhmilch mit 0,02-0,2 g/l. Die Dissoziation des Eisens vom Lactoferrin erfolgt erst bei einem pH-Wert von 2 und findet daher kaum statt.

Lactoferrin besitzt bakterio-statische gegenüber gram-negativen Bakterien sogar bakterizide Wirkung. Es bindet nämlich das Eisen, welches diese Bakterien zum Wachstum benötigen. Durch Zugabe von Eisen kann der bakterio-statische Effekt aufgehoben werden. Manche Bakterien haben außerdem Lactoferrin-Rezeptoren, die das gebundene Eisen aus dem Enzym herauslösen können [7].

Weiteres spielt Lactoferrin auch eine Rolle bei der Prävention von manchen Autoimmunkrankheiten und Untersuchungen lassen eine antivirale und antifungale Aktivität vermuten. Es fungiert einerseits als Peptidase andererseits auch als Eisen bindendes Protein. Die genaue Funktionsweise ist noch nicht hundertprozentig bekannt, es wird allerdings vermutet, dass ein bestimmter Molekülabschnitt nach der N-Schleife für die antibakterielle Wirkung verantwortlich ist. Diese Peptid-Sequenz wurde Lactoferricin genannt.

Lactoferricin entsteht durch die im Magen stattfindende Spaltung des Lactoferrins mit Pepsin. Das Lactoferricin hat je nach Spezies einen unterschiedlichen Aufbau [8].

Die Bindungen der Ionen sind reversibel und es können auch andere Metallionen gebunden werden, allerdings ist die Affinität zu Eisen am Größten.

2.6.6. Lysozym

Lysozym ist eine Hydrolase, die die Zellwände grampositiver Bakterien lysiert. Es besteht aus 129 Aminosäuren und ist in zwei Domänen aufgebaut. Das Substrat ist Peptidoglykan, welches die beiden Domänen verbindet. Lysozym hat eine antibakterielle Wirkung, da in grampositiven Bakterien viel Peptidoglykan vorkommt. Die Struktur setzt sich ansonsten aus fünf α -Helix und fünf β -Faltblatt Bereichen zusammen, welche mit vier Disulfidbrücken stabilisiert werden. Lysozym kommt im menschlichen Körper in Speichel, Schweiß, Tränenflüssigkeit und Nasensekret vor [9].

Das Lysozym spaltet β -1,4-Glykosidische Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts der Bakterienzellwand, wodurch die Zellwand abgebaut wird.

Dieser Mechanismus funktioniert allerdings nur bei grampositiven Bakterien, zu denen Streptokokken und Staphylokokken gehören, da sie einfache Zellwände mit mehr Peptidglycanen haben. Bei gramnegativen Bakterien verhindert die äußere Membran aus Lipopolysaccheriden um die Peptidoglycanschicht ein Angreifen des Lysozyms. Diese Außenmembran kann jedoch durch Zusatz von EDTA für Lysozym durchlässig gemacht werden.

Die Lysozymaktivität variiert je nach Spezies, (extremen) Wetterbedingungen und Euterinfektionen. Sie ist z.B. in Büffelmilch ist z.B. wesentlich höher als in Kuhmilch. Die Laktationsperiode hat keinen großen Einfluss auf die Lysozymkonzentration [10].

2.6.7. Lactoperoxidase

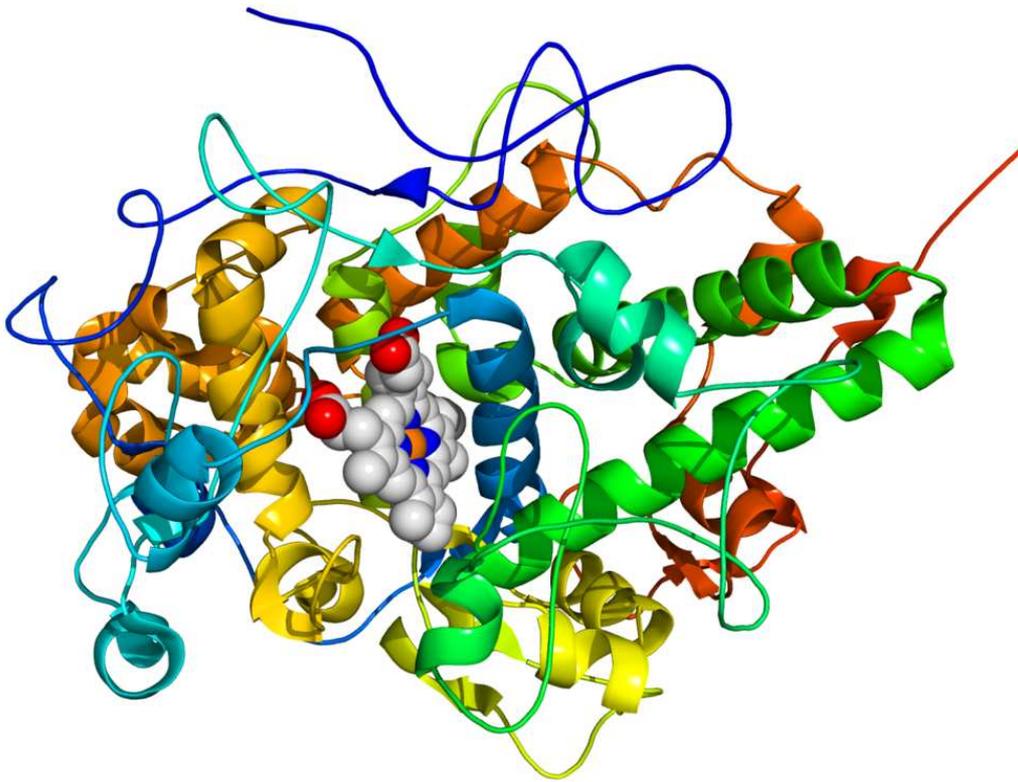


Bild 1: Bändermodell der Lactoperoxidase einer Hausziege. Das Protein ist in Regenbogenfarben dargestellt (N-Terminus = blau, C-Terminus = rot) während das Häm mit Kugeln dargestellt ist (Kohlenstoff-Atome = weiß, Sauerstoff-Atome = rot, Stickstoff-Atome = blau, Eisenatom = orange) [11]

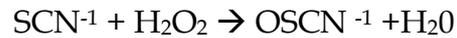
Die Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) ist ein Säugetierenzym, welches nativ in Milch vorkommt und auch in anderen Sekreten wie Speichel vorkommt. Daher spielt es auch eine Rolle in der Zahnmedizin. Es wirkt wie alle Mitglieder der Peroxidase-Familie antimikrobiell indem es eine Peroxid-Oxidation durchführt.

Bereits 1967 bemerkten FAO / WHO-Sachverständigengruppen für Milchqualität, dass ein Lactoperoxidase-Einsatz für die Milchkonservierung günstig ist. LPS-basierte Systeme sind bezüglich ihrer Durchführbarkeit und Sicherheit in mehreren Ländern getestet worden. Basierend auf diesen Tests hat der UN-Welternährungsrat, diese auch für den Einsatz in Bereichen der Milchlagerung ohne direkten Zugang zu Kühlmöglichkeiten genehmigt, da eine mehrstündige Stabilisierung ermöglicht wurde [11].

Das Lactoperoxidase-System besteht aus drei Komponenten, dem Enzym selbst, den Thiocyanat-Ionen und Wasserstoffperoxid. Vor der genauen Identifikation wurde das System als Lactenin bezeichnet. Das System erzeugt Hypothiocyanat-Ionen [12].

Diese Ionen haben bakterizide Wirkung, was auf die oxidative Natur der Hypothiocyanat-Ionen und der damit verbundenen Permeabilität der äußeren Membran zurückzuführen ist [13].

Wenn alternative Ionenarten wie Bromid und Iodid anstatt der Thiocyanat-Ionen verwendet werden, hat sich v.a. bei niedrigen pH-Werten eine signifikante virizide Aktivität gezeigt [14].



Kinetische Studien haben gezeigt, dass das beste Modell für den Mechanismus, die Reaktion in zwei separate Reaktionsschritte aufteilt: die schnelle Anfangsreaktion, bei der das Hydrogenperoxid mit dem Enzym ein Intermediat bildet und eine zweite langsamere Reaktion, bei der das Intermediat mit dem Thiocyanat-Ion das Produkt bildet.

Die zweite Reaktion ist zweiter Ordnung, und die Rate wird als mit $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ veranschlagt. Kinetisch modelliert sieht die Reaktion wie folgt aus:



Die Radikale sind anscheinend am Porphyrin-Ring der Häm-Gruppe reaktiv. Der Mechanismus findet tatsächlich in weiteren Unterschritten statt und ist somit etwas komplexer, allerdings wird die Globalreaktion dadurch grob umrissen.

Lactoperoxidase ist ein basisches Protein mit einem hohen isoelektrischen Punkt (9,6) und katalysiert mit der Ausnahme vom Chlor viele Oxidationen von Halogenionen. Das Enzym hat einen optimalen pH-Wert zwischen 5-6 und ist hitzestabil bis 70°C. Ab dieser Temperatur beginnt es bei niedrigen pH-Werten zu denaturieren. Bei einer Reduktion des pH-Wertes unter 5,8 geht aufgrund des Verlustes des gebundenen Calciums-Ion ein signifikanter Verlust der Wärmestabilität einher [15].

Moderne Messmethoden analysieren das Enzym spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm und einem Buffer von pH 6. 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz wird als Substrat für die Messung verwendet (siehe Methodik).

Struktur

Das Enzym ist ein einkettiges Glykoprotein mit einer kovalent gebundenen Häm-Gruppe und einem Molekulargewicht von 68 Dalton. Es enthält ein phosphoryliertes Serin, 4 Glykol-Seitenketten, ein Calcium-Ion und mehrere funktional gebundene

Wassermolekülen. Die Struktur besteht aus 20 α -Helices und 2 antiparallelen β -Stränge, welche ein längliches Kugelstern-Protein bilden, das zu einem scheinbar leichtbindenden Substratbindungskanal führt, an dessen Ende sich eine Eisen³⁺-Häm-Gruppe befindet. Dies ist die Seite an der die Katalyse stattfindet [16].

Primärstruktur

Die konservierte Sequenz enthält 15 Cysteinreste von denen vierzehn an Disulfidbrücken teilnehmen. Die Häm-Gruppe wird durch Esterbindungen zwischen E258 und D108 fixiert, und die modifizierten Methylgruppen befinden sich an Pyrolringen A und C. Die Häm-Gruppe selbst ist ein Derivat von Protoporphyrin IX. Die gesamte Häm-Gruppe verzerrt sich 0,1 Å in Richtung der proximalen Seite, wobei das Eisenion (Fe^{3+}) der Gruppe zusätzlich 0,1 Å in Richtung His351 zieht. Dies führt zu einer schalenähnlichen Konfiguration, wenn das ganze vom Zentrum des Enzyms weg betrachtet wird. Vier konservierte Asparagin-Reste (Asn95, Asn205, Asn241 und Asn332) sind glykosyliert, die tatsächlichen Zuckerreste variieren leicht zwischen den Arten [16].

Sekundär- und Tertiärstruktur

Die Sekundärstruktur des Enzyms besteht aus Zufallsknäueln, welche zwanzig α -Helices unterschiedlicher Länge und zwei kleine antiparallelen β -Faltblattstrukturen verknüpft.

Insgesamt besteht das Enzym zu 23% aus Alpha-Strukturen, 65% sind Beta-Struktur und der Rest ist ungeordnet. Diese Strukturen sind in einer etwas länglichen globulären Struktur mit einem deutlichen und sichtbaren Kanal (vorwiegend hydrophob) angeordnet. Dieser Kanal führt zum distalen Häm-Hohlraum [16].

Mechanismus

Trotz der Unterschiede in der Gesamtstruktur und der Ligandenbindung scheint der Mechanismus von Säugetier-Häm-Peroxidasen ähnlich den Peroxidasen von Pilzen und Pflanzen zu sein [16].

Die klassischen Mechanismen beinhalten die Bildung eines aktiven Intermediates (Verbindung I), der nachfolgenden Reaktion des Intermediates mit dem pseudohalogeniden Substrat durch Oxidation und die Freisetzung des Substrates als Säure.

Die Formung des Intermediates ist bei den Häm-Peroxidasen gut erforscht. Der zweite Mechanismus hat große Ähnlichkeit mit dem peroxidasischen Nebenreaktionspfad des Cytochrom-Zyklus. Die Interaktion der Aminosäuren stabilisiert und ermöglicht die Intermediatbildung, welche sehr schnell erfolgt. Die Kinetik dieser Reaktion ist zweiter Ordnung mit Reaktionskonstanten von 1×10^7 bis $4.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und beinhaltet 3 Grundschrte.

Zuerst bindet sich das H_2O_2 an die Häm-Gruppe, was zu einer Verdrängung von Wasser führt, dann folgt die Bildung eines Oxen-Intermediats unter Freisetzung von Wasser sowie der Zusammenfall des Intermediates zu einem Oxyferryl. Dies führt dazu, dass das Porphyrin der Häm-Gruppe einen π -Radikalzustand annimmt [11].

Häm-Gruppe

Eine kovalent gebundenes Eisen (Fe^{3+}) Häm-Gruppe ist der Ort der Katalyse bei der Lactoperoxidase und alle anderen Häm-Peroxidasen. Natürlich vorkommendes dreiwertiges Eisen ist eine sehr reaktive Spezies und zur Reduktion von vielfältigen Verbindungen fähig. Daher haben viele Enzyme mit dieser oder anderen reaktiven Eisen-Gruppen Konfirmationen, die dem Eisen erlauben, in Anwesenheit bestimmter Substrate zu reagieren.

Üblicherweise findet dies durch die Koordination statt. Die Fe^{3+} Häm-Gruppe hat allgemein eine typische Sechs-Punkt-Koordination, vier mit dem Porphyrin, eine mit dem Enzym und die sechste mit einem Wassermolekül [17].

Bei der Lactoperoxidase ist dieses Wassermolekül auf der distalen Seite des Porphyrins durch Wasserstoffbindungen koordiniert, sowohl zum Häm-Eisen als auch zum Histidinrückstand 109. Die proximale Seite des Porphyrins ist mit einem anderen Histidin-Rest 351 koordiniert [16].

Dieses Koordinierungsschema (distalen und proximalen Histidin-Reste) ist typisch für die Häm-Peroxidasen unabhängig vom Organismus. Im Fall des distalen Histidins bietet das Schema auch die geeignete Säure-Base-Umgebung zur Bildung des Intermediates.

Lactoperoxidase enthält zwei Substratbindungsstellen, eine an der aktiven Stelle innerhalb des distalen Häm-Hohlraumes und eine andere an einer nicht-katalytischen Stelle auf der Enzymoberfläche in der Nähe der Öffnung zum Hohlraum.

Der distale Häm-Hohlraum selbst ist im Inneren des Enzyms begraben und mit der Oberfläche durch einen schmalen Kanal bestehend aus hydrophoben Resten auf der einen Seite und die gebundenen Kohlenstoffatome von Arginin-Rest 255 auf der anderen Seite, verknüpft. Die Oberflächenbindungsstelle dient dazu, die Ladung in der Seitenkette von Arginin-Rest 202 zu neutralisieren und ermöglicht so eine nicht geladene Kanaloberfläche, welche nötig ist um das Substrat direkte zur aktiven Stelle zu transportieren.

Zusätzlich zur katalytischen Stelle besitzt dieser Kanal auch die Fähigkeit Protonen von und zur Oberfläche zu transportieren und ermöglicht somit die Überführung des Protons des Wasserstoffperoxids, so dass genügend Platz für die Bindung des Thiocyanats herrscht.

Dies wird durch eine Protonentransfer-Kette erleichtert, welche aus einer Reihe von Wasserstoffbindungen, beginnend mit Histidin-Rest 109, fünf gebundenen Wassermolekülen sowie der Histidin-Reste 109 und 266, Asparagin-Rest 253, Leucin-Rest 203 und Alanin-Rest 214 besteht.

Bindungen zu einem Liganden verdrängen oder entfernen eine oder mehrere der gebundenen Wasserstoffmoleküle und legen fest, ob der Ligand als Substrat oder als Inhibitor agiert [16].

Bildung des Intermediates.

Die Bildung der Intermediates, welche ein notwendiger Schritt für die katalytische Aktivität ist, erfordert ein einzelnes Wasserstoffperoxid-Molekül, welches ein gebundenes Wassermolekül neben der Häm-Gruppe ersetzt. Das Wasser entweicht, und eine Wasserstoffbrücke bildet sich zwischen dem Eisenzentrum und dem proximal orientierten Sauerstoffatom des Peroxids. Dies schwächt die Bindung im Peroxid und dem benachbarten Wasserstoffatom und führt dazu, dass eine Protonenkette fortgesetzt wird.

Gleichzeitig sind die distalen Atome Sauerstoff und Wasserstoff, obwohl untereinander in Wechselwirkungen, mit dem Glutamin-Rest 105 stabilisiert. Dies führt zu einer Spaltung der OO-Bindung und Freisetzung der Hydroxidionen, wenn der proximale Sauerstoff weiter zu dem Häm-Ion gezogen wird.

Das Ergebnis ist ein Oxen-Rest, ein starkes Oxidationsmittel in Form eines an Eisen gebundenen Sauerstoffs mit sechs Valenzelektronen, welcher sofort 2 Elektronen der Häm-Gruppe an sich zieht – ein Elektron vom Eisen, welches nun von einer Fe^{3+} zu einem Fe^{4+} wird und ein Elektron aus dem Pyrrol-Ring, was zu einem positiven Radikal führt [11].

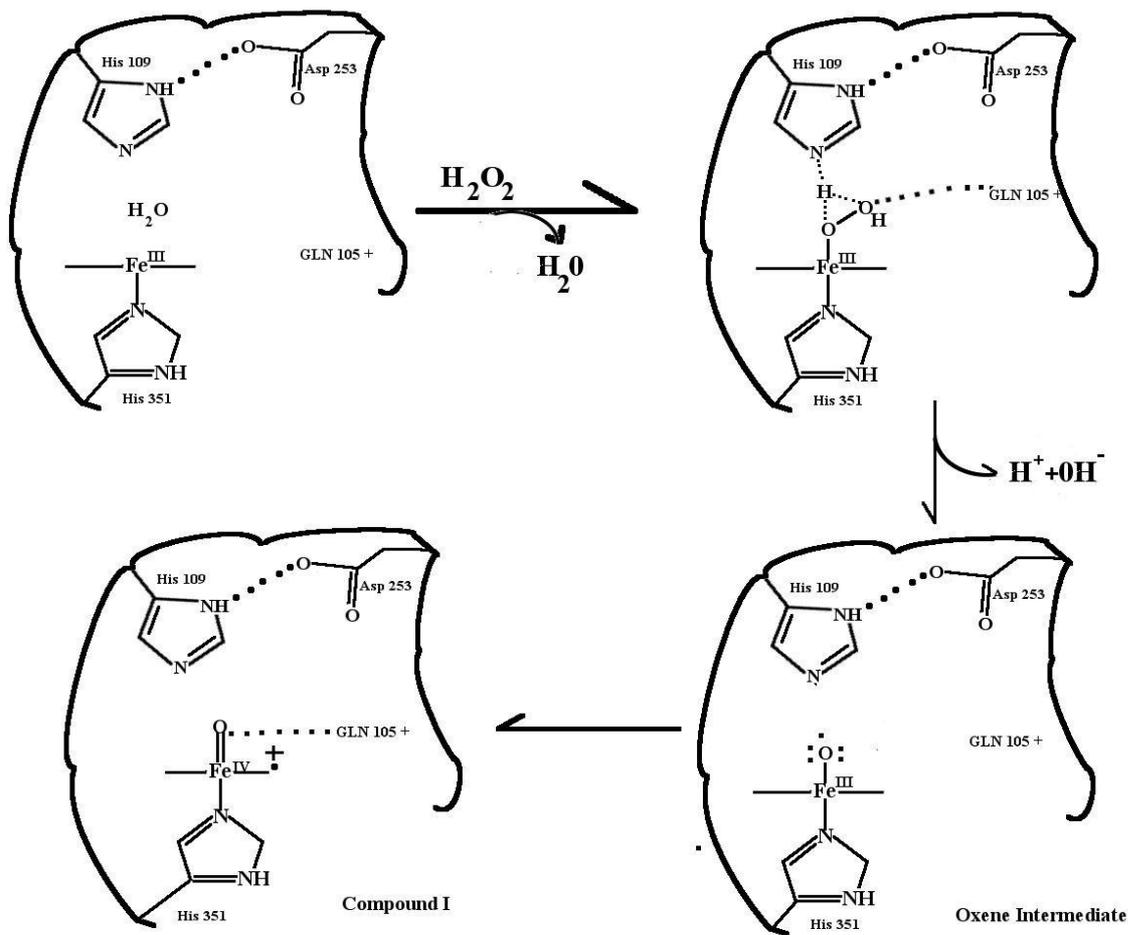


Bild 2: Bildung des Intermediates (Compound), die punktierten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar [11] [17].

Interaktion mit (Pseudo) Halogeniden

In Lactoperoxidase oxidiert das Intermediat Thiocyanationen zu Hypothiocyanat. Es ist aber auch fähig mit bestimmten anderen Halogenid- und Pseudohalogenidionen (insbesondere Jod und Brom, aber nicht Chlor) zu reagieren. Um auf den ursprünglichen nicht oxidierten Fe^{3+} Zustand zurückzukehren braucht der Oxyferryl-Radikal-Komplex zwei Elektronen. Dieser erhält das (Pseudo)Halogenidion entweder in einem einzigen Schritt, bei dem es zusammen mit einem Proton eine Dihalogenidverbindung bzw. Hydroxid-Ionen bildet, oder durch die schrittweise elektronische Oxidation der Ionen zweier freier Kationen und eines Hydroxids [15]. In beiden Fällen sind die Produkte der Reaktionen mit Wasser in der wässrigen Umgebung Hypothiocyanat-Ionen / Hypothiocyansäure.

Inhibierung

Lactoperoxidase kann von einer Vielzahl von Verbindungen einschließlich des bevorzugten normalen katalytischen Produkts - Hypothiocyanat, inhibiert werden. Das Verfahren der Hemmung scheint auf drei Mechanismen zu beruhen:

- Die Verstopfung des Kanals, welcher zu dem distalen Häm-Hohlraum führt,
- die Blockierung der Häm-Substrat-Wechselwirkungen,
- die Unterbrechung der Wassermoleküle in der Protonen bewegenden Kette.

Hypothiocyanat wirkt als kompetitiver Inhibitor, einerseits unterbricht es die Protonentransfer-Kette durch Entfernen von zwei gebundenen Wassermolekülen und verdrängt zwei andere, andererseits tritt es mit den Bindungen in Wechselwirkung.

Acetylsalicylsäure, (ASS, bekannt u.a. aus Aspirin) hemmt die Aktivität indem sie Wasserstoffbrücken mit natürlich vorhandenem Wasser bildet. Zusätzlich zu Hemmung kann Lactoperoxidase infolge von zu niedrigen pH-Werten (weniger als 4) bei längerer Belichtung, bei photochemische Reaktionen und extremer Hitze inaktiviert werden. Es kann auch zu einer inaktiven Form komplexiert werden. Dafür ist ein großer Überschuss von Wasserstoffperoxidase nötig (ca. 40-fache der normalen Konzentration). Diese Reaktion ist aber noch kaum erforscht und gilt als irreversibel.

Die höchste LPO-Aktivität wurde bis jetzt bei Meerschweinchen-Milch gemessen. Es konnten bei den Kuh-, Ziegen und Büffelmilch-Proben große Schwankungen beobachtet werden, die vermutlich mit der Jahreszeit, dem Wetter, der Laktationsperiode und dem Futter zusammenhängen.

2.7. Antibakterielle Wirkung von Molke bzw. Molkepulver

In einigen Studien wurden die antibakteriellen Eigenschaften der Molke allgemein sowie der Molkenenzyme-Lactoferrin, Lysozym und Lactoperoxidase untersucht und sind zu interessanten Schlussfolgerungen gekommen:

Z.B. zeigten weder Lactoferrin noch Lysozym einen antimikrobiellen Effekt auf *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* H157:H7. Das Lactoperoxidase-System zeigt hingegen einen starken Effekt gegen diese Pathogene. In Kombination mit einem Molkefilm veränderten sich aber die mechanischen Eigenschaften des Films: Die Farbe blieb zwar gleich, aber die Sauerstoffdurchlässigkeit nach zu, wohingegen die Zug-Eigenschaften abnahmen [18].

Gegen *Penicillium commune* wirkt Lactoferrin bei einer Konzentration von 10mg/ml in 1% peptonischen Wasser aber nicht in einer Kartoffel-Traubenzucker-Brühe. Das Lactoperoxidase-System wirkt 0,1%ig (w/w) in beiden Medien. Die Wirkung der

Lactoperoxidase scheint auch bei komplexeren Systemen einzusetzen. Die Zugabe von Lactoperoxidase zu einem Molke-Film änderte dabei die mechanischen Eigenschaften nicht signifikant [19].

Diese Studien bezogen sich v.a. auf den Einsatz in der Lebensmittelbranche, wo ein Einsatz unter anderem in wärmeren Ländern wie Pakistan, die v.a. in den Sommermonaten Probleme mit der Milchkühlung haben [20].

Die Tendenz der Molke, Biofilme zu bilden, kann auch zum antimikrobiellen Effekt führen. Die minimale Inhibierungskonzentration ist, natürlich von Mikroorganismus zu Mikroorganismus unterschiedlich. Bei zwölf verschiedenen untersuchten Stämmen (hauptsächlich Escherichia coli- und Salmonellenarten) inhibierte eine Molkepolverkonzentration von 500 µg/ml. Daher wird der Molke auch hier ein großes antimikrobielles Potenzial zugeschrieben [21].

2.8. Hitzebehandlung

Eine der Hauptänderung bei Erhitzung von Molke ist die Denaturierung der Molkeproteine. Dies äußert sich in übermäßiger Trübung, erhöhte Viskosität, Phasenseparation, Fällung und Gelierung.

Hitzebedingte Denaturierung von Molkeproteinen beinhaltet eine Entfaltung des Proteins mit einer darauffolgenden Aggregation, diese wird durch Protein-Interaktionen untereinander stark beeinflusst.

Eine Möglichkeit der Interaktion sind z.B. Disulfidbrücken, welche nicht reversibel gebildet werden. Die thermische Aggregation ist von der Temperatur, der Ionenstärke (Salz Konzentration), der Ionenquelle und dem pH-Wert abhängig. Im Allgemeinen erhöhen große, dicht Aggregate die Trübung, wohingegen kleine und mehr lineare Aggregate einen Effekt auf die Viskosität haben.

Die Interaktion grenzflächenaktiver Stoffe und Molkeproteine beeinflusst die Hitzestabilität. Zugabe von Lysolecithin, ein Emulgator, verbessert die Hitzestabilität der Molkeproteine und verzögert die Gelbildung. Am Effizientesten erhöhten aber hydrophile Tenside die Hitzestabilität, dies haben auch NMR Untersuchungen untermauert.

Die Größe der hitzebedingten Aggregationen kann auch durch unterschiedliche Methoden beeinflusst werden. Zugabe von Zucker, enzymatische Vernetzung, Komplexierung mit Mineralien und Ultraschallbehandlung können dafür verwendet werden.

Die enzymatische Hydrolyse ermöglicht eine Kontrolle der Protein Aggregate u.a. durch die Produktion von Peptiden, welche Aufgrund ihrer sekundären Struktur geringe Änderungen im Erhitzungsprozess erfahren [22] [23].

Insgesamt lassen sich die Molkeproteine bezüglich ihrer Hitzestabilität folgendermaßen aufzählen, beginnend beim Hitzestabilsten: Lactoperoxidase,

Lysozym, Lactoferrin, Immunglobulin, Lactoalbumin, Lactoglobulin und Serumalbumin [24].

Die für das Projekt interessante LPO -Aktivität nimmt nach einer Pasteurisierung (62°C für 30 min) bei Kuhmilch nicht ab, bei Schaf- und Ziegenmilch nimmt sie um ca. 5% ab. Bei Milch, welche mit einer kurzzeitigen, höher temperierten Pasteurisierung (75°C für 28 s) behandelt wurde, nahm die Aktivität um 39% bei Kuh-, 53% bei Schaf- und 43% Ziegenmilch ab. Daher ist eine Niedrigtemperatur-Pasteurisierung für Lactoperoxidase vorzuziehen [25].

Untersuchungen der Lactoperoxidase -Aktivität bei den Lagertemperaturen -20, 4 und 25°C während einer Lagerzeit von 4 Wochen haben interessante Erkenntnisse gebracht. Die Resultate zeigen, dass alle Formen der Molke einen antimikrobiellen Effekt auf Salmonella enteritidis haben. Die Lactoperoxidase-Aktivität nimmt aber bei einer Lagerung bei 25° C innerhalb von 2 Wochen sehr stark ab, bei einer Lagertemperatur von 4° sinkt die Aktivität auch beträchtlich, allerdings ist sie noch immer vorhanden. Bei einer Lagertemperatur von -20 Grad sinkt die LPO-Aktivität sehr wenig. Diese Art der Lagerung ist aber bei den gegenständlichen Untersuchungen allerdings nicht weiter ausgeführt [26].

Thiocyanat hat keine nennenswerten Modifikationen bei Hitzebehandlung gezeigt. Dennoch wurde aufgrund der besseren Durchführbarkeit eine Zugabe nach der Erhitzung forciert. Eine weitere Möglichkeit wäre die Zugabe von H₂O₂ und Thiocyanat, da die LPO-Konzentration kein limitierender Faktor des Systems ist, ob dies allerdings mit den Richtlinien des biologischen Weinbaues einhergeht ist anzuzweifeln [27].

Einige Vorarbeiten von Ahmed Abdelaaty haben gezeigt, dass eine Pasteurisierung der Molke von 65 °C 5 Minuten lang die LPO-Aktivität am Günstigsten beeinflusst. Vorabversuche mit 65 °C bei 15 bzw. 30 Minuten, 68°C 15 Minuten und 72 °C 15 Minuten wurden anfangs unternommen.

2.9. Weinbau und Rebkrankheiten

2.9.1. Ökologischer Weinbau

Unter biologischen oder ökologischen Weinbau versteht man die Herstellung von Trauben und Wein mit möglichst naturschonenden Pflegemethoden wie Bodenpflege, Düngung und Pflanzenschutz unter Berücksichtigung von Erkenntnissen der Ökologie und des Umweltschutzes. Der Verzicht auf künstliche Düngung sowie chemische Pflanzenschutzmittel stellt die Weinbauern dabei immer wieder vor Herausforderungen.

Der Anfänge des biologischen Weinbaues sind schwer zu datieren. Fritz Stellwaag wies 1924 bereits auf eine ganzheitliche Betrachtung des Weinbaues hin. In den mediterranen Weinbauländern Europas hat eine biologische Bewirtschaftung schon in den 1950er-Jahren begonnen. In diesen Ländern stellen aufgrund des trockenen Klimas Pilzkrankheiten eine geringere Bedrohung dar als in Mitteleuropa. Konkrete Konzepte für den ökologischen Weinbau wurden in den 1960er-Jahren erstellt, mittlerweile gibt es strenge EU-Richtlinien, die Pflanzen- und Düngemittel regeln und Kontrollen vorschreiben.

Ziele des biologischen Weinbaus sind unter anderem die Artenvielfalt und die Bodenpflege. Aber vor allem die Nachhaltigkeit und Ganzheitlichkeit steht im Vordergrund.

Bei der Bodenpflege versucht man, ein Fundament zu schaffen, auf dem eine gesunde Fauna existieren kann. Lockernde Bearbeitung, organische Düngung und Humusgaben helfen die Bodenqualität zu steigern.

Die Artenvielfalt im Weingarten soll es Schädlingen schwerer machen, sich in den Weinreben einzunisten und diese zu befallen. Der biologische Weinbau schließt einen Verzicht auf viele Spritzmittel ein. Anstelle von Pflanzenschutzmitteln werden Pflanzenstärkungsmittel verwendet, diese haben im Allgemeinen aber eine geringere Wirkung auf die Pflanzen. Sie haben keinen wesentlichen Nährstoffgehalt, aber erhöhen die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegen Krankheiten/Schädlinge ohne diese direkt zu reduzieren [28].

Im biologischen Weinbau werden Pflanzenstärkungsmittel v.a. gegen die häufigsten drei Pilzkrankheiten benötigt, die große Auswirkung auf die Ertragsmenge haben. Diese sind Botrytis - Graufäule, echter Mehltau - Oidium und falscher Mehltau - Peronospora.

2.9.2. Echter Mehltau - Oidium

Der Erreger des echten Mehltaus ist der Schlauchpilz *Erysiphe necator*. Ursprünglich stammt der Pilz aus Nordamerika, wurde aber ca. 1845 nach Europa eingeschleppt.

Echter Mehltau (Oidium) befällt vorwiegend die Oberseite von Blättern, es können aber auch Triebe und Beeren der Pflanze betroffen sein. Einige Erysiphaceenarten wachsen oberflächlich auf dem Wirt und überziehen ihn mit einem mehlintigen Belag. Dieses Mycel (Pilzgeflecht) ist abwischbar und bildet Haustorien aus. Diese Haustorien fungieren als Saugorgane, können die Zellwand (Epidermis) durchdringen (allerdings nicht die Plasmamembran) und entziehen der Pflanze Nährstoffe. Dies kann zu Verfärbungen, Austrocknung und Abfall des Blattes führen.

Die Überwinterung des echten Mehltaus findet dabei als Mycel zwischen Knospenschuppen bzw. als Wintersporen statt. Im Frühjahr werden Konidien gebildet und diese von Insekten und Wind verbreitet. Bei frühem Befall kann es zu gestauchten Trieben und zum Aufplatzen der Beeren (Samenbruch) führen.

Starker Vorjahresbefall, ein milder Winter, trockenes Wetter und geringe Temperaturunterschiede begünstigen den Befall. Der Erstbefall kann schon im Frühjahr erfolgen, der Hauptbefall findet aber in den Sommermonaten statt. Ab einer Luftfeuchtigkeit von 70% ohne Blattnässe kann eine Infektion erfolgen, je nach Temperatur liegt die Inkubationszeit zwischen 5 bis 14 Tagen.

Vorbeugende Maßnahmen sind u.a. die Verwendung Oidium-toleranter Sorten, das Entfernen von Unkraut bzw. befallenen Triebspitzen, gute Lüftung der Laubwand/des Mulches und das Vermeiden von stickstoffhaltiger Düngung.

Pflanzenschutzmittel dagegen gibt es auf Schwefelbasis - diese sind aber im biologischen Weinbau verboten. Pflanzenstärkungsmittel können sehr unterschiedlicher Herkunft sein. Manche sind auf Natriumhygrogenbasis, andere beinhalten Kieselsäure, aber auch Fenchel, Stachelhalmextrakt oder Molke. Eine Backpulver-Rapsöl-Wasser-Mischung wird z.B. bei Stachelbeermehltau empfohlen [29].

2.9.3. Falscher Mehltau – Peronospora

Der falsche Mehltau ist eine andere Gruppe von Pilzerkrankungen bei Weinreben und wird auch Peronospora genannt. Erreger ist der Pilz *Plasmopara viticola*, welcher 1878 nach Europa eingeschleppt wurde.

Man vermutet, dass er von gegenüber der Reblaus resistenten Weinreben aus Nordamerika eingeschleppt wurde und in Europa keine nennenswerten Resistenzen vorfand.

Bei starkem Befall kann es aufgrund der Verringerung der Assimilationsfläche zu großen Ertragsverlusten kommen. Die Qualität der Lese wird vermindert und die Holzreife verringert. Eine erhöhte Anfälligkeit des Weinstockes gegen Frost tritt ebenfalls auf.

Die Oosporen des Pilzes überwintern im Laub. Ab Tagesmindesttemperaturen von 8°C und Durchnässung des Bodens bilden sich im Frühjahr Primärsporangien. Ein Durchmesser des Blattes von 5mm sowie eine 5-stündige Blattnässe sind für die Kontamination ebenfalls erforderlich. Bei ausreichender Temperatur und Feuchtigkeit (>95% relativer Feuchtigkeit) werden dann gezeißelte Zoosporen in das Kontaktwasser befördert. Diese schwimmen dann zu den Spaltöffnungen der Blätter und lösen so einen Befall aus. Die Inkubationszeit beträgt je nach Temperatur 4-12 Tage.

Es bildet sich dann eine Infektionshyphe, welche in Kontakt Zellwände durchdringen kann und so Nährstoffe entzieht. Sichtbar ist der Befall anfangs durch die Bildung von „Ölflecken“ an der Blattoberseite, später durch weiß-graues Mycel an der Blattunterseite. Die gefährlichste Zeit für die Infektion ist in der Blütenphase. Die Vermehrung findet v.a. im Herbst durch Kontakt gegengeschlechtlicher Hyphen statt [29].

Vorbeugende Maßnahmen sind neben dem Pflanzen von pilzresistenten Sorten eine gute Durchlüftung der Laubwand, hierbei ist v.a. locker, luftig und schnell abtrocknend von Vorteil, sowie eine gute Begrünung des Bodens. Diese Begrünung bewirkt einerseits, dass die Spritzintensität der Regentropfen reduziert wird, andererseits kann eine erhöhte mikrobielle Aktivität am Boden dazu führen, dass auskeimende Oosporen abgetötet werden.

Pflanzenschutzmittel gegen Peronospora sind meistens auf Kupferbasis und unterliegen in Österreich einer sehr starken Reglementierung. Insgesamt ist eine prophylaktische Behandlung unter Berücksichtigung der Witterungsbedingungen meist die Methode der Wahl. Der wichtigste Bekämpfungszeitraum ist wie bei Oidium die Blüte/abgehende Blüte. Die Begrenzung erfolgt hierbei meist mit einer maximal ausgebrachten Kupfermenge pro Jahr und Hektar [29].

Es wurde einiges versucht um Kupfer bei der Bekämpfung zu ersetzen. Sogar Versuche mit Pulver aus indischen Waschnüssen wurden durchgeführt, allerdings traten dabei Probleme bei der Benetzung der Blätter auf [30].

Aufgrund eines wechselnden Infektionsdruckes ist allerdings der Verzicht von Kupfer in der Peronospora-Behandlung vorerst nicht abzusehen [29].

2.9.4. Grauschimmelfäule - Botrytis

Die Grauschimmelfäule ist ein Schimmelpilz aus der Gattung Botrytis. Der Hauptschaden besteht aus grauen Faulstellen auf den reifen Trauben.

Die Überwinterung erfolgt als grau/braunes Mycel oder Sklerioten auf abgestorbenen Pflanzenteilen. Für die Sporenkeimung ist eine Temperatur über 0°C und min. 2 Stunden tropfbares Wasser nötig. Bestimmte Enzyme durchdringen die Schale der Beeren- dies kann durch Schadstellen von Wespen, Hagel, Sauerwürmer,... noch schneller erfolgen. Nach Befall verfärbt sich die Beerenhaut braun und es entwickelt sich ein brauner Pilzrasen. Bei feuchter Witterung mit warmen Temperaturen ist die Ansteckungsgefahr besonders groß.

Erreicht der Pilz Traubentiele, kann es zum Abfall der Beeren kommen. Maßnahmen gegen einen Befall ist eine Bekämpfung des Sauerwurms, um Schadstellen an der Traube zu vermeiden, eine Reduzierung der Stickstoffdüngung, ausreichende Begrünung sowie die Förderung einer gut durchgelüfteten Laubwand. Es gibt aber auch speziell resistente Rebstämme. Konventionelle Pflanzenschutzmittel sind meist auf Kupferbasis und werden oft mit Peronospora-Profilaxen kombiniert [29].

In Australien wurden bereits versuche mit Molke als Fungizid gegen echten Mehltau durchgeführt. Dabei wurde einerseits in einem Gewächshaus andererseits am Weinberg gearbeitet. Molke zeigte dabei eine gute Wirkung, ebenso Milch. Die dabei verglichenen Mittel, wie Bacillus subtilis, Kaliumbicarbonat und Rapsöl erwiesen sich nur im Gewächshausversuch als effektiv.

Mithilfe von Elektronenspinresonanz-Untersuchungen wurde festgestellt, dass verschiedene Bestandteile der Molke, wie Lactoferrin und Lactoperoxidase Sauerstoffradikale produzieren. Diese Radikale könnten für die fungizide Wirkung verantwortlich sein. Allerdings wurde bei den Versuchen die Molke aus Molkepulver hergestellt und nicht wie bei unseren Untersuchungen direkt aus der Käserei verwendet.

Je nach Standort war die Wirkung allerdings unterschiedlich, daher wurden weitere Untersuchungen, welche Spritzoptimierung, den Luftfeuchtigkeitsgehalt, Regenereignisse und die Lichtintensität beinhalten empfohlen. Da die Klimabedingungen sich in Australien grundlegend von Europa unterscheiden, ist eine Übertragung der Untersuchung allerdings nicht direkt möglich. Bei den Untersuchungen wurde auch nicht speziell auf den biologischen Weinbau eingegangen [31].

3. Materialien

3.1. Molkeproben

Die Ziegenmolke entstand bei der Käseproduktion direkt in der Käserei von Robert Paget, Kirchenweg 6 A- 3492 Diendorf am Kamp, wohingegen die Kuhmolke vom Biohof Hannes Steiners aus Gars am Kamp bezogen wurde. Die Molke wurde bei der Camembert und Weichkäse Herstellung gewonnen, welche üblicherweise mit der Mischung 1:2 Ziegenmilch-Kuhmilch durchgeführt wurde. Das heißt es wurde nur Süßmolke. Bei einem Einsatz von 6 Liter Milch werden bei der Käseproduktion in etwa 4 Liter Molke produziert.

Das Molkegemisch wurde jeweils montags bzw. dienstags hergestellt. Die Lieferung erfolgt dann am folgenden Mittwoch in einer Kühltasche. Davor wurde die Molkeprobe in einem Kühlraum bei 4°C gelagert.

Die weitere Lagerung der Molke erfolgte (bis auf eine Ausnahme), bei 4°C in abgedeckten Gefäßen in Kühlschränken. Die reale Temperatur der Kühlschränke wurde regelmäßig überprüft.

Die für die Sprühversuche verwendete Molke bestand jeweils aus gleichen Teilen Ziege- und Kuhmolke, welche vor Ausbringung noch 1:2 mit Wasser verdünnt wurde.

3.2. Biospritzmittel

Das Biospritzmittel wurde mit folgender Mischung in Wasser zusammengestellt:

0,1% Citronensäure

1,0% Schwefel Stulln®

1,0% Myco-Sin Vin®

0,05% Wetcit®

0,3% Resistance®

4. Methodik

4.1. Untersuchungen an Molke

Im Zeitraum von April bis August wurden Untersuchungen zur Lactoperoxidase-Aktivität (LPO-Aktivität), dem pH-Wert und der Keimzahl der Molkeproben aus der Käserei von Robert Paget durchgeführt.

Die Proben waren bis auf eine Ausnahme eine Mischung aus gleichen Teilen Ziegen- und Kuhmolke. Die Molke wurde jeweils am Montag oder Dienstag hergestellt und am Mittwoch zusammen mit Blattproben angeliefert. Als Beginn der Lagerung wurde jeweils der Produktionstag angeführt, da dieser allerdings für die Laboruntersuchungen nicht zugänglich war, begannen die Analysen üblicherweise nach Ankunft der Probe. Daher war eine LPO-Aktivitätsbestimmung erst ab dem dritten Tag der Lagerung möglich. Aufgrund der zuvor erwähnten guten Lagerung sollte durch dieses Verfahren keine große Beeinträchtigung der Analysendaten erfolgt sein.

Für die Erhitzung der Molkeproben im Labor wurde ein Wasserbad so eingestellt, dass die gewünschte Kerntemperatur in der Molkeprobe erreicht wurde, die Abkühlung erfolgte in einem Wasserbad mit 4 °C.

Die LPO-Aktivität wurde danach mit Hilfe der DIN-Norm 10483-1 untersucht. Der pH-Wert wurde anfangs ebenfalls zusammen mit jeder LPO-Messung dokumentiert, allerdings zeichnete sich hier nach einigen Untersuchungsreihen ein einheitlicher Verlauf der Molkeproben ab, woraufhin der pH- Wert nur mehr 1x wöchentlich zur Kontrolle bestimmt wurde.

Es wurde auch eine Keimzahlbestimmung mit Hilfe des Plattengussverfahrens auf Basis der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl durchgeführt. Die Werte dieser Bestimmungen werden ebenfalls angeführt und diskutiert.

4.2. pH-Wert

Die pH-Werte wurden bei 25°C bestimmt. Dazu wurde ein laborübliches pH-Meter verwendet, welches regelmäßig kalibriert und kontrolliert wurde.

4.3. Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Für die Keimzahlenbestimmung wurden zuerst folgende Laborutensilien autoklaviert:

Destilliertes Wasser in einem Kolben

10 ml Messpipetten

Pipettenspitzen

500 ml Agar (10,25g in 500ml Wasser aufgelöst)

Reagenzgläser

Nach der Autoklavierung wurden die Laborgeräte in einer Sterilbox aufbewahrt und steril folgende Arbeitsschritte durchgeführt.

Zuerst wurden in je 4 Reagenzgläsern 9 ml autoklaviertes Wasser gefüllt. Danach wurde in das Erste mit Hilfe der autoklavierten Spitzen 1ml der Probe zu jeweils 9 ml Wasser hinzugegeben. Die Mischung wurde gut vermischt und danach 1 ml der Suspension in das zweite Reagenzglas (ebenfalls mit 9 ml autoklaviertem Wasser) gefüllt.

Diese Verdünnungsreihe wurde üblicherweise in dem Bereich einer Verdünnung von 1:10-1:10⁴ durchgeführt. Allerdings gab es bei manchen Bestimmungen, bei denen eine höhere Keimzahl zu vermuten war, auch Verdünnungsreihen bis zu Konzentrationen von 1:10⁶.

Nach der letzten Durchmischung wurde aus dem jeweiligen Reagenzglas 1ml Suspension entnommen und in eine Einweg-Plastik-Petrischale gegeben.

Diese Petrischale wurde dann mit 10 ml Agar befüllt und die Flüssigkeiten gut vermischt.

Nach dem Verfestigen des Gemisches wurden die Proben bei 30°C 3 Tage im Brutschrank aufbewahrt bevor eine Keimzählung mit Hilfe eines Schütt-Kolonien-Zählgeräts durchgeführt wurde. Es wurden üblicherweise zwei Messungen bei jeweils vier verschiedenen Verdünnungsverhältnissen durchgeführt und die Keimzahl dann aus diesen Daten zuerst gemittelt und dann extrapoliert.

4.4. Mikroskopische Untersuchungen

Für die mikroskopischen Untersuchungen der Blätter und Trauben wurde ein Leica M125 Stereomikroskop mit einer Leica DFC 290 HD Kamera verwendet. Die Bildgröße entspricht dabei 6,5 zu 4,88 mm.

4.5. Bestimmung der Lactoperoxidase-Aktivität

Die Lactoperoxidase-Aktivität-Bestimmung wurde nach DIN Norm 10483-1:2002-08 durchgeführt, deren wichtigste Schritte werden hier angeführt:

4.5.1. Chemikalien

Wasser:

Das verwendete Wasser war bidestilliert.

Pufferlösung, pH=6,0

0,72 g (8,09 mmol/l) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 3,99 g (58,6 mmol/l) Kaliumdihydrogenphosphat wurde zusammen in einen 500 ml Kolben gegeben und der Kolben mit Wasser befüllt. Der pH-Wert wurde dann bei einer Füllmenge von 450 ml mit einem pH-Meter überprüft und gegeben falls mit einer Säure/Base auf 6,0 eingestellt.

Wasserstoffperoxid:

Für die Wasserstoffperoxidlösung wurden 0,1 ml Wasserstoffperoxid, $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 30\%$ in einen 100 ml Messkolben pipettiert und bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt.

Reagenzlösung, $c(\text{ABTS-Diammoniumsalz; C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4(\text{NH}_4)_2) = 2 \text{ mmol/l}$

55 mg 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz wurden in einen 50 ml Messkolben eingewogen und in ca. 30 ml der Pufferlösung gelöst. Anschließend wurde 1,0 ml (etwa 0,2 mmol/l) der Wasserstoffperoxidlösung (5.3) zugegeben und mit der Pufferlösung bis zur Marke aufgefüllt.

4.5.2. Molkeproben Vorbereitung

Die Molkenproben wurden für die Analyse mit Wasser im Verhältnis 1:25 verdünnt.

4.5.3. Geräte

Bei den Laborgeräten wurden u.a. ein Photometer der Marke HITACHI U-2000, (Doppel-Beamspectrophotometer) verwendet.

4.5.4. Bestimmung

Das Photometer wurde auf 420 nm Wellenlänge eingestellt. 2 ml der Reagenzlösung wurden in eine Plastikkuvette pipettiert und die Küvette auf 25°C temperiert. In die Küvette wurden dann 0,05 ml der verdünnten Molkeprobe zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde durchmischt, abgedeckt und die Küvette in das Photometer gestellt. Nach exakt 2 Minuten erfolgte die Extintionsmessung.

Berechnung

Die Lactoperoxidase wird in Units je Liter angegeben, daher ist eine Umrechnung mit folgender Formel notwendig

$$\alpha_{\text{LPO}} = \frac{V1 * \Delta E * F * 1000}{\epsilon * d * V2 * 2}$$

V1..... Gesamtvolumen der Messlösung in ml

V2..... Volumen der Probenverdünnung in ml

ΔE $(E_2 - E_1)/\text{min}$

ϵ Extinktionskoeffizient des oxidierten ABTS bei 420nm

d..... Schichtdicke der Küvette in cm

F..... Verdünnungsfaktor

5. Ergebnisse

5.1. Molke vom 8.4.2014

Dieser Versuch sollte einmal die grundsätzliche Veränderung der Lactoperoxidase bei unterschiedlichen Lagertemperaturen verdeutlichen.

Es wurde auch ein Teil der jeweiligen Molke am zweiten Lagertag im Labor auf 65°C 15 Minuten lang erhitzt, um einen Vergleich zur jeweiligen unbehandelten (oder auch als original bezeichneten) Molke zu erhalten. Die Abkühlung der behandelten Molken danach erfolgt in einem Wasserbad bei 4 °C, dann wurden diese Proben ebenfalls bei der jeweiligen Temperatur gelagert.

Im Zuge der Erwärmung wurde auch ein Erhitzungsversuch mit 72 °C für 15 Minuten durchgeführt, allerdings war danach keine LPO-Aktivität mehr nachweisbar. Daher wurden diese Daten nicht in die Auswertung mit einbezogen. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten bezüglich der Stabilität von LPO überein [25]. Daher wurde in Folge nur mehr bis max. 70°C erhitzt.

Vor dem Transport in unser Labor wurden alle Proben in der Käserei bei 4°C gelagert.

5.1.1. LPO-Aktivität der Molke vom 8.4.2014

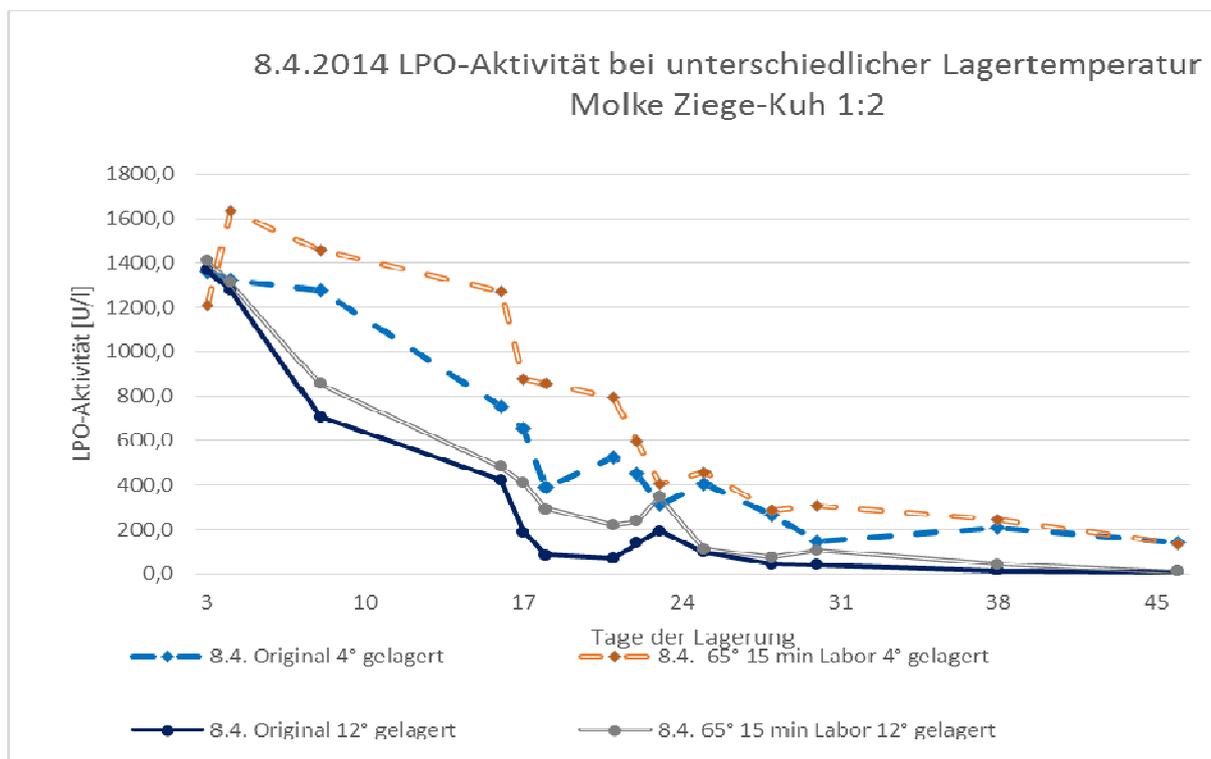


Diagramm 1: LPO-Aktivität der Molke vom 8.4.2014 (Lagertemperaturvergleich)

Insgesamt fällt auf den ersten Blick auf, dass die bei 4°C gelagerte Molke ab ca. einer Woche wesentlich bessere LPO-Aktivitäten aufweist als die bei 12°C gelagerte Molke. Die LPO-Aktivitäten der hitzebehandelten Molke hat bis zum Ende der Analysen als sich die Werte bei der jeweiligen Lagerung stark aneinander annäherten, einen höheren Wert als die unbehandelte Molke.

Der anfänglich niedrige Wert der erhitzten Molke im Vergleich zur originalen Molke ist möglicherweise auf einzelne Denaturierungseffekte zurückzuführen. Insgesamt ist dieser Verlauf der LPO-Aktivität sehr charakteristisch für die Molkelagerung.

In weiterer Folge der Untersuchungen wurde Molke immer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Eine tiefere Temperatur wäre projektbedingt nicht sinnvoll gewesen, da die Käserei ebenfalls bei 4 °C lagert und selbst keine Möglichkeit besitzt, die Proben bei tieferer Temperatur zu lagern. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Verlust an LPO-Aktivität bei tieferen Temperaturen wesentlich geringer wäre, ob dies allerdings den deutlich höheren Aufwand rechtfertigt, bleibt abzuwägen [26].

Nun folgt eine kurze statistische Auswertung des Versuchs, wobei v.a. die Daten der behandelten und unbehandelten Molke vom 8.4.2014 in Relation gebracht werden. Dabei wurde jeweils die Abweichung des Wertes der behandelten Molke mit dem Wert der unbehandelten Molke bei derselben Lagertemperatur verglichen. Die Werte waren bis auf den Anfangswert der bei 4 °C gelagerten Molke alle positiv - d.h. der LPO-Aktivitätswert der Molke erhöhte sich durch die Behandlung.

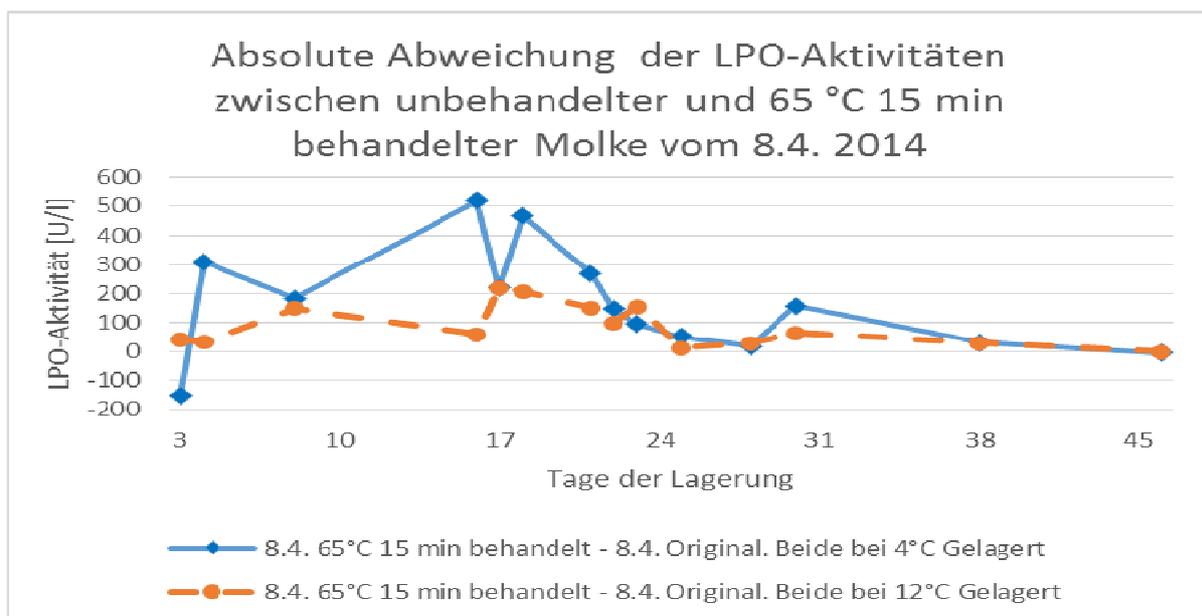


Diagramm 2: Absolute Abweichung der Molke vom 8.4.2014 bei 65° 15 min behandelten Molken zum jeweiligen unbehandelten Pendant.

Anfänglich fällt die negative Abweichung (also ein besserer Wert der unbehandelten Molke im Vergleich zur behandelten Molke) der bei 4°C gelagerten Molke auf. Dies kann -wie oben erwähnt- auf Erwärmungseffekte zurückzuführen sein, da ab 4-tägiger Lagerung die behandelte Molke bessere LPO-Aktivitäten zeigt. Ab ca. 23 Tagen der Lagerung nähern sich die LPO-Aktivitäten einander wieder an.

Da die Absolutwerte aber ohne genauen angeführten Bezug schwerer zu interpretieren sind, wurde auch eine relative Abweichung der behandelten Molke zur unbehandelten Molke durchgeführt. Dafür wurde der jeweilige Absolutwert der LPO-Aktivitätsabweichung durch den Wert der LPO-Aktivität der unbehandelten Molke zum selben Zeitpunkt dividiert und in Prozent umgerechnet.

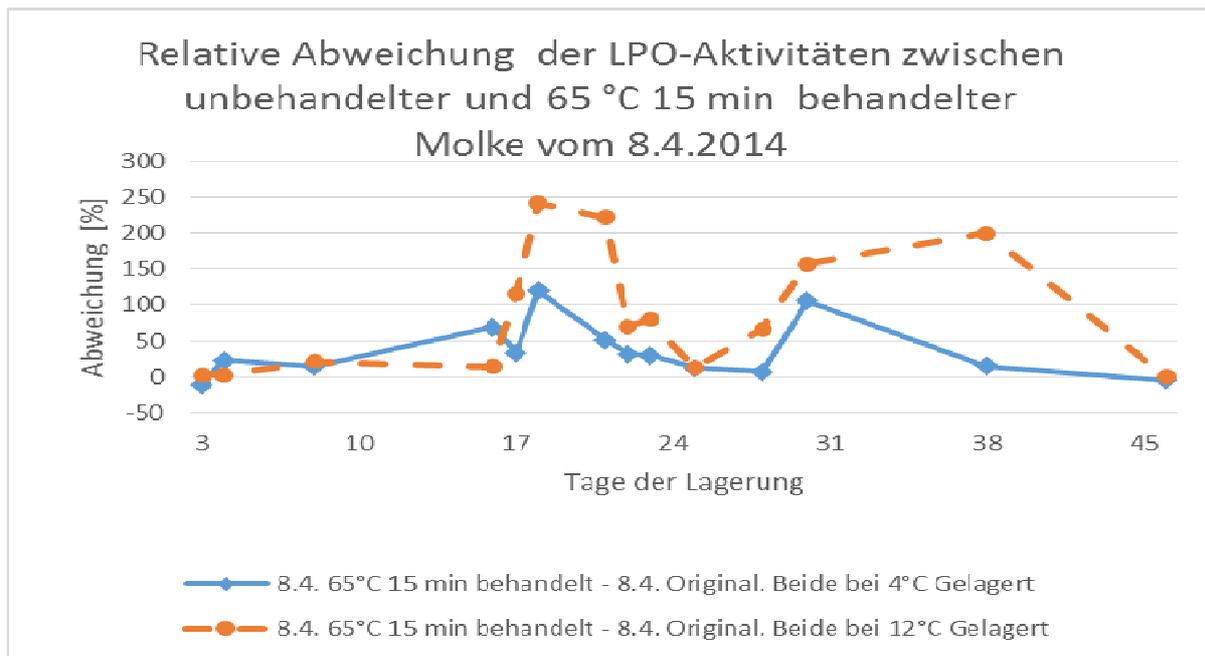


Diagramm 3: Relative Abweichung der Molke vom 8.4.2014 bei 65° 15 min behandelten Molken zur jeweiligen unbehandelten Molke

Hierbei fällt auf, dass die Abweichungen im Zeitraum des 17-21 Lagerungstages am größten sind. Ein weiterer größerer Anstieg der LPO-Aktivitätsunterschiede war auch an den Lagertagen 30 bzw. 38 festzustellen, allerdings sind dabei die Absolutwerte des LPO-Aktivitäten wesentlich geringer als bei den Daten der dritten Lagerwoche.

Mithilfe einer Mittelwertbildung bzw. Standardabweichungsbestimmung werden nun die Daten etwas genauer analysiert:

	Mittelwert	Standardabweichung
Absolute Abweichung der LPO-Aktivität der bei 65°C 15 min behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten, beide bei 4°C gelagert	165[U/l]	177[U/l]
Absolute Abweichung der LPO-Aktivität der bei 65°C 15 min behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten, beide bei 12°C gelagert	89[U/l]	71 [U/l]
Relative Abweichung der LPO-Aktivität der bei 65°C 15 min behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten, beide bei 4°C gelagert	36[%]	37[%]
Relative Abweichung der LPO-Aktivität der bei 65°C 15 min behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten, beide bei 12°C gelagert	86[%]	84[%]

Tabelle 4: Abweichungen der LPO-Aktivitäten der Molke von 8.4.2014

Die relative Abweichung der bei 12°C gelagerten Molke ist gemittelt wesentlich höher als der Wert der bei 4°C gelagerten Molke. Daraus lässt sich folgern, dass eine Erhitzung vor allem bei ungünstigen Lagertemperaturen sinnvoll ist. Allerdings ist auch die mittlere Zunahme bei 4°C von 36% durchaus in einer Größenordnung bei der man von einem sinnvollen Prozessschritt sprechen kann. Am Ende der Lagerzeit scheint der Effekt der Wärmebehandlung nachzulassen, die beiden Aktivitätskurven nähern sich wieder an.

5.1.2. Keimzahlen der Molke vom 8.4. 2014

	8.4. Orig. 4°	8.4. 65° 15 min 4°	8.4. Orig. 12°	8.4.65° 15 min 12°
2. Tag der Lagerung	1*10 ³	0		
5. Tag der Lagerung	2,2*10 ³	2*10 ³	3,3*10 ³	2,6*10 ³
23. Tag der Lagerung	>10 ⁷	1,044*10 ⁴	>10 ⁷	1,6*10 ⁴
46 Tag der Lagerung	>10 ⁷	1,8*10 ⁴	>10 ⁷	2*10 ⁴

Tabelle 5: Keimzahlen der Molken vom 8.4.2014

Da die Lagerung der Molke bei 12°C erst ab dem dritten Tag stattfand, wurde am 2. Tag der Lagerung noch kein Wert für die Keimzahl der bei 12°C gelagerten Molke bestimmt. Die Keimzahlen der bei 12°C gelagerten Molkeproben sind zwar höher als die der bei 4°C gelagerten, allerdings nicht um Größenordnungen.

Bei den Keimzahlen ist am 23. Tag der Lagerung ein starker Unterschied zwischen unbehandelter und behandelter Molke festzustellen. Die unbehandelte Molke besitzt dann eine nicht mehr auszählbare Anzahl an Keimen, wohingegen die Keimzahlen der behandelten Molke mäßig zunehmen. Anfangs sind die Keimzahlen de facto ident.

5.2. Molke vom 29.4.2014

Bei dieser Untersuchung wurden die Unterschiede zwischen der in der Käserei erhitzten Molke und der im Labor erhitzten Molke betrachtet.

Zusätzlich wurde jeweils eine Menge von 34 mg/l Kaliumthiocyanat (KTC) zu einem Teil der erhitzten Molke hinzugegeben, um das Lactoperoxidase-System zu unterstützen. Die Menge von 34 mg/l wurde aufgrund von Vorstudien von Ahmed Abdelaaty im Zeitraum vom November bis Dezember 2013 als optimale Zusatzmenge ermittelt und diese Menge auch bei den weiteren Untersuchungen zugesetzt.

5.2.1. LPO-Aktivität der Molke vom 29.4.2014

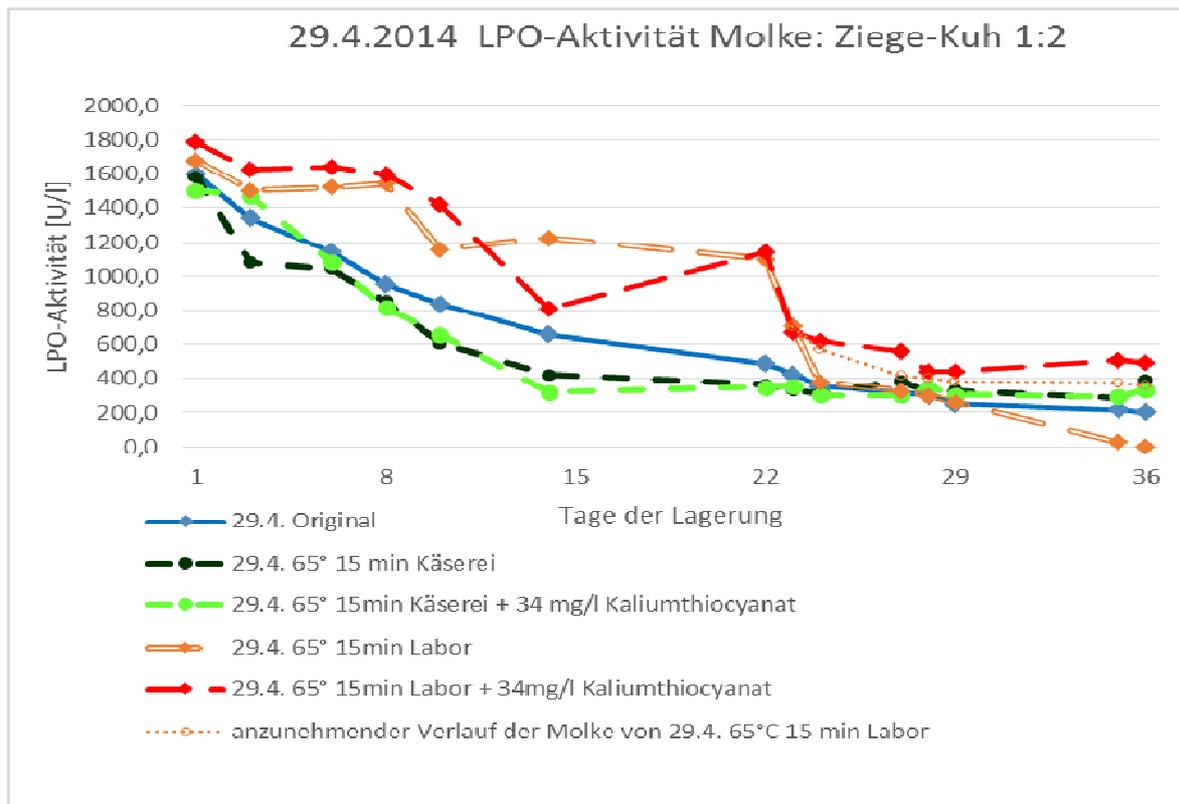


Diagramm 4: LPO-Aktivität der Molke vom 29.4.2014 (Vergleich Labor - Käserei 65 °C 15 min)

Es fällt eine geringere LPO-Aktivität der in der Käserei behandelten Molke auch im Vergleich zur unbehandelten Molke auf. Dieses Phänomen hält bis zum ca. 24. Tag der Lagerung an, dann erhöhen sich die LPO-Aktivitäten der in der Käserei behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten Molke.

Möglicherweise fand eine Kontaminierung der Molke während der Erhitzung statt; es kann dieser Abfall aber auch mit unterschiedlichen Erhitzungs- und Abkühlungszeiten zusammenhängen, auch wenn versucht wurde diese Zeiten möglichst gleich kurz zu halten. Aufgrund des unterschiedlichen Volumens (im Labor wurden maximal 2 Liter erhitzt, in der Käserei mindestens 20 Liter) kann es aber zu unterschiedlichen Erhitzungs- und Abkühlungszeiten kommen. Bei den Molkeproben vom 29.4.2014 dauerte die Abkühlung der Molke sowohl in der Käserei als auch im Labor ca. 1,5 Stunden. Daher wurde dieser Versuch unter ähnlichen Bedingungen später wiederholt, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

Bei der im Labor behandelnden Molke fällt nach dem 23. Tag der Lagerung ein kontinuierlicher Abfall der LPO-Aktivität auf. (Die grüne Linie soll den zu erwartenden Verlauf der Kurve zeigen.) Dies könnte auf einen zunehmenden Abbau der Lactoperoxidase schließen lassen. Auch dieser Effekt wurde in weiterer Folge wiederholt und genauer evaluiert.

Die Zugabe von Kaliumthiocyanat bewirkt anfangs weder bei der in der Käserei noch bei der im Labor erwärmten Molke einen großen Unterschied in der LPO-

Aktivität. Nur beim vorher diskutierten Abfall der im Labor erwärmten, nicht mit Kaliumthiocyanat behandelten Molke ist ein signifikanter Unterschied erkennbar.

5.2.2. pH-Werte der Molke vom 29.4.2014

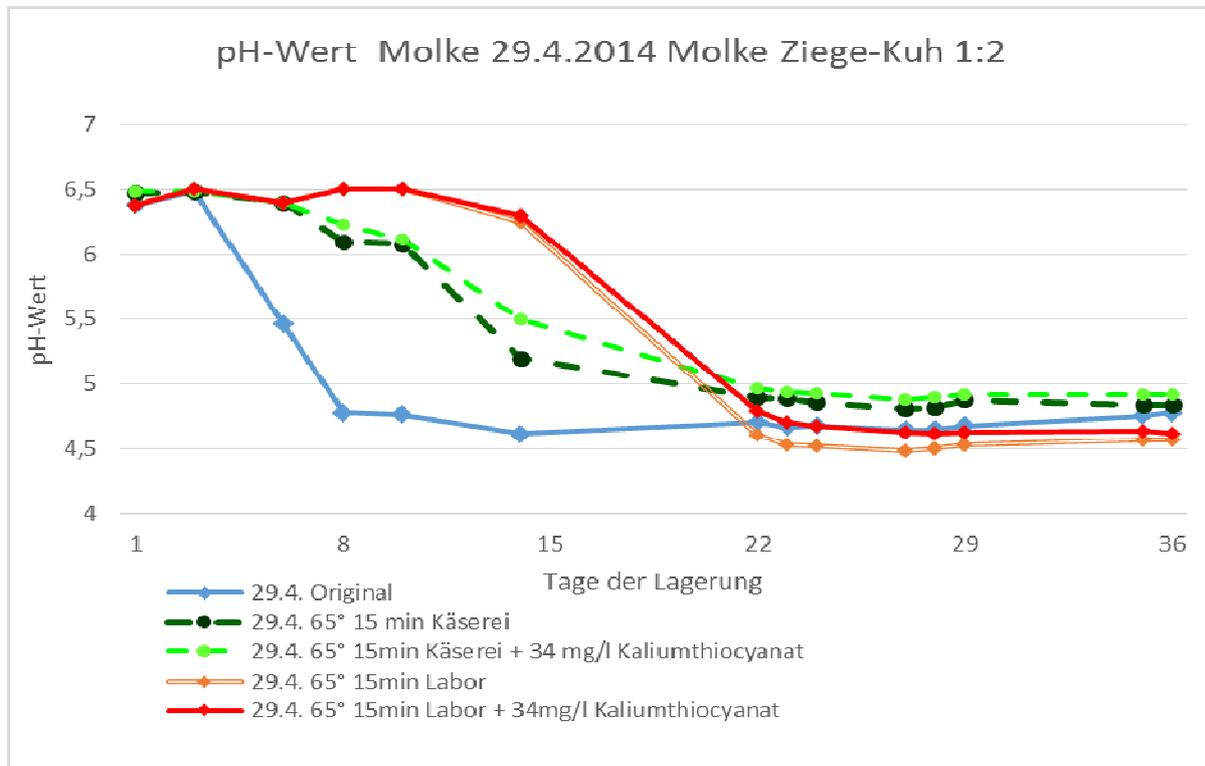


Diagramm 5: pH-Werte der Molke vom 29.4.2014 (Vergleich Labor - Käseerei 65°C 15 min)

Dieses Diagramm verdeutlicht den üblichen Verlauf des pH-Wertes während der Molkelagerung.

Nach der Herstellung besitzt die Mischung von gleichen Teilen Ziegen- und Kuhmolke einen pH-Wert von ungefähr 6,5. Dieser Wert fällt dann bei der unbehandelten Molke relativ rasch ab, wohingegen er bei hitzebehandelter Molke noch ca. zwei Wochen ein Wert von 6 nicht unterschritten wird. Das Minimum des pH-Wertes liegt bei 4,5, wird nach drei Wochen Lagerung unabhängig von der vorherigen Hitzebehandlung erreicht und verändert sich auch durch längere Lagerung (bis zu 8 Woche) nicht mehr wesentlich. Die Zugabe von 34 mg/l Kaliumthiocyanat erhöht den pH-Wert etwas, diese Differenz wird insgesamt nach zwei bis drei Wochen größer. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der LPO-Aktivität lässt sich aufgrund der beiden vorhergehenden Grafiken nicht vermuten, da sich die LPO-Aktivitäten der behandelten Molken im Vergleich zur originalen Molke unterschiedlicher verhalten als der pH-Wert der behandelten Molke zu dem der originalen Molke.

5.2.3. Keimzahlen der Molke vom 29.4.2014

Tag der Lagerung	29.4. Original	29.4. 65° 15min	29.4. 65° 15 min Käserei + 34mg/l KTC	29.4. 65° 15 min Labor	29.4. 65° 15 min Labor + 34 mg/l KTC
4.	$2,32 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$
10.	$9,8 \cdot 10^6$	$3,58 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
22.	$3,5 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$2,48 \cdot 10^7$
36	$5,2 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$

Tabelle 6. Keimzahlen der Molke vom 29.4.2014

Bei den Keimzahlen fällt auf, dass nach einem Anstieg bis zum 22. Tag der Lagerung ein Maximum erreicht scheint und danach sogar eine allgemeine Abnahme der Keimzahl eintritt. Die unbehandelte Molke weist aber von Beginn an eine relativ hohe Keimzahl auf.

5.3. Molke vom 6.5.2014

Die Molkenproben vom 6.5.2014 sind insofern eine Besonderheit, als dass die Mischung der Molke nicht wie üblich zu gleichen Teilen aus Ziegen- und Kuhmolke besteht, sondern eine Ziegen-Kuh-Molke-Mischung aus zwei Teilen Ziegenmolke zu einem Teil Kuhmolke ist. Diese Mischung hatte eine insgesamt etwas niedrigere LPO-Aktivität zur Folge.

Leider gibt es bei dieser Versuchsreihe keine unbehandelte Originalmolke als Vergleich, daher wurde hier vor allem die Auswirkung der Zugabe von Kaliumthiocyanat sowie der allgemeine Verlauf der LPO-Aktivität bei einer Mischung mit Netzschwefel untersucht und veranschaulicht. Die Molke wurde nach der Gewinnung in der Käserei 15 Minuten lang auf 65 °C erhitzt und dann wieder innerhalb von 1,5 Stunden abgekühlt. Die Zugabe des Kaliumthiocyanats erfolgte am Folgetag im Labor.

Dieser Versuch soll noch einmal die Unterschiede bei der Behandlung mit Kaliumthiocyanat veranschaulichen. Thiocyanat-Ionen sind hitzestabil, daher hat es keine Auswirkung, ob die Zugabe vor oder nach der Erhitzung erfolgt [27].

Es wurde auch ein Versuch mit Zusatz des Biospritzmittels Thiovit® (Netzschwefel) durchgeführt. Diese Mittel wird bei der Bekämpfung des Falschen Mehltaus im biologischen Weinbau eingesetzt und zeichnet sich durch eine gute Haftung am Blatt aus.

5.3.1. LPO-Aktivität der Molke vom 6.5.2014

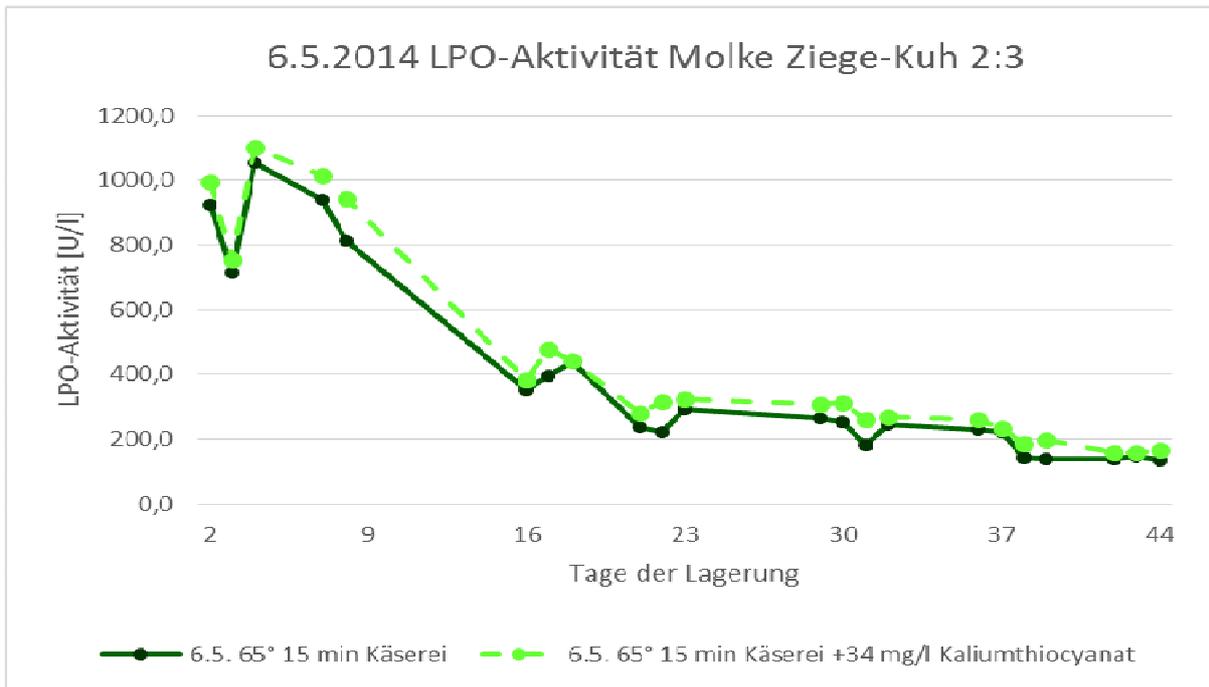


Diagramm 6: LPO-Aktivität vom 6.5.2014 2:1 Ziege-Kuh (Vergleich mit / ohne KTC)

Absolut betrachtet sind die Werte aufgrund der unterschiedlichen Mischung (2:3 Ziege-Kuh statt 1:2) deutlich niedriger als die LPO-Aktivitätswerte der Vorwochen. Am Ende der Messung pendelt sich allerdings die Aktivität auf einen ähnlichen Level im Vergleich mit der Standardmischung ein.

Die Zugabe von Kaliumthiocyanat erhöht die LPO-Aktivität zwar etwas, ob diese Zugabe aber wirklich sinnvoll ist, wird nun versucht statistisch zu ermitteln. Es wurde dabei ähnlich wie bei der vorigen statistischen Analyse vorgegangen.

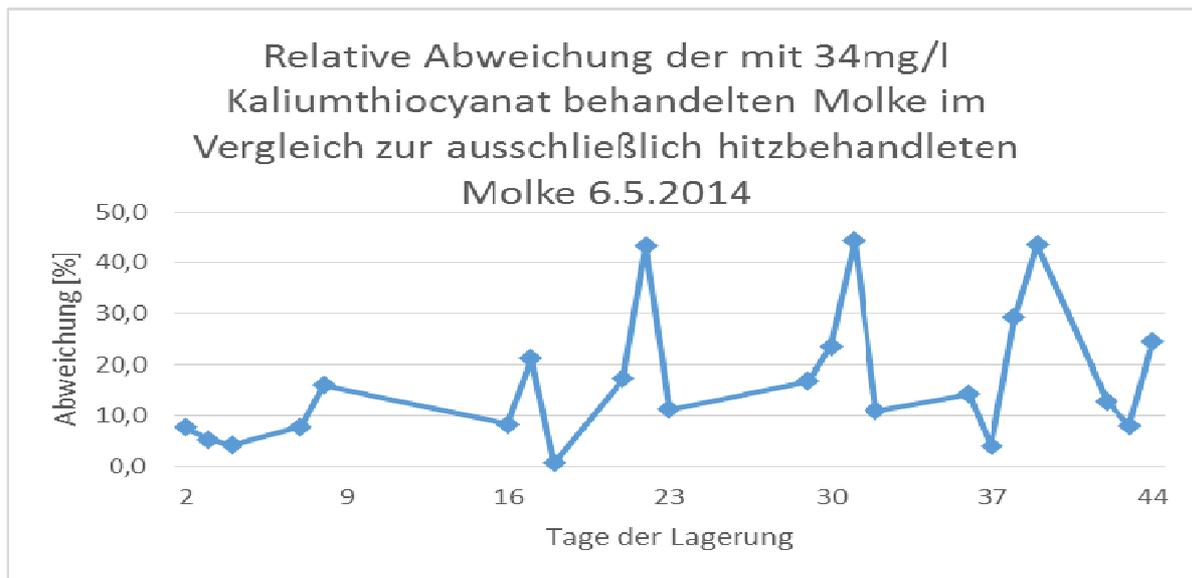


Diagramm 7: Relative Abweichung der 65°C 15 min und mit 34,g/l KTC behandelten Molke im Vergleich zur der ausschließlich mit 65°C 15 min wärmebehandelten Molke 6.5.2014.

Bei der Auswertung fällt auf, dass der Unterschied mit zunehmender Lagerdauer zunimmt. V.a. der Bereich der ersten 2 Wochen, in dem die LPO-Aktivität insgesamt noch am höchsten ist, zeigen sich Unterschiede von unter 20%, erst aber der dritten Woche ist tageweise ein Unterschied von bis über 40% möglich. Hier fehlt der Vergleich mit der unbehandelten Molke.

Der Mittelwert der relativen Abweichung über den gesamten Versuchszeitraum beträgt 17 % mit einer Standardabweichung von 13%. Zum Vergleich beträgt der Mittelwert der relativen Abweichung der ersten 21 Tage 10%. Eine Zugabe von 34 mg/l Kaliumthiocyanat scheint also anfangs keine extremen Veränderungen zu bewirken, bei längerer Lagerung erhöht sich allerdings die Wirksamkeit.

5.3.2. LPO-Aktivität der Molke vom 6.5.2014 mit Netzschwefel

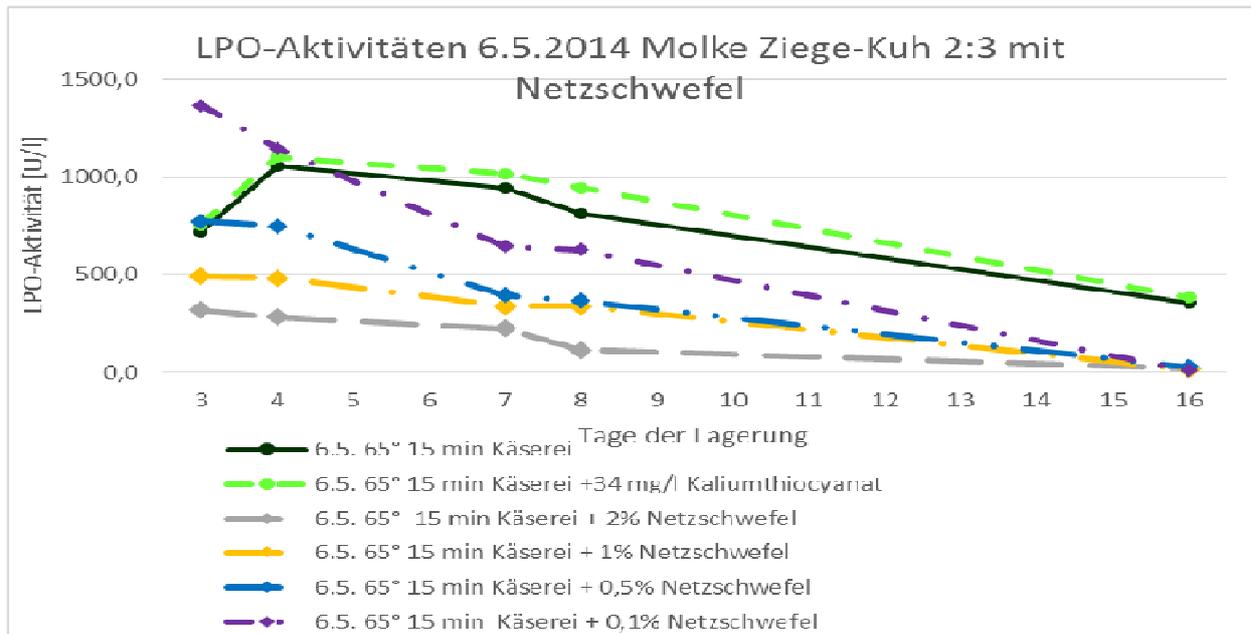


Diagramm 8: LPO-Aktivität der Molke vom 6.5.2014 im Vergleich mit der Zugabe von Netzschwefel

Die Zugabe des Netzschwefels erfolgt am dritten Tag der Lagerung und bewirkte eine starke Abnahme der LPO-Aktivität innerhalb weniger Tage. Ab ca. 1 Gewichtsprozent Netzschwefel wurde die LPO-Aktivität deutlich reduziert, allerdings erhöhte eine Zugabe von 0,1 Gewichtsprozenten die Aktivität kurzzeitig. Nach zwei Wochen allerdings war keine nennenswerte LPO-Aktivität in keiner der untersuchten Proben mehr erkennbar.

5.3.3. pH-Werte der Molke vom 6.5.2014 mit Netzschwefel

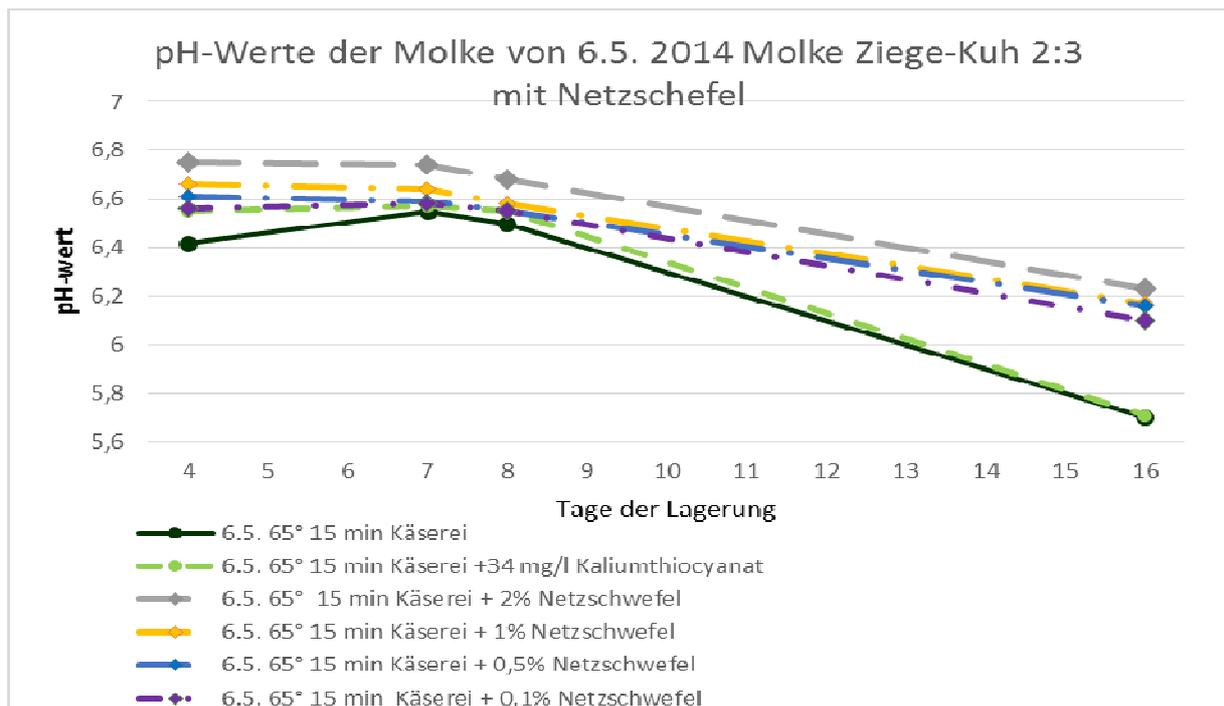


Diagramm 9: pH-Wert der Molke vom 6.5.2014 nach Zugabe von Netzschwefel

Die Zugabe des Netzschwefels scheint eine leichte Erhöhung des pH-Wertes zu bewirken und verzögert den Abfall bei der Lagerung etwas. Der Versuch wurde aber aufgrund der fehlenden LPO-Aktivität abgebrochen. Davor zeigt der Verlauf aber klare lineare Eigenschaften. Je mehr Netzschwefel verwendet wurde desto höher war der pH-Wert.

5.3.4. Keimzahlen der Molke vom 6.5.2014

Tag der Lagerung	6.5. 65° 15 min Käserei	6.5. 65° 15 min Käserei+ 34mg/l KTC	6.5. 65° 15 min Käserei+ 2% Netzschwefel	6.5. 65° 15 min Käserei+ 0,1% Netzschwefel
1	$2,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$		
16	$9,2 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	0 (kein Wachstum)	$7,8 \cdot 10^2$
21	$8,4 \cdot 10^3$	$9,8 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$
37	$4,3 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$		
42	$2,2 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^2$		

Tabelle 7. Keimzahlen der Molke vom 6.5.2014

Bei den Keimzahlen fällt auf, dass diese insgesamt wesentlich niedriger sind als bei den vorangegangenen Versuchen. Möglicherweise wurden durch die Erhitzung so viele Mikroorganismen abgetötet, dass eine Vermehrung wesentlich eingeschränkt war. Die Zugabe von Netzschwefel hat in einer Konzentration von 2 Gewichtsprozent dazu geführt, dass in der ersten Woche nach der Zugabe keine Keime gewachsen sind, allerdings hat sich die Keimzahl danach wieder erhöht und angeglichen.

Der Netzschwefel wurde dann allerdings nicht weiter als Pflanzenstärkungsmittel bei den Versuchsreihen angewendet, darum wurden auch keine weiteren Versuche damit durchgeführt, zumal er die LPO-Aktivität stark beeinträchtigt.

5.4. Molke vom 20.5.2014

Diese Versuchsreihe sollte die Lagerstabilität einer 65 °C 5 Minuten lang erhitzten Molke verdeutlichen.

Ein Teil der Molke vom 20.5.2014 wurde in der Käserei 65°C 5 Minuten lang erhitzt, zu einem weiteren Teil dieser erhitzten Molke wurden am Folgetag 34 mg/l Kaliumthiocyanat hinzu gegeben. Um unterschiedliche Erhitzungsbedingungen zu prüfen wurde ein weiterer unbehandelter Molkeanteil im Labor 65°C 5 Minuten lang erhitzt und ebenfalls in die Messungen mit einbezogen. Bei vorhergegangenen

Untersuchungen von Ahmed Abdelaaty brachte diese Erhitzungsmethode die bestmögliche LPO-Aktivität.

5.4.1. LPO-Aktivität Molke vom 20.5.2014

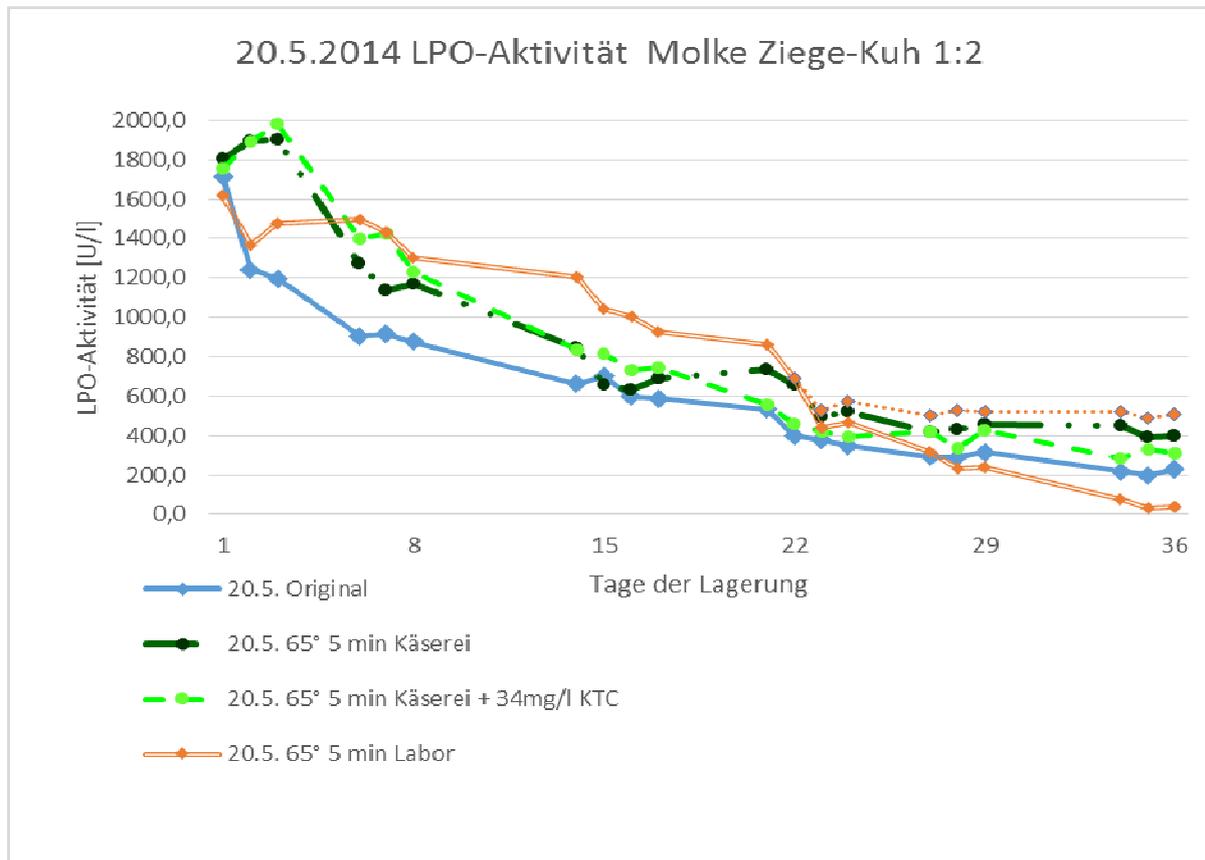


Diagramm 10: LPO-Aktivität vom 20.5.2014 (Vergleich bei 65° 5 min)

Anfangs fällt die LPO-Aktivität der unbehandelten Molke verhältnismäßig schnell ab. Die in der Käserei behandelte Molke erhöht in den ersten Tagen ihre LPO-Aktivität sogar noch, dann nimmt sie ebenfalls relativ schnell ab.

Die im Labor hitzebehandelte Molke wies im Zeitraum von Tag 6-22 der Lagerung den höchsten LPO-Aktivitätswert auf, allerdings fiel er dann wieder, ähnlich wie bei der Molke von 29.4.2014, sogar unter den Wert der unbehandelten Molke zurück. Ebenfalls erwähnenswert ist der Abfall der in der Käserei direkt nach der Erhitzung mit Kaliumthiocyanat behandelten Molke im Vergleich zur nur hitzebehandelten Molke am 17. Lagertag. Der Endwert der Analyse liegt zwischen 100-400 U/l. Aufgrund der besseren Aktivität der in der Käserei behandelten Molke und Voruntersuchungen von Ahmed Abdelaaty im Zeitraum vom Jänner bis-Februar 2014 wurde die Behandlung bei 65°C 5 Minuten bevorzugt angewendet und untersucht.

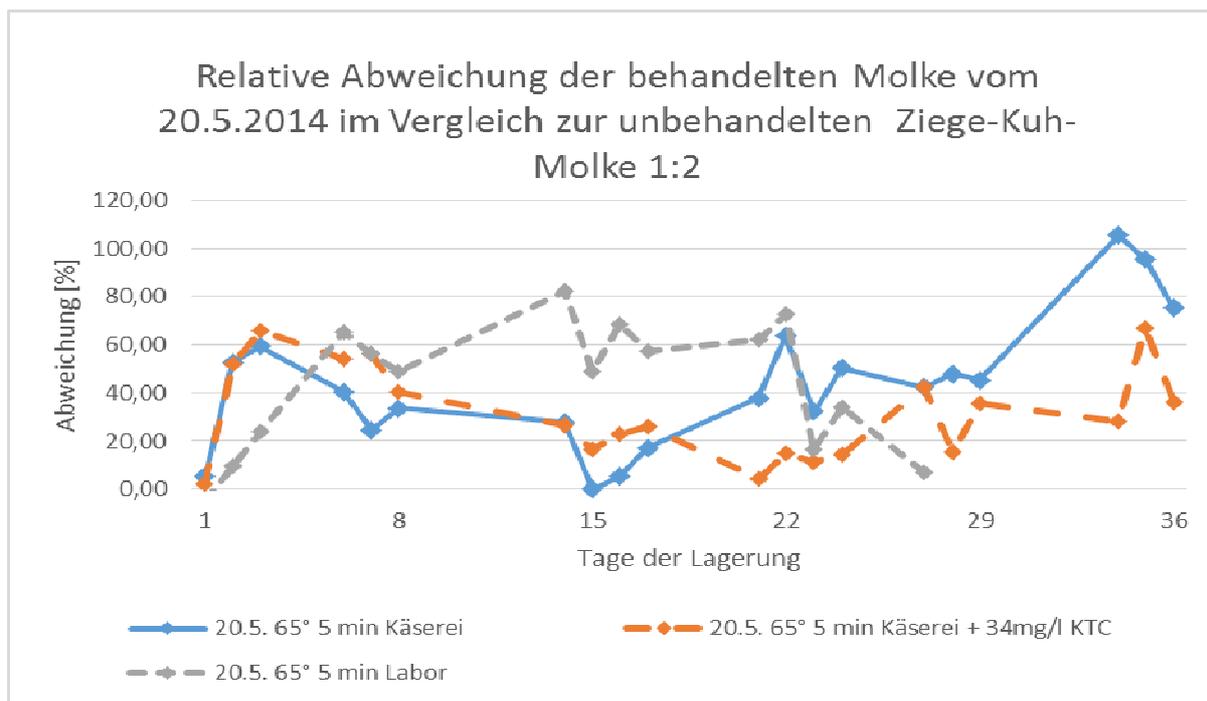


Diagramm 11: Relative Abweichung der behandelten Molke vom 20.5.2014 im Vergleich zur unbehandelten originalen Molke

Die relative Abweichung der im Labor behandelten Molke wurde nach 27 Tagen negativ und daher aus Skalierungsgründen hier nicht mehr angeführt.

Auffallend ist hier auch die oben besprochene höhere LPO-Aktivität der in der Käserei ausschließlich hitzebehandelten Molke, ab dem 17. Lagertag im Vergleich zur Probe, welche sowohl mit Kaliumthiocyanat versetzt als auch hitzebehandelt worden war. Zur genaueren Veranschaulichung können die Mittelwerte der Abweichungen dienen:

	Mittelwert	Standardabweichung
Relative Abweichung der 65°C 5 min in der Käserei behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten Molke	43 [%]	28 [%]
Relative Abweichung der 65°C 5 min in der Käserei behandelten Molke mit KTC im Vergleich zur unbehandelten Molke	32 [%]	19 [%]
Relative Abweichung der 65°C 5 min im Labor behandelten Molke im Vergleich zur unbehandelten Molke	43 [%] (bis zum 27. Lagertag)	26 [%] (bis zum 27. Lagertag)

Tabelle 8: Relative Abweichungen der behandelten Molke vom 20.5.2014 im Vergleich zur unbehandelten Molke

Hier fällt auf, dass die mittlere relative Abweichung der LPO-Aktivität bei der mit Kaliumthiocyanat (KTC) versetzten Molke insgesamt etwas höher ist als die der nur

hitzebehandelten Molke. Die Differenz entspricht ungefähr 10%, welche schon bei der Molke von 6.5.2014 festgestellt werden konnte.

5.4.2. pH-Werte der Molke vom 20.5.2014

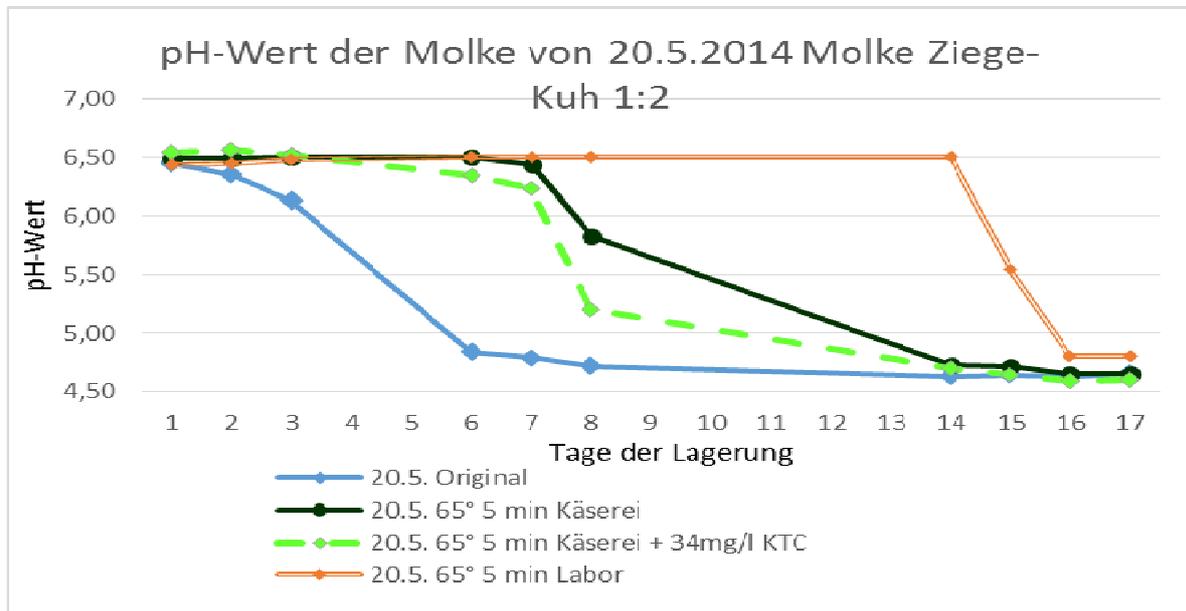


Diagramm 12: pH-Werte der Molke vom 20.5. 2014

Beim pH-Wert gibt es wenige Auffälligkeiten, auch hier fällt die unbehandelte Molke als erste ab. Danach folgt ein Abfall des pH-Wertes der Proben, welche in der Käseerei behandelt wurden. Schlussendlich erreichte auch die im Labor behandelte Probe ihren Endwert zwischen 4,5-5 und veränderte sich dann nicht mehr signifikant. Dies entspricht dem typischen Verlauf, daher wurde der pH-Wert nach 17 Lagertagen nur mehr 1x pro Woche zur Kontrolle gemessen.

5.4.3. Keimzahlen der Molke vom 20.5.2014

Tag der Lagerung	20.5. Original	20.5. 65° 5 min Käseerei	20.5. 65° 5 min Käseerei+ 34mg/l KTC	20.5. 65° 5 min Labor
2	$1,9 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^1$	$6,2 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^1$
6	$8,7 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^3$
13	$1,19 \cdot 10^5$	$1,16 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^2$
20	$1,76 \cdot 10^4$	$8,28 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$
26	$4 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$
34	$1,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$

Tabelle 9: Keimzahlen der Molke vom 20.5.2015

Die Keimzahlen der Molke vom 20.5.2014 sind im Verhältnis zu den früher untersuchten Proben relativ gering.

Am auffälligsten ist dies bei der im Labor behandelten Molke, aber auch die anderen Maximalwerte von 10^5 befinden sich um 2 Größenordnungen unter den früheren Maximalwerten. Für diese Werte kann es mehrere Gründe geben: unterschiedliche Laktationsperioden, geringere Kontamination aus der Umgebungsluft, sowie auch andere Aufheiz- und Abkühlungszeiträume können hier möglicherweise eine Rolle spielen.

Der Abfall der Keimzahlen der im Labor behandelten Molke lässt sich darauf zurückführen, dass einige Mikroorganismen bakterizide Substanzen produzieren, welche die Keimzahlen nach längerer Einwirkzeit reduzieren. Aber auch entstandene Milchsäure, welche den pH-Wert innerhalb der ersten zwei Wochen auf 4,5 reduziert, kann als limitierender Faktor dienen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt wirkt sich dieser bakterizide Effekt auf die Gesamtkeimzahl aus, der pH-Wert bleibt allerdings konstant.

5.5. Molke vom 3.6.2014

Bei dieser Molke sollte der Erhitzungsprozess von 65°C 5 Minuten in der Käserei noch einmal zur Überprüfung wiederholt werden.

Zusätzlich wurden wieder zu einem Teil der behandelten Molke 34 mg/l Kaliumthiocyanat hinzugegeben. Dieser Zusatz erfolgt dieses Mal allerdings direkt am Erhitzungstag in der Käserei, unmittelbar nach dem Abkühlen der Molke. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass der Zeitpunkt der Kaliumthiocyanat-Zugabe (vor oder nach der Erhitzung) keine wesentliche Auswirkung auf die LPO-Aktivität hat.

5.5.1. LPO-Aktivität der Molke vom 3.6.2014

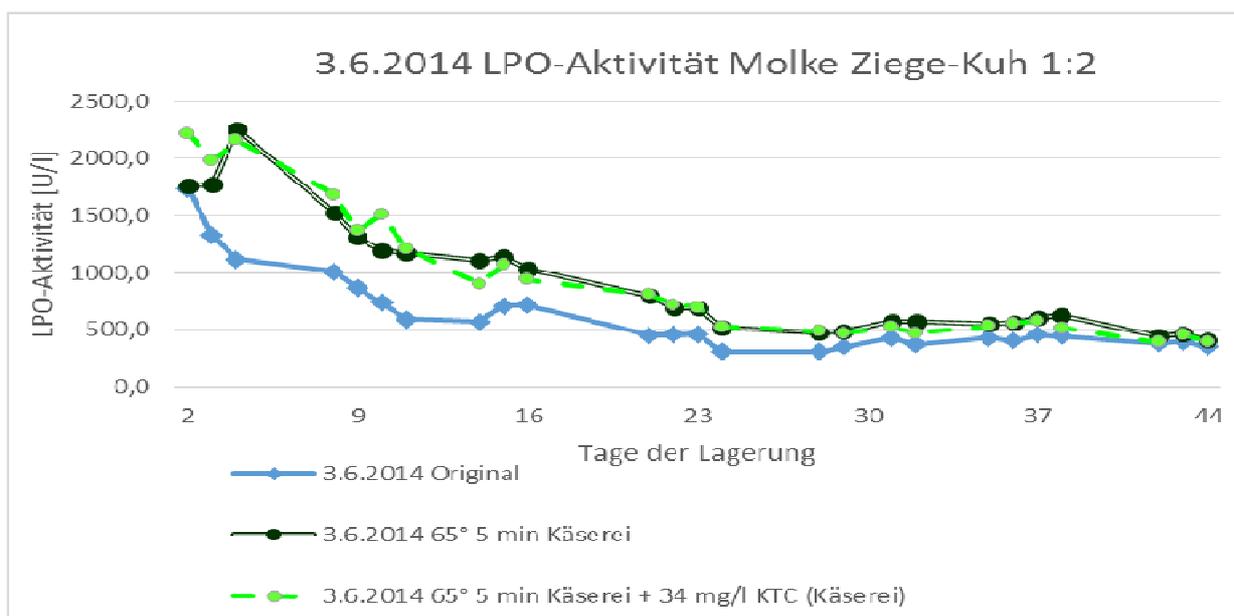


Diagramm 13: LPO-Aktivität der Molke vom 3.6.2014 (Wiederholung des Vergleichs mit und ohne KTC)

Anfangs besitzt die mit Kaliumthiocyanat behandelte Molke den Höchstwert an LPO-Aktivität aller in diesem Projekt durchgeführten Analysen.

Der Wert sinkt dann aber wieder relativ schnell ab und pendelt sich im Bereich der in der Käserei ausschließlich hitzebehandelten Molke ein. Die Werte der unbehandelten Molke bleiben durchgehend unter den Werten der hitzebehandelten Molken, daher kann man annehmen, dass die Erhitzungsbedingungen optimal gewählt wurden.

Es wurde wieder eine statistische Auswertung durchgeführt, wobei die jeweiligen behandelten Molken wieder mit der unbehandelten Molke verglichen wurden und die Werte als Absolut-Werte bzw. als prozentuelle Abweichungen zur unbehandelten Molke dargestellt sind.

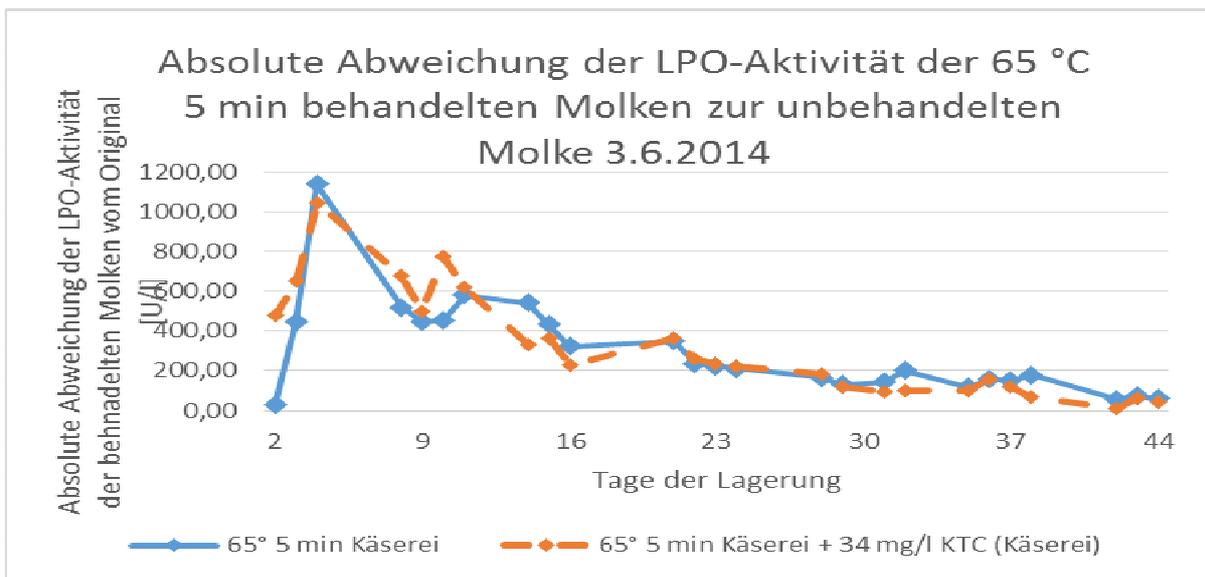


Diagramm 14: Absolute Abweichung der LPO-Aktivitäten der bei 65°C 5 minutenlang behandelten Molken zur Original-Molke vom 3.6.2014

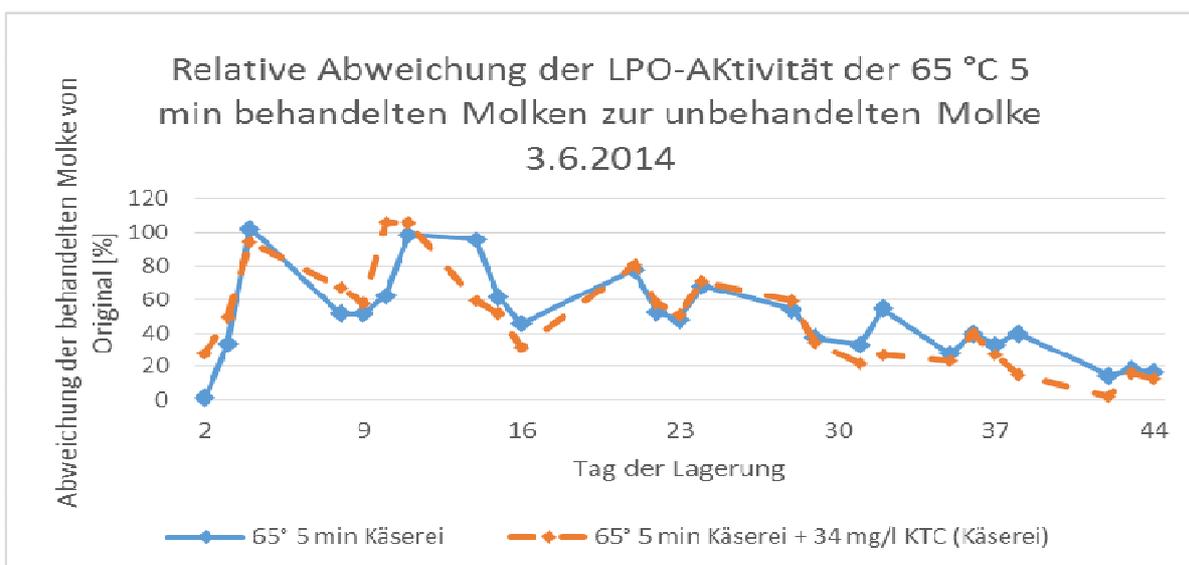


Diagramm 15: Relative Abweichung der LPO-Aktivität der bei 65°C 5 minutenlang behandelten Molken zum Original 3.6.2014

Alle Molken vom 3.6.2014	Mittelwert	Standardabweichung
Absolute Abweichung 65° 5min Käserei vom der unbehandelten Molke	295[U/l]	238 [U/l]
Absolute Abweichung 65° 5min Käserei + 34mg/l KTC vom der unbehandelten Molke	313 [U/l]	263 [U/l]
Relative Abweichung 65° 5min Käserei vom der unbehandelten Molke	49 [%]	25 [%]
Relative Abweichung 65° 5min Käserei + 34mg/l KTC vom der unbehandelten Molke	47 [%]	28 [%]

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Vergleiche unbehandelter/behandelter Molke vom 3.6.2014

Gesamt betrachtet fällt ein sehr ähnliches Verhalten der behandelten Molken auf. Die Zugabe des Kaliumthiocyanats hat z.B. den Mittelwert der relativen Abweichung um 2% erhöht Insgesamt scheint die Zugabe von Kaliumthiocyanat im Verhältnis zur Aktivitätssteigerung durch Wärmebehandlung vernachlässigbar.

5.5.2.Keimzahlen der Molke vom 3.6.2014

Tag der Lagerung	3.6. Original 1:2 Ziege Kuh	3.6. 65° 5 min Käserei	3.6. 65° 5 min Käserei+ 34 mg/l KTC
2	$6,3 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$
9	$9,2 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^5$
14	$7,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^4$
22	$3,5 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^6$
29	$2,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
35	$1,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
42	$1,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$

Tabelle 11: Keimzahlen der Molken vom 3.6.2014

Die Keimzahlen verhalten sich insgesamt sehr ähnlich und steigen bis auf den üblichen Maximalwert von 10^7 , fallen aber dann wieder etwas ab. Einer der Gründe dafür kann hierbei Nährstoffmangel sein, aber auch die Produktion von antibiotisch wirkenden Substanzen durch bestimmte Milchsäurebakterien könnte für die suppressive Wirkung auf andere Bakterienstämme verantwortlich sein, aber zusätzlich -wie schon erwähnt-auch die erhöhte Milchsäurekonzentration.

5.6. Molke vom 10.6.2014

Diese Versuchsreihe wurde durchgeführt, um die LPO-Aktivitätsabnahme nach der dritten Lagerwoche der im Labor behandelten Molkeproben vom 29.4. bzw. 20.5.2014 auf den Grund zu gehen.

Die Molke wurde daher nach der Anlieferung im Labor 65 °C 15 Minuten erhitzt und danach bei 4 °C im Wasserbad abgekühlt. Der Erhitzungs- bzw. Abkühlungszeitraum entsprach bei einer Erhitzung von 65°C 15 Minuten dabei derselben Zeit von 1,5 Stunden wie bei den Molkenproben vom 29.4.2014.

5.6.1. LPO-Aktivität der Molke vom 10.6.2014

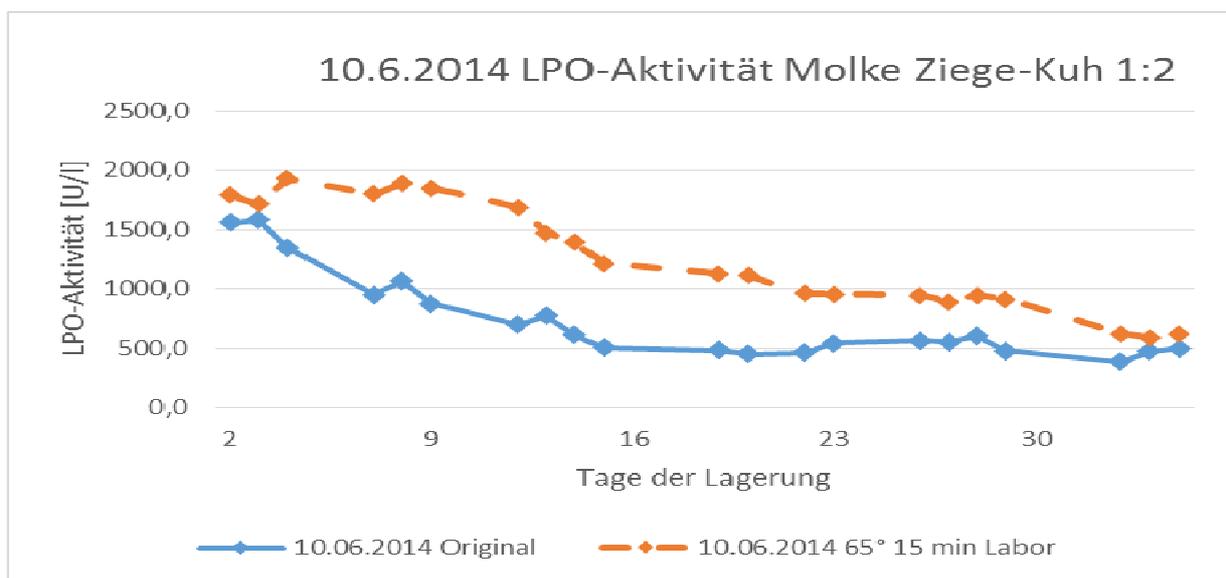


Diagramm 16: LPO-Aktivität der Molke vom 10.6.2014 (Vergleich im Labor erwärmt/unbehandelt)

Der Verlauf der LPO-Aktivität entspricht den Erwartungen der Untersuchungen, nämlich dass die LPO-Aktivität der erhitzten Molke auch nach drei Wochen etwas höher ist als die der unbehandelten Molke. Im Mittel beträgt der Unterschied 41 % bei einer Standardabweichung von 15%.

Aufgrund dieser Analysen und einigen Beobachtungen bei vorangegangenen Untersuchungen kann angenommen werden, dass sich die LPO-Aktivität der im Labor behandelten Molke ab der dritten Woche nicht mehr so konstant verhält wie z.B. der unbehandelten Molke.

5.6.2. Keimzahlen der Molke vom 10.6.2014

Tag der Messung	10.6. Original	10.6. 65° 15 min Labor
2	$3,6 * 10^4$	$1,4 * 10^2$
7	$5,72 * 10^6$	$1,7 * 10^2$
13	$2,2 * 10^6$	$2,4 * 10^5$
20	$9,0 * 10^5$	$2,0 * 10^6$
26	$2,0 * 10^7$	$1,0 * 10^7$
33	$2 * 10^5$	$1 * 10^6$

Tabelle 12: Keimzahlen der Molke vom 10.6.2014

Die Keimzahlen der im Labor erhitzten Molke liegen in den ersten zwei Lagerungswochen niedriger als die der unbehandelten Molke, danach erreichen beide einen Wert von 10^7 und fallen wieder leicht etwas ab. Ein Verhalten, das immer wieder betrachtet werden konnte.

5.7. Molke vom 24.6.2014

Bei dieser abschließenden Untersuchung sollte noch einmal die unbehandelte Molke mit einer in der Käserei bei 65°C 5 Minuten erhitzten Molke verglichen werden. Erneut wurden zu einem Teil der erhitzten Molke 34 mg/l Kaliumthiocyanat hinzugegeben.

Ferner wurde die Originalmolke 1:2 mit Wasser vermischt, um einmal einen Vergleich zu der bei den Sprühversuchen im Weingarten verwendeten Mischung zu bekommen. Diese Messung wurde nach 3 Wochen für 2 Wochen unterbrochen.

5.7.1. LPO-Aktivität der Molke vom 24.6.2014

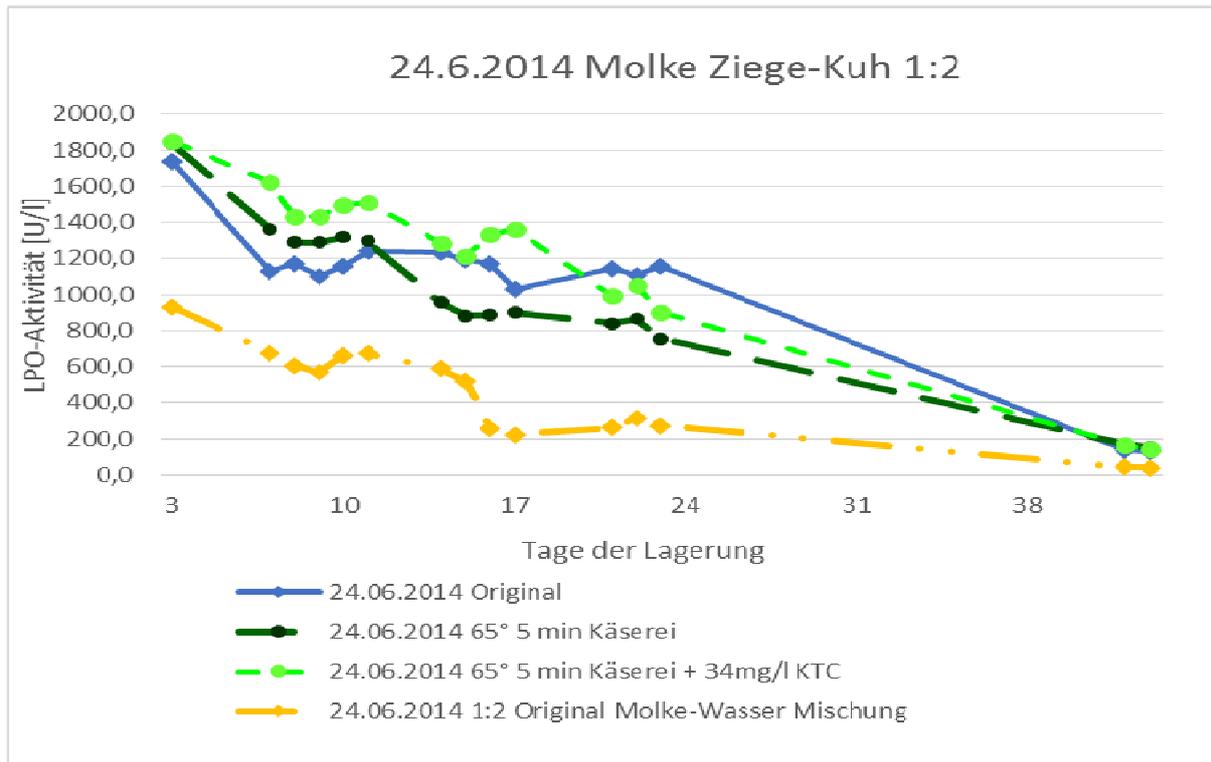


Diagramm 17: LPO-Aktivität der Molke vom 24.6. 2014

Nach der zweiwöchigen Analysenpause war die LPO-Aktivität sehr niedrig und daher wurde weitere Untersuchungen nicht mehr durchgeführt.

Auffallend bei der Messung ist, dass die LPO-Aktivität der hitzebehandelten Molken nach ca. 14 Tagen im Vergleich zur unbehandelten Molke stärker abnimmt.

Bei der nur hitzebehandelten Molke sinkt diese sogar unter den LPO-Aktivitätswert der unbehandelten Molke ab. Kaliumthiocyanat scheint zur Stabilisierung beizutragen.

Die anzunehmende Abnahme von ca. 50% der LPO-Aktivität aufgrund der Verdünnung durch Wasser wurde mit einer mittleren Abweichung von -60%, bei einer Standardabweichung von 14% der Molke-Wasser Mischung im Vergleich zum Original bestätigt.

5.7.2. Keimzahlen der Molke vom 24.6.2014

Tag der Lagerung	24.6. 1:2 Ziege Kuh Original	24.6. 65° 5 min Käserei	24.6. 65° 5 min Käserei+ 34 mg/1 KTC	1:2 Molke Original - Wasser
2	$2,0 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$
8	$1,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$
14	$7,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^7$
21	$4,5 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^5$

Tabelle 13: Keimzahlen der Molke vom 24.6.2014

Die Keimzahlen der Molke-Wasser-Mischung sind anfangs wesentlich höher als die der anderen Molkeproben, was auf die Verwendung nicht keimfreien Wassers zurückgeführt werden könnte. Nach 21 Tagen der Lagerung gleichen sich die Keimzahlen aber nahezu an. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Abnahme der Nährstoffe in der Molke-Wassermischung zurückzuführen.

5.8. Vergleich der unterschiedenen Molkeproben

Aufgrund der großen absoluten Unterschiede sowie der unterschiedlichen Messzeitpunkte ist ein direkter Vergleich der Molkeproben nicht möglich. Daher wurde mit jeder Probe eine Regression (teilweise exponentiell, teilweise mit einem Polynom zweiten Grades) durchgeführt, um damit die Daten vergleichbar zu machen:

	Regressionsformel	R ²
8.4. 2014 4 °C gelagert 65 ° C 15 min	$2126,6e^{-0,06x}$	0,91
8.4. 2014 4 °C gelagert Original C 15 min	$1602,6e^{-0,059x}$	0,88
8.4.2014 12 °C gelagert 65 ° C 15 min	$2379,9e^{-0,112x}$	0,95
8.4.2014 12°C gelagert Original C 15 min	$1755,1e^{-0,122}$	0,93
29.4.2014 Original	$1586,3e^{-0,059x}$	0,99
29.4.2014 65° 15 min Käserei	$1,6863x^2 - 89,984x + 1475,6$	0,94
29.4.2014 65° 15min Käserei + 34 mg/l Kaliumthiocyanat	$1,8956x^2 - 101,15x + 1594,6$	0,94
29.4. 2014 65° 15min Labor	$-0,3732x^2 - 36,627x + 1717,1$	0,94
29.4.2014 65° 15min Labor + 34mg/l Kaliumthiocyanat	$0,8268x^2 - 71,624x + 1938,1$	0,9
6.5.2014 65° 15 min Käserei	$958,05e^{-0,047x}$	0,9
6.5.2014 65° 15 min Käserei+34 mg/l Kaliumthiocyanat	$1036,9e^{-0,044x}$	0,92
20.5.2014 Original	$1439,9e^{-0,055x}$	0,98
20.5.2014 65° 5 min Käserei	$1,7307x^2 - 103,68x + 1960,5$	0,95
20.5.2014 65° 5 min Käserei + 34mg/l KTC	$1,65x^2 - 106,97x + 2047,3$	0,98
20.5. 2014 65° 5 min Labor	$-0,2604x^2 - 38,155x + 1634,8$	0,97
3.6.2014 Original	$1,1961x^2 - 75,88x + 1523,8$	0,88
3.6.2014 65° 5 min Käserei	$1,2215x^2 - 89,53x + 2115,7$	0,93
3.6.2014 65° 5 min Käserei + 34 mg/l KTC (Käserei)	$1,5552x^2 - 109,9x + 2368,8$	0,96
10.06.2014 Original	$1,8851x^2 - 97,857x + 1693,3$	0,92
10.06.2014 65° 15 min Labor	$2241,9e^{-0,035x}$	0,94
24.06.2014 Original	$-0,6011x^2 - 2,3823x + 1356,3$	0,86
24.06.2014 65° 5 min Käserei	$2353,2e^{-0,059x}$	0,96
24.06.2014 65° 5 min Käserei + 34mg/l KTC	$-0,0342x^2 - 39,225x + 1883,2$	0,97
24.06.2014 1:2 Original Molke-Wasser Mischung	$1297,3e^{-0,078x}$	0,94

Tabelle 14: exponentielle bzw. polynomische Regressionskurven aller Molkeproben.

Besonders der Zeitraum der ersten drei Lagerwochen ist für den Weinbau interessant., daher wurden nun vergleichbare Daten zu den Tagen 1 (fiktiv, da nie Messungen an diesem Tag durchgeführt wurden), 7, 14 und 21 der Lagerung berechnet und die Veränderung der LPO-Aktivität betrachtet.

Der Mittelwert der LPO-Aktivitätszunahme aller Proben, welche mit 65°C 15 Minuten bzw. 65°C 5 Minuten erhitzt wurden, im Vergleich zur unbehandelten Molke ergab an den Lagertagen 1, 7, 14 und 21 folgende Ergebnisse:

	Tag 1	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Mittelwert der Zunahme der LPO-Aktivität aller Molkeproben welche bei 65°C 15 Minuten erhitzt wurden, im Vergleich zur unbehandelten Molke	19,3 [%]	28,1 [%]	37,7 [%]	44,1 [%]
Mittelwert der Zunahme der LPO-Aktivität aller Molkeproben welche bei 65°C 5 Minuten erhitzt wurden, im Vergleich zur unbehandelten Molke	41,7 [%]	37,4 [%]	35,3 [%]	38 [%]

Tabelle 15: Mittelwert der Zunahme der LPO-Aktivität durch Pasteurisierung.

Tabelle 15 verdeutlicht, dass eine Erhitzung von 65 °C 5 Minuten, einer Erhitzung von 65 °C 15 Minuten vorzuziehen ist, besonders wenn die Ausbringung der Molke innerhalb der ersten zwei Wochen geschieht.

	Tag 1	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Mittelwert der Zunahme der LPO-Aktivität durch Zugabe von 34mg/l KTC	4,4[%]	5,7[%]	7,6[%]	9,4[%]

Tabelle 16: Mittelwert der Zunahme der LPO-Aktivität durch Zugabe von Kaliumthiocyanat

Die Zugabe von Kaliumthiocyanat wirkt sich je länger der Lagerzeitraum ist, positiver auf die die LPO-Aktivität aus. Allerdings bleibt sie im gesamten Zeitraum der drei Lagerwochen unter 10%.

6. Diskussion der chemischen und mikrobiologischen Untersuchungen

Bei der Behandlung der Molken wurden zwei verschiedene Pasteurisierungsverfahren angewendet, die sich in den Vorversuchen am vielversprechendsten erwiesen hatten. Sowohl eine 15 minütige Erhitzung auf 65°C, als auch eine 5 minütige Erhitzung auf 65°C haben anfangs zu einer starken Erhöhung der LPO-Aktivität im Vergleich zur nicht erhitzten Molke geführt.

Die 5 minütige Erhitzung auf 65°C zeigt insgesamt bessere Werte als die 15 minütige Erhitzung und ist daher in der Praxis eher zu empfehlen. Allerdings ist nur innerhalb der ersten drei Wochen eine erhöhte LPO-Aktivität wirklich gewährleistet, danach können andere, noch nicht definitiv aufgeklärte Effekte die LPO-Aktivität zusätzlich beeinflussen.

Die Zugabe von Kaliumthiocyanat wirkt sich auf die Lagerstabilität positiv aus, allerdings erhöht sie den Absolutwert der LPO-Aktivität nur geringfügig im Vergleich zur beträchtlichen LPO-Aktivitätssteigerung bei Hitzebehandlung. Im Mittel nimmt die LPO-Aktivität durch die beiden Methoden hitzebehandelten Molke mindestens 20% zu, wohingegen die zusätzliche Zugabe von 34 mg/l Kaliumthiocyanats die LPO-Aktivität nur um ca. 10% erhöht.

Die Erhitzung führt auch zu einer Verzögerung der pH-Wert-Abnahme. Dieser ist bei der ursprünglichen Molke im Bereich von pH-Wert 6,5 und fällt bei unbehandelter Molke innerhalb einer Woche Lagerzeit auf einen Wert zwischen 4,5 und 5 ab. Durch Hitzebehandlung wurde diese Abnahme um eine Woche verzögert, und auch die pH-Endwerte waren etwas höher als die der unbehandelten Molke. Ein direkter Zusammenhang mit der LPO-Aktivität hat sich allerdings nicht gezeigt, obwohl der pH-Wert in Relation zur Zahl der Milchsäurebakterien steht.

Die Keimzahlen der Molkeproben wurden durch das Erhitzen anfangs merklich reduziert. Allerdings glichen sich die Keimzahlen nach einigen Wochen Lagerung einander an. Nach 4 Wochen könnte ein Nährstoffmangel in der Molke herrschen, aber auch die Bildung bakterizider Substanzen kann für die Abnahme der aeroben mesophilen Keime verantwortlich sein. Der pH-Wert veränderte sich durch diese Keimzahlabnahme nicht merklich.

Die Lagertemperatur von 4°C erwies sich als ausreichend für eine mehrwöchige Lagerung der Molke im Hinblick auf die LPO-Aktivität. Die Zugabe von Thiovit® reduziert die LPO-Aktivität sehr stark und lässt sie innerhalb weniger Tage unter die Nachweisgrenze sinken.

Die exakten Differenzen zwischen den Erhitzungs- und Abkühlzeiten in der Käserei und im Labor konnten in dieser Untersuchung nicht erfasst werden und würden weitere Untersuchungen benötigen.

7. Makro- und mikroskopische Untersuchungen an Weinblättern und Weintrauben

Die Trauben- und Blattproben wurden vom Team um Jürgen Peter am Mittwochmorgen genommen und von Herrn Paget zusammen mit den Molkeproben ins Institut zur weiteren Untersuchung gebracht.

Es standen uns Blattproben erst ab der dritten Behandlungswoche zur Verfügung. Während des Versuchszeitraums wurden immer Kontrollen zwischen den jeweiligen Reihen durchgeführt um eine punktuelle Schädigung, welche das Ergebnis verfälschen würde, auszuschließen. Die jeweiligen Versuchsreihen waren ab Woche 3 zwei Kontrollreihen (T3 3 und T3 4), drei Reihen (T1 1, T1 2 und T3 5) mit dem Biospritzmittel (Zusammensetzung siehe Methoden), zwei Reihen (T3 1 und T3 2) mit einer unbehandelten Gemisch aus gleichen Teilen Molke-Wasser gemischt (auch Molke pur bezeichnet) und drei Reihe (T2 1, T2 2 und T2 3) mit einem Gemisch aus gleichen Teilen aus Wasser und Molke, welche bei 65°C 5 Minuten hitzebehandelt wurde. Hervorzuheben ist noch, dass während der gesamten Versuchsreihe auf Kupfer als Pflanzenschutzmittel gänzlich verzichtet wurde.

Ab Woche 9 wurde eine Reihe (T3 5) mit einer Mischung aus Molke und Biospritzmittel behandelt, sowie eine Reihe (T3 3) welche davor eine Kontrollreihe war, einmalig mit Molke behandelt. Diese Molke war zuvor 5 Minuten lang auf 65°C erhitzt worden, dann allerdings zwei Wochen bei 4°C in der Käserei im Kühlraum gelagert. Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Molke auch nach zweiwöchiger Lagerung und einmaligem Einsatz einen positiven Effekt besitzt.

Die letzte Spritzung erfolgte in der 14. Woche (11.08.2014-17.08.2014), danach fand ein zweiwöchiger Betriebsurlaub statt – von diesem Zeitraum standen uns auch keine Proben zur Verfügung. Ab Woche 17 (01.09.2014-07.09.2014) gibt es wieder Daten; zu diesem Zeitpunkt begann auch die Untersuchung der Trauben. Allerdings wurden die Probenahmen aus der Reihe, die mit der 2 Wochen alten Molke behandelt worden war, nach Beendigung des Betriebsurlaubes eingestellt. Daher werden diese Daten bei der Betrachtung entkoppelt und scheinen nicht in den beiden Haupttabellen auf. Die Datenerfassung endet mit der 20. Woche (22.09.2014-28.09.2014). Der Erntetermin der Versuchspartzellen war der 16.10. 2014.

Es folgen nun 4 Tabellen, die den Zustand der Blätter bzw. Trauben beschreiben sollen. Die Tabelle 11 bezieht sich dabei auf das jeweilige Resultat der Vorwoche, Tabelle 12 beschreibt den kurzen Zeitraum Spritzung mit 2 Wochen alter Molke. Tabelle 13 beschreibt die Veränderung des Befalles in Bezug auf die Kontrollzeile in derselben Woche. Abschließend beschreibt Tabelle 14 die jeweiligen Auffälligkeiten an den Trauben und vergleicht diese untereinander. Die Ausbringung der Molke-Wasser Mischung erfolgt mit einer manuellen Rückenspritzung. Damit wurde auch gewährleistet, dass die Blattunterseite benetzt wird.



Bilder 3-4: links - leichter Oidiumbefall an der Kontrollzeile (06.08.2014)
rechts - mit freiem Auge ist kein Peronosporabefall an der Zeile mit
unbehandelter Molke zu erkennen. (13.08.22014)

7.1. Untersuchungen der Weinblätter (jeweils auf die Vorwoche bezogen)

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritzmittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritzmittel
Woche 1: 12.05.2014- 18.05.2014	sehr regenreich und kühl.	Keine					
Woche 2: 19.05.2014- 25.05.2014	Sonnig, wolkenlos	Nekrosen an Blättern, meist alte Blätter					
Woche 3: 26.05.2014- 01.06.2014	regnerisch	Keine	einige Hyphen	>	>	>	
Woche 4: 02.06.2014- 08.06.2014	Eher kühl, mäßiger Wind	Bei der Kontrolle Bildung von Ölflecken	-	-	-	-	
Woche 5: 09.06.2014- 15.06.2014	sehr heiß, Mittwochs Gewitter	Entwicklungsstand der Trauben: Vollblüte	+	+	=	+	
Woche 6: 16.06.2014- 22.06.2014	angenehme Temperaturen, mit kleinen Niederschlägen	Entwicklungsstand der Trauben: Blühende	=	= (ca. gleich wie bei Kontrolle)	= (ca. gleich wie bei Kontrolle)	= (ca. gleich wie bei Kontrolle)	
Woche 7: 23.06.2014- 29.06.2014	etwas windig, sonnig, kleine Gewitter	Etwas Gescheins Botrytis	+	+	=	=	
Woche 8: 30.06.2014- 06.07.2014	Temperatur in der Nacht kühl	Keine Krankheitssymptome (Peronospora und Oidium)	=	-	=	=	

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritzmittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritzmittel
Woche 9: 07.07.2014- 13.07.2014	Etwas Regen, starke Abkühlung	Leichter Peronospora Befall	+	=	+	+	Beginn: >
Woche 10: 14.07.2014- 20.07.2014	Hochsommer- liche Temperaturen	Entwicklungsstand der Trauben: Traubenschluss	=	+	=	=	-
Woche 11: 21.07.2014- 27.07.2014	Schwül, heiß, kleine Regenschauer	Heuschreckenfraß bei Molkezeilen	+	-	+	+	+
Woche 12: 28.07.2014- 3.08.2014	Warm, schwül kleine Gewitter	Stabiler Oidium/Peronospora Befall	-	=	=	=	-
Woche 13: 04.08.2014- 10.08.2014	Warm, schwül, teilweise starke Gewitter	Schwarzschimmel auf Molkezeilen; mehr Peronospora	+	=	=	=	=
Woche 14: 11.08.2014- 17.08.2014	Regnerisch, kühl	Entwicklungsstand der Trauben: weichwerdend	+	-	=	-	=
Woche 15-16: 18.08.2014- 31.08.2014	Sehr feucht und regnerisch, nächste kühl (5°C)	Aufgrund eines Betriebsurlaubs nach Beendigung der üblichen Behandlung standen uns von diesem Zeitraum keine Blattproben zur Verfügung.					
Woche 17: 01.09.2014- 07.09.2014	Feucht und kühl	keine	=	+	=	=	=

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritzmittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritzmittel
Woche 18: 08.09.2014- 14.09.2014	warm, dann Abkühlung und Regen	keine	=	=	=	-	-
Woche 19: 15.09.2014- 21.09.2014	Viel Tau, leichter Temperaturanstieg	Bei Molke leicht verstärkter Spätperonospora- Befall	+	=	=	+	+
Woche 20: 22.09.2014- 28.09.2014	Kälter, etwas Regen	Molkezeilen: Botrytisfrei	=	+	+	=	=

Tabelle 14: Blattuntersuchungen (auf die Vorwoche bezogen) Legende: > : Mehr Befall als bei Kontrolle; ++ : starke Zunahme des Befalls im Vergleich zur Vorwoche; + : leichte Zunahme des Befalls im Vergleich zur Vorwoche.; = : ungefähr gleichviel Befall im Vergleich zur Vorwoche, - : etwas weniger Befall als Vorwoche.

Es sind uns zwar Wetterdaten und Beobachtungen am Weinstock der ersten beiden Behandlungswochen bekannt, allerdings erfolgten die Probenahmen erst ab der dritten Behandlungswoche. In dieser Woche wiesen die Kontrollzeilen die geringste Belastung von Hyphen auf. Bis Behandlungswoche 6 hatte sich dieses Niveau allerdings eingependelt. Danach gab es insgesamt eine kontinuierliche Zunahme des Befalles, welcher allerdings auf den Molke Zeilen etwas verzögert stattfand.

In den Behandlungswochen 9-11 gab es noch einmal eine stärkere Zunahme der Hyphen. In diesen Zeitraum fällt der Beginn der Behandlung einer Reihe mit Molke und Biospritzmittel in Kombination. Die Blätter dieser Reihe verhalten sich aber insgesamt sehr ähnlich wie die mit Molke behandelten Blätter (sowohl nicht erhitzt als auch erhitzt).

In den beiden Wochen 13 und 14 fielen an den mit Molke behandelten Blättern schwarze Punkte auf. Diese wurden als **Rußtau** identifiziert, eine Pilzart, welche sich vermutlich aufgrund des Milchzuckers an den Blättern gebildet hatte. Dieser Pilz bleibt aber an der Blattoberfläche und dringt nicht ins Innere ein. Eine größere Vermehrung hätte zur Beeinträchtigung der Photosynthese führen können; Nachdem aber die Molkebehandlung nach der 14. Woche beendet worden war, gab es diesbezüglich keine Probleme. Es war ein keine weitere Zunahme des Rußtaues zu erkennen, was die Vermutung nahe legt, dass sich dieser wirklich nur aufgrund des Vorhandenseins Lactose gebildet hatte. Möglicherweise lässt sich die Rußtaubildung bei geringerer Konzentration der Molkeaufbringung vermeiden, dies müssen aber weitere Studien erst zeigen.

Nach dem Betriebsurlaub (Woche 17) blieb der Hyphenbefall konstant. Insgesamt scheint die Molke die Infektion von Peronospora nicht gänzlich zu verhindern, verzögert allerdings das Ausbreiten der Hyphen nachweislich. Im Versuchszeitraum gab es allerdings einige Wetterextreme – daher kann keine genaue Angabe zur Oidium-Bekämpfung gemacht werden, da diese Erkrankung an keiner der Reben großflächig anzutreffen war [29].

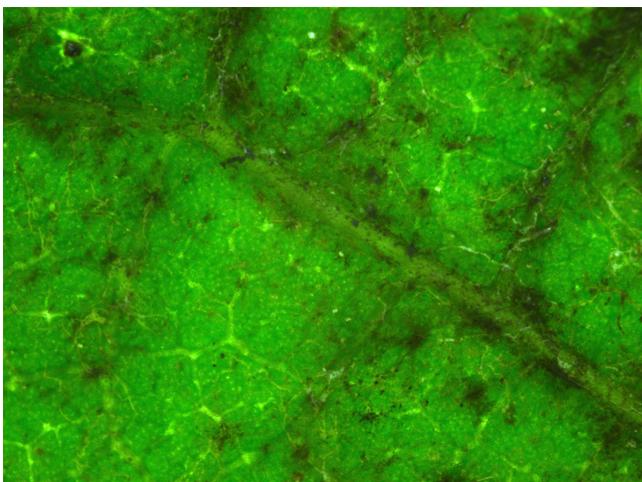


Bild 5: Mikroskopische Aufnahme der Zeile mit unbehandelter Molke, Versuchswoche 14 (11.08.2014-17.08.2014)

7.2. Zusätzliche einmalige Blattbehandlung mit einer vor Versuchsbeginn 2 Wochen lang gelagerten Molke

	Kontrolle	Molke 2 Wochen alt
Woche 9: 07.07.2014-13.07.2014	+	=
Woche 10: 14.07.2014-20.07.2014	=	=
Woche 11: 21.07.2014-27.07.2014	+	-
Woche 12: 28.07.2014-3.08.2014	-	=
Woche 13: 04.08.2014-10.08.2014	+	=

Tabelle 15: Vergleich der Veränderung der einmalig mit Molke behandelten Reihe bzw. Kontrollreihe mit der Vorwoche. Legende: + : leichte Zunahme des Befalls im Vergleich zur Vorwoche.; = : ungefähr gleichstarker Befall im Vergleich zur Vorwoche, - : etwas weniger starker Befall als Vorwoche. In Woche 9 ist das = auf die Kontrollzeile bezogen.

Der Vergleich der Kontrollzeile und der mit Molke behandelten Zeile fällt in den Zeitraum der Behandlungswoche 9-13 durchaus positiv für die Molke aus. Obwohl sie zwei Wochen gelagert war und nur einmal angewendet wurde, gibt es doch Unterschiede bei den beiden Zeilen. Es hatten sich in der mit Molke behandelten Zeile weniger Hyphen gebildet als bei der Kontrollzeile.

Allerdings können andere Einflussfaktoren wie bei allen Untersuchungen im Freiland nicht ausgeschlossen werden. Nach dem Betriebsurlaub (ab Woche 16) waren keine Veränderungen mehr erkennbar, daher wurden keine neuen Proben mehr genommen.

7.3. Blattuntersuchung auf die Kontrolle der jeweiligen Woche bezogen

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritz- mittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritz- mittel
Woche 1: 12.05.2014- 18.05.2014	Sehr regenreich und kühl	Keine					
Woche 2: 19.05.2014- 25.05.2014	Sonnig, wolkenlos	Nekrosen an Blättern, meist alte Blätter	Einige Hyphen	++	=	+	
Woche 3: 26.05.2014- 01.06.2014	Regnerisch	Keine	Leichte Abnahme der Hyphen	+	=	=	
Woche 4: 02.06.2014- 08.06.2014	Eher kühl, mäßiger Wind	Bei der Kontrolle Bildung von Ölflecken	Wenig Veränderung im Vergleich zur Woche 3	+	+	+	
Woche 5: 09.06.2014- 15.06.2014	Sehr heiß, Mittwochs Gewitter	Entwicklungsstand der Trauben: Vollblüte	Viele Hyphen aber wenig Verzweigungen	=	=	=	
Woche 6: 16.06.2014- 22.06.2014	Angenehme Temperaturen, mit kleinen Niederschlägen	Entwicklungsstand der Trauben: Blühende	Einige braune Flecken an den Blättern	=	=	-	
Woche 7: 23.06.2014- 29.06.2014	Etwas windig, sonnig, kleine Gewitter	Etwas Gescheins Botrytis	Im Vergleich zur Vorwoche starke Zunahme	-	=	=	

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritz- mittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritz- mittel
Woche 8: 30.06.2014- 06.07.2014	Temperatur in der Nacht kühl	Keine Krankheitssymptome (Peronospora und Oidium)	Mycel-Bildung	=	=	=	
Woche 9: 07.07.2014- 13.07.2014	Etwas Regen, starke Abkühlung	Leichter Peronospora Befall	Mycelen nur Blattadern, weniger weitläufig	=	=	+	+
Woche 10: 14.07.2014- 20.07.2014	Hochsommerliche Temperaturen	Entwicklungsstand der Trauben: Traubenschluss	Starke Zunahme, richtige Geflechte	=	-	-	-
Woche 11: 21.07.2014- 27.07.2014	Schwül, heiß, kleine Regenschauer	Heuschreckenfraß bei Molkezeilen	Rückgang des Befalls an den Blattadern	-	-	-	=
Woche 12: 28.07.2014- 03.08.2014	Warm, schwül kleine Gewitter	Stabiler Oidium/Peronospora Befall	Kaum Geflechte mehr - Hyphen an Blattadern	=	=	=	=
Woche 13: 04.08.2014- 10.08.2014	Warm, schwül, teilweise starke Gewitter	Schwarzsimmel auf Molkezeilen; mehr Peronospora	Zunahme der Hyphen auf ganzes Blatt	+	=	=	-
Woche 14: 11.08.2014- 17.08.2014	Regnerisch, kühl	Entwicklungsstand der Trauben: weichwerdend	Leichter Rückgang der Hyphen	-	-	=	=

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritzmittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritz- mittel
Woche 15-16: 18.08.2014- 31.08.2014	Sehr feucht und regnerisch, Nächte kühl (5°C)	Aufgrund eines Betriebsurlaubs nach Beendigung der üblichen Behandlung stehen uns von diesem Zeitraum keine Blattproben zur Verfügung.					
Woche 17: 01.09.2014- 07.09.2014	Feucht und kühl	Keine	Weniger Hyphen am vereinzelt weiße Flecken an Blatt-oberseite	+	=	-	=
Woche 18: 08.09.2014- 14.09.2014	Warm, dann Abkühlung und Regen	Keine	Weißer Flecken nur auf der Unterseite	=	=	=	-
Woche 19: 15.09.2014- 21.09.2014	Viel Tau, leichter Temperaturanstieg	Bei Molke verstärkt Spätperonospora-Befall	Einige weiße Flecken auch wieder an der Oberseite - Mycel	-	=	+	=
Woche 20: 22.09.2014- 28.09.2014	Kälter, etwas Regen	Molkezeilen: botrytisfrei	Leichter Rückgang der Hyphen	=	=	=	-

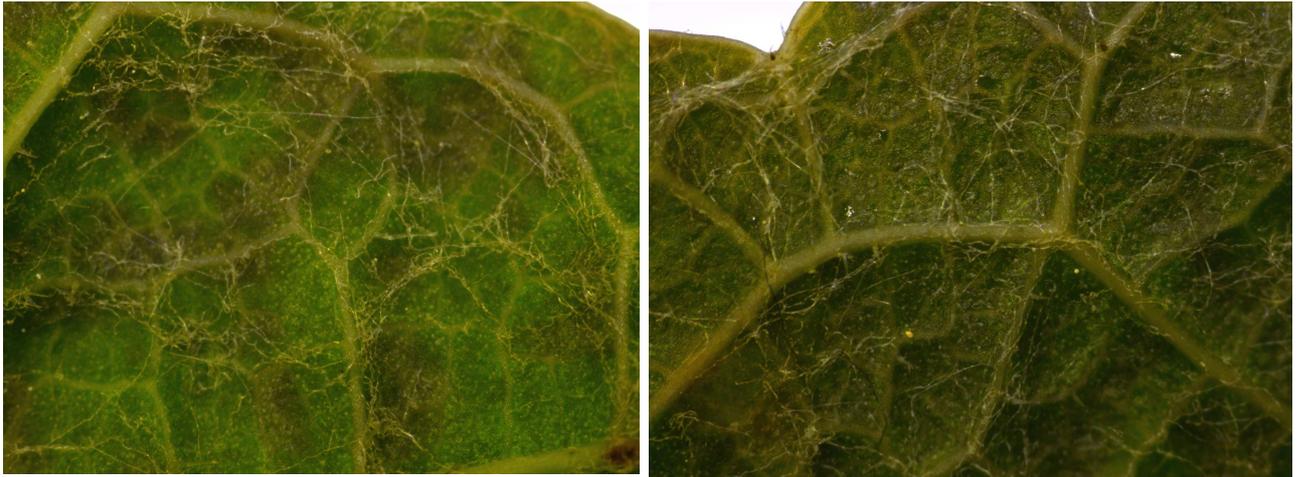
Tabelle 16: Blattuntersuchungen im Vergleich zur Kontrollzeile derselben Woche:

+ etwas mehr Befall als Kontrolle der gleichen Woche., ++ deutlich mehr Befall als Kontrolle der gleichen Woche. = in etwa gleicher Befall als bei Kontrollzeile der gleichen Woche; - weniger Befall als bei Kontrolle der gleichen Woche.

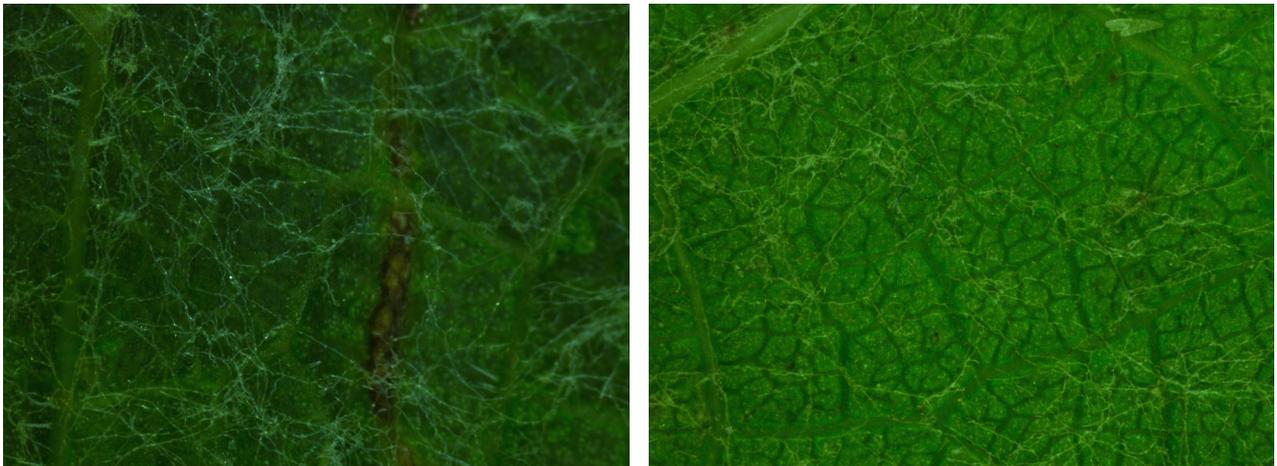
Erst beim direkten Vergleich mit den jeweiligen Kontrollzeilen fällt auf, dass die mit Molke behandelten Blätter etwas weniger Hyphenbefall aufwiesen als die aus den Kontrollzeilen. Die mit Biospritzmittels behandelten Blätter lagen bezüglich Befall dazwischen, die mit Molke/Biospritzmittelmischung behandelten Blätter zeigten ähnliche Tendenzen wie die mit Molke behandelten [32].

Es gab aber immer wieder Beobachtungsperioden in denen die Blätter in einem sehr ähnlichen Befallszustand waren. Woche 5, 8 und 12 sind dabei besonders hervorzuheben – in diesen Beobachtungswochen herrschte ein ungefähr gleicher Befall bei allen Versuchsreihen. An den mit Molke behandelten Blättern fand auch eine Hyphenzunahme statt, allerdings etwas verzögert im Vergleich zu den Kontrollen. Zu einem großflächigen Ausbruch von Peronospora kam es jedoch nirgends.

Zur Verdeutlichung der Untersuchungsmethode wurden hier exemplarisch jeweils zwei Blattproben verglichen und deren Beschreibung in Oben angeführter Tabelle:



Bilder 6-7: Mikroskopische Bilder der Blattproben von Versuchswoche 3 (26.05.2014-01.06.2014), links die Kontrollzeile, rechts die 65 °C 5 min behandelte Molkenzeile. In den Tabellen wurde der Vergleich als gleichwertig (=) charakterisiert.



Bilder 8-9: Mikroskopische Bilder der Blattproben von Versuchswoche 10 (14.07.2014-20.07.2014), links die Kontrollzeile, rechts die 65 °C 5 min behandelte Molkenzeile. In den Tabellen wurde dieser Vergleich als weniger Befall bei der Molkezeile (-) angegeben.

7.4. Untersuchungen an Trauben

Woche	Wetter	Auffälligkeiten	Kontrolle	Biospritzmittel	Molke unbehandelt	Molke 65° 5min	Molke+ Biospritzmittel
Woche 17: 01.09.2014- 07.09.2014	Feucht und kühl	keine	vereinzelt Botrytisbefall, Oidiumbefall	Vereinzelt Botrytisbefall	Kein Botrytis-Befall	Keine Botrytis-Befall	Vereinzelt Botrytis-Befall
Woche 18: 08.09.2014- 14.09.2014	warm, dann Abkühlung und Regen	keine	Leichte Zunahme der Botrytis, Abnahme des Oidiums	Kaum Botrytisbefall	leichte Risse in der Oberfläche einzelner Trauben	Keine Anfallende Schwarzfärbung erkennbar	Vereinzelt Botrytis-Befall
Woche 19: 15.09.2014- 21.09.2014	Viel Tau, leichter Temperaturanstieg	Bei Molke verstärkt Spätperonosporabefall	Ca. die Hälfte der Trauben sind Botrytisbefallen	Leichte Risse in manchen Oberflächen	Keine Graufäule	Keine Graufäule	Leichte weiße Verfärbung an der Traubenhaut
Woche 20: 22.09.2014- 28.09.2014	Kälter, etwas Regen	Molke-zeilen: botrytisfrei	Ca. 2/3 der Trauben sind von Botrytis befallen	Vereinzelte Risse und Botrytis-Befall	Keine Graufäule	Keine Graufäule	Keine Graufäule

Tabelle 17: Makro- und mikroskopische Untersuchungen an Trauben

Die Untersuchungen der Trauben wurden auch mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt. Dabei war anfangs ein Oidiumbefall in der Kontrollzeile festzustellen, dieser nahm dann allerdings ab. Am Ende waren bis auf einen abschließend starken Botrytisbefall an der Kontrollzeile bzw. einen leichten Befall an der mit Biospritzmittel behandelten Zeile keine großen Schäden sichtbar.

7.5. Bilder von Trauben am Ende des Beobachtungszeitraum



Bild 10-11: Bilder der Trauben nach Versuchswoche 20 (22.09.2014-28.09.2014) links der Kontrollzeile, rechts der Zeile welche mit dem Biospritzmittel behandelt wurde.

Es fällt augenscheinlich ein starker Botrytisbefall auf.



Bild: 12-13: Bilder der Traube nach Versuchswoche 20 (22.09.2014-28.09.2014) links die der Molke welche mit 65 °C 5 Minuten behandelt wurde, rechts die Zeile welche mit unbehandelter Molke behandelt wurde.

Beide Traubenproben zeigten praktisch keinen Botrytisbefall.

8. Diskussion der Blattuntersuchungen

Die Studie zeigt, dass die Behandlung der Weinstöcke mit Molke das Auftreten von *Peronospora* und *Oidium* verzögert. Die stärkste Wirkung scheint die Molkebehandlung allerdings auf die Graufäule also den Botrytisbefall zu haben. Eine Vermeidung der Infektion mit Botrytis bei den mit Molke behandelten Zeilen war gegeben, wohingegen die unbehandelte Kontrollzeile sowie die Zeile, welche nur mit Biospritzmittel behandelt worden war, vom Pilz befallen wurde. Dieses Ergebnis konnte bei *Peronospora/Oidium* nicht festgestellt werden, sondern nur eine Verzögerung der Hyphenausbreitung.

Die Kombination von Molke und Biospritzmittel zeigte auch eine Wirkung auf die Pilze. Eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit der Molke durch das Biospritzmittel konnte nicht festgestellt werden.

Unterschiede zwischen unbehandelter Molke und 65°C 5 Minuten lang behandelte Molke sind anhand der Blätter und Trauben des Weinstockes nicht erkennbar. Diese wurden allerdings bei den LPO-Aktivitäten festgestellt. Daher lässt sich daraus schließen, dass nicht nur die Lactoperoxidase für den fungiziden Effekt der Molke bei Weinreben verantwortlich ist.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um weitere Informationen für die Ursachen des fungiziden bzw. fungistatischen Effektes zu erhalten. Ob andere Arten der Besprühung, welche weniger Arbeitsaufwand benötigen, allerdings vermutlich weniger schonend wären und möglicherweise Unterschiede bei Blattober- und Blattunterseite bewirken, einen negativen Einfluss auf die Molkeausbringung zeigen, sollte noch getestet werden.

In wieweit das Mischungsverhältnis Molke-Wasser verändert werden kann, um noch immer einen fungiziden Effekt zu haben und die Rußtaubildung zu minimieren, muss auch noch erforscht werden.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl Ziegen- als auch Kuhmolke sind für den Einsatz im biologischen Weinbau geeignet und zeigen fungizide bzw. fungistatische Eigenschaften. Dies hat eine mehrwöchige Behandlung an Molkereihen nachweislich gezeigt. Auch eine Kombination mit einem Biospritzmittel zeigte einen Effekt auf das Hyphenwachstum an den Weinblättern.

Bei einer parallel verlaufenden Laboruntersuchung wurden vor allem die Lagerstabilität der Molke sowie die Lactoperoxidase(LPO)-Aktivität gemessen, da das Lactoperoxidase-System als vielversprechendste Komponente für diesen fungiziden Effekt identifiziert wurde.

Verschiedene Pasteurisierungsverfahren wurden getestet, wobei sich eine 5 minütige Behandlung auf 65 °C als am besten für eine möglichst hohe LPO-Aktivität erwiesen hat. Die Absolutwerte der LPO-Aktivität besitzen zwar molkebedingt Abweichungen, ein üblicher Verlauf von pH-Wert und aerober mesophiler Gesamtkeimzahl konnte allerdings festgestellt werden.

Eine Zugabe von Thiocyanat, eine Komponenten des LPO-Systems wurde bei der pasteurisierten Molke durchgeführt, allerdings wies die Zugabe keine großen Unterschiede zur ausschließlich hitzebehandelten Molke auf.

Für die Erhaltung der LPO-Aktivität und die Reduktion der aeroben mesophilen Keime in der Molke ist ein Pasteurisierungsverfahren von 65°C 5 Minuten gut geeignet.

Zusätzliche Zugabe von Kaliumthiocyanat erhöht die LPO-Aktivität vor allem bei längerer Lagerung, es ist aber jeweils abzuschätzen, ob dies bei der verwendeten Molke bzw. den in der Praxis üblichen Lagerzeiten überhaupt nötig ist. Eine Lagerzeit von über 5 Wochen reduziert die LPO-Aktivität stark und sollte daher vermieden werden.

Im biologischen Weinbau kann eine Molkebehandlung zum fungiziden Schutz von Weinreben eingesetzt werden. Besonders gegen Graufäule ist eine weitreichende Wirkung der Molke zu erkennen. Die Freilandversuche zeigten, dass die pasteurisierte Molke eine genauso gute Wirkung entfalten konnte wie die frische Molke, allerdings bis zu zwei Wochen ohne großen Wirkungsverlust gelagert werden konnte. Andere präventive Maßnahmen gegen Pilzbefall sollten aber keinesfalls vernachlässigt werden.

10. Literaturverzeichnis

- [1] E. Speer, *Technologien der Milchverarbeitung*, 7 Auflage. Behr's Verlag GmbH & Co., 1997.
- [2] Agrarmarkt Austria, "Molke- Der Wohlfühldrink aus der Natur," 2002.
- [3] P. Löffler, *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 2003, p. 685ff.
- [4] "Lactose." [Online]. Available: <http://de.wikipedia.org/wiki/Lactose>. [Accessed: 09-Sep-2014].
- [5] "Milchsäure." [Online]. Available: <http://de.wikipedia.org/wiki/Milchsäure>. [Accessed: 09-Sep-2014].
- [6] E. Schlimme and W. Buchheim, *Milch und ihre Inhaltsstoffe - Chemische und physikalische Grundlagen*. 1995.
- [7] I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, A. R. Madureira, and F. X. Malcata, "Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties," no. 1984, 1998.
- [8] J. Schwarz, "Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen," 2006.
- [9] "Lysozym," 2014. [Online]. Available: <http://flexikon.doccheck.com/de/Lysozym>. [Accessed: 12-Sep-2014].
- [10] S. Priyadarshini and V. K. Kansal, "Lysozyme Activity in Buffalo Milk: Effect of Lactation Period, Parity, Mastitis, Season in India, pH and Milk Processing Heat Treatment," 1980.
- [11] G. A. Cavender, "Lactoperoxidase: History, Structure and Function Abstract," 2009.
- [12] A. Töpel, *Chemie und Physik der Milch*. Behr's Verlag, 2007.
- [13] P. J. De-Spiegeleer, K. V. Sermon, and A. A. Michiels, "Role of Porins in Sensitivity of Escherichia coli to Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase Enzyme System," *Appl. Environmental Microbiol.*, vol. 71, pp. 3512-3518, 2005.
- [14] M. E. Belding, S. J. Klebanoff, and C. Ray, "Peroxidase-Mediated Virucidal Systems," *Science (80-.)*, vol. 167, pp. 195-196, 1970.
- [15] K. D. Kussendrager and A. C. M. v Hooijdonk, "Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications," *Br. J. Nutr.*, vol. 84, pp. 19-25, 2000.

- [16] I. A. Sheikh, A. K. Singh, N. Singh, M. Sinha, S. B. Singh, A. Bhushan, P. Kaur, A. Srinivasan, and T. P. Singh, "Structural Evidence of Substrate Specificity in Mammalian Peroxidases: Structure of the thiocyanate complex with lactoperoxidase and its interactions at 2.4 Å resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 284, pp. 14849–14856, 2009.
- [17] K. Kadish, M. Smith, K. M., and R. Guilard, "The Porphyrin Handbook," vol. 4, 2000.
- [18] S. Min and J. M. Krochta, "Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin , Lactoferrin Hydrolysate , and Lactoperoxidase Systems," *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 2, 2005.
- [19] S. Min, L. J. Harris, and J. M. Krochta, "Antimicrobial Effects of Lactoferrin , Lysozyme , and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 permeability," *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 7, 2005.
- [20] A. H. Soomro, S. A. Brohi, M. Khaskheli, and A. H. Nizamani, "Fermentability and rheological properties of lactoperoxidase activated buffalo milk yoghurt," *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 983–997, 2012.
- [21] H. Rajeswary, R. Dhanappriya, and M. Deccaraman, "Antimicrobial activity of whey powder produced by non-thermal method," *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 682–689, 2011.
- [22] T. Tran Le, P. Sabatino, B. Heyman, M. Kasinos, H. H. Dinh, K. Dewettinck, J. Martins, and P. Van der Meeren, "Improved heat stability by whey protein-surfactant interaction," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 4, pp. 594–603, Jun. 2011.
- [23] K. K. J. Burrington, "Whey Protein Characteristics," 2011.
- [24] E. I. Elagamy, "Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins," *Food Chem.*, vol. 68, 2000.
- [25] P. C. Lorenzen, D. Martin, I. Clawin-Rädecker, K. Barth, and K. Knappstein, "Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment," *Small Rumin. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 18–23, Mar. 2010.
- [26] A. N. Al-Baarri, M. Ogawa, and S. Hayakawa, "LPO system in bovine whey effect of storage," *Int. J. Dairy Sci.*, vol. 6, pp. 72–78, 2011.
- [27] C. P. Nieuwenhove, C. V. Gutiérrez, M. S. Nuñez, and S. N. González, "LPO and lysozyme activity in buffalo milk from Argentine," *J. Anim. Vet. Adv.*, vol. 7, pp. 431–433, 2004.

- [28] "Ökologischer Weinbau." [Online]. Available: http://de.wikipedia.org/wiki/Ökologischer_Weinbau . [Accessed: 17-Sep-2014].
- [29] A. Häseli, "Krankheit und Schädlingsregulierung im biologischen Weinbau, Forschungsinstitut für biologischen Landbau," 2009.
- [30] D. Molitor, D. Heibertshausen, O. Baus, B. Loskill, and M. Maixner, "Originalarbeit Regulierung von pilzlichen Pathogenen an Weinreben – eine Alternative für den ökologischen Rebschutz? Originalarbeit," vol. 62, no. 12, 2010.
- [31] P. Crisp, T. J. Wicks, G. Troup, and E. S. Scott, "Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew," *Australas. Plant Pathol.*, vol. 35, no. 5, p. 487, 2006.
- [32] U. Hofmann, "Weinbau- Pflanzenbauliche Massnahmen , Kupferreduzierung , Einsatz von Kupferalternativen," 2008.