Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie

Prozesseinflüsse auf die Kompatibilität von Proteinen und Polysacchariden in Mischgelen

Felix Sedlmeyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Horst-Christian Langowski

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing.habil. Ulrich M. Kulozik
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Jörg Hinrichs
   (Universität Hohenheim)

Die Dissertation wurde am 19. Juni 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11. September 2007 angenommen.

Sedlmeyer, Felix:
Prozesseinflüsse auf die Kompatibilität
von Proteinen und Polysacchariden
in Mischgelen. - Gauting: F.Sedlmeyer, 2007

Vorwort III
Inhaltsverzeichnis IV
Formelzeichen & Dimensionen, Abkürzungen ... VI
Zusammenfassung IX
Summary XIII
Resumé XVII
Resumen XXI

Wenn Wind aufkommt

- macht sich der Schaumschläger mit einer Orkanwarnung wichtig -
- klagt der Pessimist über bevorstehenden Sturm -
- hofft der Optimist, dass die Wolken weggeschoben werden -

und der Realist setzt die Segel.

© 2007 F.Sedlmeyer im Selbstverlag, D-82131 Gauting, Oberbayern
Vetrieb: fxsed@mytum.de +49-1782-373590
Satz: QuarkXpress™ 6.1 für MacOS 10.2
Druck: Auftragsdruck, A-4020 Linz, Oberösterreich

- Vorwort -

Der Abschluss als jahrgangsbester Agraringenieur bestärkte meinen Wunsch, eine Promotionsarbeit anzufertigen. Aufgrund meines interfakultären Studienschwerpunkts “Milchwissenschaften” reizte mich eine Aufgabenstellung an der Schnittstelle zwischen Prozesstechnik, Chemie und Physik.

Die ersten Erfahrungen im Themenbereich Biopolymermischsysteme ergaben sich dann während der Durchführung des AiF-Projekts Nr.12779N von 2001 bis 2003. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Selda Bulca und Susanne Keim für die Einführung in Membrantechnologie und die Hilfe bei der Herstellung von molkenproteinfreiem, nativem Casein bedanken. Hier sind auch alle an diesem interessanten Projekt Beteiligten zu nennen: Markus Pentenrieder, Britta Rademacher, Ruth Hinrichs, Manfred Huss, Günther Unterbuchberger, Joachim Götz, Thea Kerschbaumer und last but not least das Mitglied der Kaltenberger Ehrenloge, Manni Brack. Dank sei weiters allen Studenten/-innen der Lebensmitteltechnologie, die bei mir eine Semester-, Diplom-, Bachelor- oder Masterarbeit durchführten und damit vielfältige Projektergebnisse erarbeitet haben: Katharina Daimer, Suncica Haseta, Nadine Igl, Verena Egger, Juan-Pablo Campos.

Vor allem Herrn Prof. Kulozik gebührt hierbei der Dank für die verschiedenen Möglichkeiten zur Durchführung dieser Projektarbeiten an seinem sehr gut ausgestatteten Lehrstuhl, im Besonderen schließlich aber auch für die sehr interessante und herausfordernde Themenstellung zur Dissertation und seine kritischen, didaktisch wissenschaftlichen Anregungen während der Fertigstellung dieser Arbeit. Herrn Prof. Hinrichs danke ich für die Übernahme des 2. Prüfers und Herrn Prof. Langowski für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Dank auch an die 3 von der Werkstatt für Rat und Tat im Technikum und die Anfertigung der Messkörper für die Rheometer: Erich Schneider, Franz Fraunhofer und Christian Ederer. Ein Dankeschön gebührt ebenfalls den ungenannten Lehrstuhlmitarbeitern/-innen, die bereit waren, ihre Zeit in die Übernahme und Durchführung von allgemeinen, fachfremden Aufgaben zu investieren und die damit die Forschungsarbeiten aller einzelnen ermöglichten.

Dank für ihre Geduld und ihr Interesse während der gesamten Zeit und insbesondere während des Promotionsstudiums ab WS03/04 bis SS06 meinen Eltern, Rafael, Silke, Sofia, Alma, Udo und nicht zuletzt Helene. Besonders wertvoll für das fachliche Vorankommen waren viele Fragensteller bei Präsentationen auf internationalen Tagungen und die kritischen Kommentare der Reviewer bei meinen Veröffentlichungen. Hier auch ein sehr großes Dankeschön an Maté Mesic, Graham Mapp und Sigismundo Klein, ehem. Professor del Departamento de Física en la Universidad Nacional, Bogotá, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Nach Festlegung der Themenstellung 2004 wurden von mir bis 2006 die Versuchsreihen und Messungen zum Carrageenan-Milchproteinsystem durchgeführt. Bei dieser interessanten, längeren Arbeit mit Biopolymeren natürlichen Ursprungs kristallisierten sich verschiedene wertvolle Erfahrungen für diese und meine weiteren wissenschaftlichen Arbeiten heraus, die sich am einfachsten mit folgenden Zitaten zusammenfassen lassen:

"Unicausal explanations make nice stories, but fail to capture the complexities of the real world."
(Pratchett, Stewart & Cohen: The Science of Discworld III)

"Siempre habrá gente que te lastime, asi que lo que tienes que hacer es seguir confiando y sólo ser más cuidadoso en quien confías dos veces.”
(Gabriel García Marquez)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Grundlagen und Stand des Wissens 3
2.1 Chemisch-physikalische Grundlagen 3
2.1.1 Thermodynamik 3
2.1.2 Elektrische Wechselwirkungsphänomene 16
2.1.3 Chemisches Potential 22
2.1.4 Anwendung der theoretischen Modelle 24
2.1.5 Messtechnische Erfassung verschiedener Produktzustände von realen komplexen Lebensmittelsystemen 26
2.1.6 Geltypen und -aufbau 35
2.2 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Milch 39
2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Carrageenan 44
2.3.1 Aufbau und Typen 44
2.3.2 Faktoren für die Geleigenschaften 47
2.3.3 Besonderheit: Reaktivität von Milch gegenüber Carrageenan 49
2.4 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Pektin 57
2.4.1 Aufbau und Typen 57
2.5 Auswirkungen thermischer und mechanischer Verfahrensschritte auf Biopolymere 61

3. Problemstellung & Lösungsansatz 64
3.1 Motivation und Ziele 64
3.2 Lösungsansatz 65

4. Material und Methoden 67
4.1 Material 67
4.2 Methoden 68
4.2.1 Herstellung der Biopolymermischungen 68
4.2.2 Charakterisierung der Biopolymermischungen 71

5. Ergebnisse und Diskussion 81
5.1 Carrageenan-Milchproteinmischung im neutralen pH-Bereich 81
5.1.1 Vorüberlegungen und Auswahl des Beispielsystems und der prozesstechnischen Experimente 81
5.1.2 Einfluss von Erhitzungstemperatur und Kühlrate 84
5.1.3 Einfluss von Carrageenankonzentration und UHT-Bedingungen 91
5.1.4 Rolle der Vorerhitzungsbedingungen / Molkenproteine 109
5.1.5 Variation der UHT-Heißhaltezeit 119
5.1.6 Einfluss von Scherkräften während der Herstellung von Carrageenan-Milchproteinsystemen 127
5.1.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zu Carrageenan und Milchprotein 147
5.2 Pektin-Milchproteinmischungen im sauren pH-Bereich 153
5.2.1 Vorüberlegungen und Auswahl des Beispielsystems 153
5.2.2 Einfluss von Scherkräften auf Pektin-Milchprotein-Mischsysteme 156
5.2.3 Einfluss der Kombination von Scherkräften und minoren Komponenten 160
5.2.4 Einfluss der Vorerhitzung auf das saure Pektin-Milchproteinsystem 162
5.2.5 Einfluss des finalen Erhitzungsschritts auf saure Pektin-Milchproteinsysteme 165
5.2.6 Einfluss einer partiellen Hydrolyse des Pektin auf die Mischsystemstabilität 176
5.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zu Pektin und Milchprotein 180

6. Resümee und Ausblick 184

7. Anhang 187

Formelzeichen und Dimensionen, Abkürzungen

Soweit nötig, werden zur besseren Anwendbarkeit der Formeln die grundlegenden SI-Einheiten durch einen Faktor ergänzt. Die Dimensionen von Koeffizienten u.ä. beziehen sich auf die Anwendung der jeweiligen Gleichung im Grundlagenteil. Die Auswahl der Symbole für die einzelnen Formelzeichen orientierte sich an Standardwerken der physikalischen Chemie (z.B. ATKINS, 1990), ebenso sind hier auch die wichtigsten Abkürzungen angeführt. Begriffe wie "Proteinpartikel", "Proteincluster", "Proteinaggregate" etc. werden sinngleich verwendet und beziehen sich auf die im einzelnen Zusammenhang beschriebenen Entitäten von aneinandergelagerten Proteineinheiten des jeweiligen Beispielbiopolymermischsystems.

A	freie Energie [J]
A	Konstante [$J \cdot cm^{-1} \cdot mV^{-2}$]
AG	Anydrogalactose
a	Teilchenradius [cm]
a_i	Konzentrationsaktivität der Komponente i [-]
$A_{y,z}$	zweiter Virialkoeffizient bzgl. Polymere y und z [je Gleichungsansatz]
B	Koeffizient [Pa^{-1}]
B	Konstante [J·cm]
C	Koeffizient [Pa^{-2}]
CCA	Cluster-Cluster-Aggregationsmodell
CLSM	confocal laser scanning microscope
c_i	Stoffkonzentration von i [-]
D	elektrisches Dipolmoment [D]: 1 D = 3,336 10^{-30} C · m
D	fraktale Dimension [-]
DG	Denaturierungsgrad
DSC	differential scanning calorimetry
d_R	Konstante, entspricht dem Phasenwinkel nach vollst. Strukturwiederaufbau [°]
e_0	Elementarladung: 1,602177 · 10^{-19} C
F	Faraday-Konstante: 96484,56 C·mol^{-1}
G	freie Enthalpie [J]
G'	elastischer Anteil in einer viskoelastischen Struktur [Pa]
G''	viskoser Anteil in einer viskoelastischen Struktur [Pa]
G_{N0}	elastischer Modulus am Phasenwinkelminimum (LARSON, 2003) [Pa]
H	Enthalpie [J]
I	Ionenstärke [$mol \cdot kg^{-1}$]
k	Boltzmannkonstante: 1,380662 · 10^{-23} J· K^{-1}
LSD	Fisher's least significant difference; Mindestsignifikanzintervall
M_e	Verschlaufungsmolekulargewicht [g/mol]

m_i	Kettenlänge des Polymers i [Monomereinheiten]
N	relative Strukturstabilität
N_L	Loschmidtsche Zahl: $6{,}022045 \cdot 10^{23}$ mol^{-1}
$n_{(i)}$	Stoffmenge (der Polymerkomponente i) [mol]
p	Druck [Pa]
p_i	Partialdruck des Stoffes i [Pa]
q	Wärmemenge als allgemeine Energie in Form von Wärme (ATKINS, 1990) [J]
R	allg. Gaskonstante: $8{,}31441$ $J \cdot (mol \cdot K)^{-1}$
R	Abstand der Teilchenmittelpunkte [cm]
r	Entfernung [cm]
r_d	Dicke der Doppelschicht [cm]
r_D	Debyesche Länge [cm]
S	Entropie $[J \cdot K^{-1}]$
S	Strukturstabilität [Pa]
S_0	Strukturstabilität bei Herstellung mit UHT-Erhitzung bei 120 °C für 2,5 s [Pa]
s	Abstand der Oberflächen [cm]
T	Temperatur [°C] bzw. [K]
T_{trans}	Temperatur beim Phasengleichgewicht [°C] bzw. [K]
t_R	(Ruhe)zeit nach Vorscherung zum Strukturwiederaufbau [s]
U	innere Energie [J]
UHT	Ultrahocherhitzung
V	Volumen [cm^3] bzw [dm^3=L]
$V_{Abstoßung}$	potentielle Energie [J]
$V_{Anziehung}$	potentielle Energie [J]
V_m	molares Volumen $[L \cdot mol^{-1}]$
VK	Virialkoeffizient [je Gleichungsansatz]
v_w	Steigung, entspricht der Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit [°/s]
W	Anzahl der Möglichkeiten zur Energieverteilung [-]
x_i	Molenbruch von Stoff i [-]
y	Kettenlänge des Polymers y [Monomereinheiten]
z	Kettenlänge des Polymers z [Monomereinheiten]
z_i	Zahl der Ladungen des Ions i [-]
γ_i	Aktivitätskoeffizient der Komponente i [-]
δ	Phasenwinkel delta [°]
ΔG_M	freie Mischungsenthalpie [J]
ΔG_{mix}	freie Gibbsche Mischungsenthalpie [J]
ΔH_{trans}	Enthalpieänderung am Punkt des Phasengleichgewichts [J]
ΔS_{mix}	Mischungsentropie pro Mol $[J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}]$

ΔS_M	Mischungsentropie [J · K^{-1}]
ε_0	Dielektrizitätskonstante im Vakuum: 8,85419 · 10^{-12} J^{-1}C^{2}m^{-1}
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante des ionenfreien Lösungsmittels [-]
ζ	zeta-Potential [mV]
Θ_i	einwirkendes elektrisches Potential auf die Komponente i [V]
μ_i	chemisches Potential der Komponente i in Lösung [J· mol^{-1}]
μ^*_i	elektrochemisches Potential der Komponente i [J· mol^{-1}]
$\mu 0i$	chemisches Potential der Komponente i [J· mol^{-1}]
ρ_0	Dichte [kg · m^{-3}]
Φ_i	Volumenbruch des Polymers i [-]
Φ_j	Volumenbruch des Polymers j [-]
ϕ_i	elektrisches Potential des Zentralions i [V]
Φ_s	Volumenbruch des Solvents [-]
Φ_y	Volumenbruch des Polymers y [-]
Φ_z	Volumenbruch des Polymers z [-]
χ_{ij}	Wechselwirkungsparameter zwischen Polymer i und j [je Gleichungsansatz]
$[\eta]$	innere Viskosität [L/g]
η_o	Viskosität des Lösungsmittels [Pa•s]
η_{red}	reduzierte Viskosität [L/g]
η_{rel}	relative Viskosität [-]
η_{sp}	spezifische Viskosität [-]
υ	Formfaktor [-]
v_s	spezifisches Volumen [L/g]

Zusammenfassung

Der Zusatz von Polysacchariden zu Lebensmitteln und auch vielen Milchprodukten dient dem Erreichen bestimmter sensorischer Eigenschaften (Textur), der Erhöhung des Ballaststoffgehalts und der Stabilisation des Produktes. Die Anordnungsmöglichkeiten der Makromoleküle im System sind jedoch aufgrund der Kettenlänge und der möglichen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Biopolymeren beschränkt. Inkompatibilität zwischen Biopolymeren ist ein wenig bekanntes, dennoch verbreitetes Phänomen in der Lebensmitteltechnologie, welches thermodynamische Ursachen hat, jedoch vielfach auch von Prozessbedingungen in einer bisher kaum vorhersagbaren Weise beeinflusst wird. Daher treten kompatible (homogen mischbare) Systeme oft nur in einem relativ engen Bereich verschiedener Mischungsverhältnisse der Biopolymere auf.

Prozessinduzierte Veränderungen einzelner Inhaltsstoffe im Mischsystem können dazu führen, dass der kompatible Bereich im Phasendiagramm verlassen wird und das System deutliche, makroskopisch sichtbare Entmischungserscheinungen aufweist. In der Praxis bedeutet dies oft ein unerwartetes Verhalten eines als stabil eingestuften Produktsystems, wenn eine Anpassung des vorgegebenen Prozessablaufs an bestehende Anlagen vorgenommen wird.

Ziel dieser Arbeit ist daher eine systematische Untersuchung der Auswirkungen ausgewählter Prozessparameter auf die Textur und Stabilität von Biopolymermischungen, um die prozessinduzierte Verschiebung der Kompatibilitätsgrenzlinie und die Gründe hierfür zu erfassen.

Zwei in charakteristischer Weise unterschiedliche Beispielsysteme wurden hierfür ausgewählt:

1.) Neutrales Milchsystem (3,4 % Protein) mit Carrageenanzusatz

2.) Gesäuertes Milchsystem (1,2% Protein) mit Pektin und Zuckerzusatz

Beide Systeme sind weit verbreitet, wie z.B. bei Trinkkakao (Carrageenansystem) oder bei Trinkjoghurt-Fruchtsaftmischungen (Pektinsystem). Die Systeme unterscheiden sich grundsätzlich in Art und Aufbau des Polysaccharids und den daraus resultierenden Wechselwirkungsmöglichkeiten mit Milchproteinen, welche die zweite Biopolymerkomponente darstellen. Die Herstellung der hier untersuchten Mischungen erfolgte an einer UHT-Pilotanlage mit Hochdruckhomogenisator. Untersucht wurde der Einfluss der Erhitzungsbedingungen (73-140 °C) und des Homogenisationsdrucks (200 bis 800 bar) sowie die Reihenfolge verschiedener Prozessschritte im Herstellungsablauf (Mischungszeitpunkt, Vorerhitzung der Milchproteine).

Die Zusammensetzung der Mischungen wurde so variiert, dass im Vergleich zur jeweiligen Standardmischung die Auswirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe bei verschiedenen Prozessbedingungen auf die Textur des Mischsystems herausgearbeitet werden konnten.

Die thermodynamisch bzw. prozesstechnisch induzierten Veränderungen wurden messtechnisch mittels Rheologie- und Partikelgrößenmessungen erfasst. Durch Analyse der Viskositätskurve einer angepassten Schubspannungsprozedur und parallel dazu durchgeführte zerstörungsfreie oszillatorische Messungen ergaben sich zur Erfassung von relevanten Textureigenschaften verschiedene unabhängige rheologische Kennzahlen, wie beispielsweise der Phasenwinkel delta oder die Spannungsbelastungsgrenze einer Struktur. Die Messprozeduren wurden zudem so abgestimmt, dass sie das Verhalten der Mischung nach mechanischen Belastungen mit niedrigem

Schergradienten während der Lagerung widerspiegeln. Partikelgrößenmessungen dienten zur Beschreibung der Mikrostruktur und zur Identifizierung von prozessinduzierten Veränderungen einzelner Inhaltsstoffe.

Bei dem **Milchprotein-Carrageenan-System** mit ca. 0,03 % Carrageenan entsteht eine von den UHT-Bedingungen abhängige, schwache Netzwerkstruktur. Die aus Carrageenansträngen und Proteinclustern zusammengesetzte Mischstruktur ist kein stichfestes, sondern ein schwaches Gel. Bei kurzfristigen Belastungen, wie beispielsweise beim Ausgießen oder während des Schluckvorgangs, ist das System fließfähig, ansonsten weist es stoffliche Eigenschaften eines echten Gels auf, wie z.B. einen elastischen Anteil der Ruhestruktur.

Das sensorische Empfinden der Vollmundigkeit und entsprechend auch die Stabilität bzw. physikalische Haltbarkeit dieser schwachen Gelstruktur verstärkt sich mit steigender Temperatur im UHT-Bereich (120-139 °C). Erst in diesem Temperaturbereich ergeben sich Veränderungen an den Caseinmicellen, wie z.B. die Freisetzung von Calciumionen, die der Wechselwirkung mit Carrageenanmolekülen förderlich sind. Bei Milchsystemen mit einem Carrageenanzusatz bedeutet dies, dass allein die Wahl der UHT-Erhitzungsbedingungen entscheidet, ob eine durchgehende schwache Gelstruktur aufgebaut wird oder nur unzusammenhängende Strukturen entstehen. Für eine effektive Stabilisierung weiterer in der Mischung vorhandener Kolloide, wie beispielsweise Kakaopartikel, muss die Gelstruktur jedoch stark genug sein, um eine Sedimentation der Partikel zu verhindern. Andererseits darf die Gelstruktur nicht zu stark ausgebildet werden. Die Mischstruktur würde dann von Carrageenan dominiert und es könnten Synäreseerscheinungen mit einem puddingähnlichen Sediment auftreten.

Die Arbeit zeigt, dass unter Normalbedingungen stabile Systeme mit steigender UHT-Temperatur in den Bereich unerwünschter Textureigenschaften verschoben werden. Der Hauptgrund liegt in der prozessabhängigen Ausformung von Proteinmikroclustern, welche für zusätzliche Verbindungen zwischen benachbarten Carrageenanhelices sorgen und damit die rheologischen Eigenschaften und die Textur des Mischsystems stark beeinflussen.

Ein Gegenspieler zu dem die Biopolymerinteraktion verstärkenden Effekt der UHT-Erhitzungsbedingungen ist die Belastung durch Scherkräfte während des Herstellungsprozesses. Mit einem Hochdruckhomogenisator (0 bis 800 bar) wurden die im UHT-Schritt ausgebildeten Proteincluster definierten Scherbelastungen unterworfen. Dabei zeigte sich, dass abhängig von der Homogenisationstemperatur die Funktionalität der einzelnen Inhaltsstoffe bei hohen Druckstufen verloren gehen kann. Für ein homogenes Mischprodukt stellen Scherbelastungen in praktischen Verfahren zwar einen notwendigen Prozessschritt dar, die Intensität muss jedoch sorgfältig ausgewählt werden.

Da der zusammengesetzten Biopolymerstruktur eine spezifische elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Sulphatgruppen am Carrageenanstrang und der Caseinmicellenoberfläche zugrundeliegt, kommt dem Mischungszeitpunkt und den Vorerhitzungsbedingungen eine entscheidende Bedeutung zu. Aufgrund der Nähe der jeweiligen reaktiven Zentren auf der Micellenoberfläche besteht eine Konkurrenzsituation zwischen der Ausbildung der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Polysaccharid und der Knüpfung kovalenter Bindungen bei der Komplexbildung von denaturierten Molkenproteinen mit Caseinen. Ist die Oberfläche der

Caseinmicellen bei der Zugabe von Carrageenan bereits durch die kovalente Bindung von Molkenproteinen belegt, findet keine Integration der Milchproteinaggregate in die texturbestimmende Netzwerkstruktur mehr statt.

Auch bei dem gesäuerten **Milchprotein-Pektin-System** wurde der Einfluss von Erhitzungsbedingungen und Homogenisation untersucht. Die Carboxylgruppen des Pektins sind nicht so stark elektronegativ wie die Sulphatgruppen des Carrageenans. Da die Ausbildung des Biopolymerkomplexes bei diesem System auf einer Gleichgewichtsreaktion beruht, kommt hier dem Verhältnis der Reaktionspartner eine stärkere Bedeutung zu.

Eine Variation des Homogenisationsdrucks verdeutlicht jedoch, dass es dabei nicht so sehr auf das absolute Mengenverhältnis zwischen Pektin und Protein ankommt. Entscheidend ist vielmehr die Größe der gesamten Proteinoberfläche, die durch das Polysaccharid stabilisiert werden muss. Diese Gesamtoberfläche hängt von der Partikelgrößenverteilung ab, denn das Oberflächen-Volumen-Verhältnis von zu stabilisierenden Partikeln steigt mit geringer werdendem Partikeldurchmesser drastisch an. Die Partikelgrößenverteilung ist besonders durch die Scherbedingungen im ersten Prozessschritt, der Homogenisation, bestimmt. Da eine Entmischung nach den grundlegenden physikalischen Zusammenhängen im Prinzip durch eine Erhöhung des Feinpartikelanteils vermindert wird, zeigt sich hier eine Hochdruckhomogenisation (500-800 bar) als vorteilhaft. Voraussetzung ist jedoch eine entsprechend angepasste Pektinmenge, die in der Lage ist, diese neu geschaffenen Oberflächen zu bedecken und so in Kombination mit diesen Prozessbedingungen zu einer deutlichen Verbesserung der Stabilisierung der Biopolymermischung führt.

Dieses Zusammenspiel von Prozessbedingungen im ersten Prozesschritt und Zusammensetzung des Systems bleibt jedoch nur bestehen, wenn im darauffolgenden Erhitzungsschritt die Erhitzungsbedingungen in geeigneter Weise eingestellt sind, d.h. keine zu hohen Temperaturen gewählt werden. Untersucht wurde der Bereich von 73 bis 140 °C. Dabei zeigte sich, dass aufgrund der temperaturabhängigen Verschiebung des pH-Werts verschiedene Faktoren negativ beeinflusst werden, die in der Summe für eine erfolgreiche Stabilisierung der Proteinpartikelsuspension verantwortlich sind. Besonders relevant sind hier neben einer hitzebedingten Verminderung des Molekulargewichts von Pektin ein doppelter Potentialwechsel der Oberflächenladung der Proteinpartikel oder die reduzierte Ausbildung einer schwachen Gelstruktur, welche bei einer erfolgreichen Stabilisation die Proteinpartikel über Wechselwirkungen mit niedermolekularen Kohlenhydraten in ein durchgehendes Netzwerk einbindet. Bei sehr hohen Temperaturen kommt es zu massiven Protein-Protein-Aggregationen, so dass keine erfolgreiche Stabilisierung mehr möglich ist. Dieser Umstrukturierung der Milchproteinpartikel durch steigende Temperaturbelastung kann bis zu einem gewissen Grad durch eine Vorerhitzung der Milchphase mit entsprechender Bildung von Casein-Molkenproteinkomplexen entgegengewirkt werden.

Die Arbeit zeigt damit anhand von zwei unterschiedlichen, für verschiedene Gruppen von Lebensmitteln typischen Beispielen, inwieweit die Textur von Milchsystemen mit Polysaccharidzusatz von der Prozessführung abhängt. Durch die Gegenüberstellung verschiedener Prozessvariationen und Mischungszusammensetzungen wird der Hintergrund für oft beobachtete Entmischungsvorgänge bzw. für die Modifikation verschiedener Mischungseigenschaften her-

ausgearbeitet. Dabei ergibt sich, dass die beobachteten Wechselwirkungseffekte zwischen Biopolymeren immer auf einem komplexen Zusammenspiel von mehreren Faktoren beruhen. Entsprechend ist die Rolle der einzelnen Prozessvariablen immer spezifisch für das jeweilige Biopolymermischsystem zu sehen. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge ist essentiell für die zuverlässige, vorhersagbare Gestaltung von Lebensmittelsystemen, an deren Strukturbildung sowohl Proteine wie auch Polysaccharide beteiligt sind. Damit erhält diese Arbeit eine breite Relevanz, denn derartige Lebensmittel sind weit verbreitet und diese Hintergrundkenntnisse essentiell für eine erfolgreiche Produktentwicklung und Anpassungen in der Produktion.

Summary

Polysaccharides are added to food and milk products for several reasons. Next to the tailoring of certain textural characteristics, the stabilisation of a complex food system during storage is one of the main functionalities of these macromolecular food ingredients. However, the length of the macromolecules as well as possible interactions between biopolymers limits the number of realizable formations of polysaccharide chains in the volume of mixed systems. This means that incompatibility phenomena are likely to occur quite frequently in the area of food technology. The main reasons for incompatibility or miscibility are the thermodynamic characteristics of the respective biopolymer mixtures. Given that the thermodynamic behaviour of simple solutions of each biopolymer is known, it has to be considered that process induced modifications of the macromolecules might alter their contribution to the thermodynamic characteristics of a mixed system in an unpredictable way. In practise, only a narrow range of different biopolymer ratios is known to give compatible (homogeneous miscible) mixed biopolymer systems. Process induced modifications of ingredients can cause that the mixed system leaves the narrow gap of compatibility in turn causing the mixture to separate in a macroscopic way. This unpredictable behaviour results in severe problems for industrial manufacturing, especially in the case of up scaling and adapting pilot plant trials to industrial scale production.

Therefore, the aim of this Ph.D. thesis is a systematic investigation of the influence of selected process conditions on the texture and stability of biopolymer mixtures to gain knowledge of the boundary layer between compatible and incompatible systems and to understand the reasons for this change in the thermodynamic behaviour of biopolymer mixtures.

The following two biopolymer mixtures were selected for investigation:

1.) A milk system (3.4 % protein) in the neutral range of pH with addition of carrageenan.
2.) An acidified milk system (1.2 % protein) with addition of pectin.

Both of these systems are common bases for industrial applications, like the production of chocolate milk (with carrageenan as the stabiliser) or fruit flavoured acidified milk drinks (with pectin as the stabiliser). One of the main differences between these two examples is the design of the polysaccharide chain and its functional ionic groups. This leads to a different degree of interaction with the milk proteins which represent the second biopolymer of the mixed system. Preparation of the different process mixtures was done in a pilot plant with a UHT heating section and a high pressure homogeniser. The influence of heating conditions (73-140 °C) and homogenisation pressure (20-80 MPa) was investigated as well as the impact of the sequence of the individual process steps during production of the samples (separate processing before the mixing of the biopolymers, e.g. preheating of milk proteins). Variation in the composition of the mixtures and the process conditions were chosen in such a way that the impact of certain ingredients or process conditions on the texture of the mixed system could be identified by comparison to a standard system. Process induced changes on the thermodynamic behaviour of the mixture were measured by application of rheological and particle size measurements. Analysis of the viscosity valu-

es at selected stress ramps and application of small deformation oscillatory rheology provided several independent rheological characteristics (e.g. stress stability, phase angle etc.) for a detailed description of the texture of the mixed systems. The rheological methods were selected and adapted to represent the response of the mixture to slight mechanical forces during storage. Determination of the particle size was used for a detailed analysis of the microstructure of the mixture and the identification of process induced modifications of the ingredients.

In a **milk based mixture with about 0.03 % carrageenan**, a weak network is found. Its characteristics (strength etc.) depend on the UHT treatment. The composite network consists of carrageenan helices bridged by protein clusters. A weak gel structure it is not a compact gel per se. It flows during short duration mechanical loads such as swallowing for example. However, during long duration events (e.g. storage) it shows characteristics of a gel such as a dominating elastic modulus for example. Sensorial properties like a rich mouth feel as well as the stability of the mixed system are improved by increased temperatures during the UHT process step (120-139 °C). In this temperature range, heat induced modifications of casein micelles, such as the release of calcium ions for example can take place. Calcium ions support biopolymer interactions of carrageenan strands, meaning that for milk based systems with the addition of carrageenan, the UHT heating conditions are a key factor for the build up of a continuous composite network structure. For solutions with a biopolymer content at the cusp of influencing the whole system, a UHT treatment at 120 °C leads to the forming of incomplete mixed network fragments. However, higher temperatures result in a rheologically detectable continuous network structure. The stability of this network has to be high enough to hold the stress load caused by additional biopolymer entities present in the mixture (e.g. cocoa particles) to prevent a visual decomposition of the system. However, networks with too high a stress stability are carrageenan dominated which leads to syneresis and visual sedimentation.

This dissertation shows that the textural properties of stable mixed systems alter in an unexpected way if the process conditions are shifted to higher UHT temperatures. One of the main reasons for this is that the building of protein clusters is dependent on the process conditions. Only protein clusters of a certain size have the capacity to bridge neighbouring carrageenan helices. This increase in the degree of interaction has a significant influence on the textural properties of biopolymer mixtures. In contrast to the effects of the heating step conditions, a higher load of shear forces during processing of the samples leads to a decreased stress stability of the composite network. The UHT heating induced protein clusters were treated with defined shear stress forces in an ultra high pressure homogeniser. It was shown that the structure building capacity of the biopolymers can be lost depending on the homogenisation temperature. The composite biopolymer structure is based on specific electrostatic interactions between sulphatic groups on the carrageenan strand and positive charged points on the surface of casein micelles. Separate pre-processing of the biopolymers can alter the interaction sites. Therefore, for an optimal functionality of biopolymers it is important to choose an optimal position for the mixing step in the process. A competition was found between sulphate groups of carrageenan groups and the denaturing whey proteins for the interaction sites of the surface of the casein micelles. If the surface of the casein micelles is already occupied by denatured whey protein complexes, the mixed system is no longer

able to integrate milk protein clusters in the carrageenan network.

The influence of heating and homogenisation conditions was also investigated for an **acidified milk protein system with the addition of pectin**. The carboxyl groups of pectin show less electro negativity compared to the sulphate groups of carrageenan. This means that for pectin systems, the build up of the biopolymer complex depends more on the shift of conditions of chemical equilibrium with the consequence that the ratio of reactive pairs becomes more important. A variation of homogenisation pressure shows that an optimal build up of the complex of pectin and milk proteins does not depend on the ratio of the absolute content of the two biopolymers, but on the ratio of pectin to the total surface area of the protein particles. This total protein surface area relies on the homogenisation step at the start of processing. The homogenisation pressure determines the particle size distribution and therefore the total surface area of the particles. Higher homogenisation pressures result in a higher content of small particles with the consequence of an increased protein surface area that has to be covered by pectin strands. If the pectin content is sufficient, according to basic physical principles, a high content of small protein particles has the advantage of a lower sedimentation velocity. The combination of an adequate pectin content and a particle size distribution of small protein particles leads to an increase of stability of the biopolymer mixture.

However, the advantage in stability of this interplay between process conditions and composition of the biopolymer mixture is lost if the chosen temperature in the following heating step is too high. The temperature range between 73 to 140 °C was investigated. It was shown that with the drop of pH with rising temperatures, several factors important for stabilisation are negatively influenced. The combination of these individual effects leads to a decomposition of the mixed system at high temperatures. This is especially the case with the decrease in molecular weight of the pectin due to hydrolysis at high temperatures and the twice changed electrical potential of the surface charge of the protein particles which has a great impact on the stabilisation mechanism. The stabilisation also depends on a weak gel structure between non adsorbed pectin loops and carbohydrates present in the serum. However, high temperatures impede the build up of this continuous network. The consequences are an aggregation of protein particles and a macroscopic phase separation of the system. A preheat treatment of the milk proteins can reduce these destabilising effects to a certain degree.

This Ph.D. thesis shows for two representative examples of milk-polysaccharide mixtures the influence of process conditions on the texture of the biopolymer system. The molecular and thermodynamic background of phase separation phenomena and unpredicted modifications of the mixing behaviour is identified by comparison of systematic variations of process parameters and compositions of the mixture to a standard system. It becomes clear that the changes in the mixed systems' characteristics are caused by the interplay of several individual physical and chemical factors. Therefore, the effect of process parameters is specific to each biopolymer system and its process history. Knowledge of the interplay of individual process steps is necessary for higher accuracy in predicting and developing food systems with a certain texture build up by multiple biopolymers such as proteins and polysaccharides. This report is therefore relevant for industry as well as for food science, as the examples under investigation are used widely in these areas.

Resumé

Ajouter des polysaccarides aux produits alimentaires et aussi à beaucoup d'autres produits lactaires est très commun pour obtenir une certaine qualité qui est sensitive au goût (consistance) et pour augmenter le contenu des fibres alimentaires et pour stabiliser le produit. Les possibilités d'arrangement des macromolécules dans le système sont pourtant limitées à cause de la longueur de la chaîne et à cause des interactions entre les biopolymères particuliers. Dans l'industrie alimentaire l'incompatibilité entre les biopolymères est un phénomène peu connu et assurément très commun. Cela n'est pas seulement la conséquence des causes thermodynamiques mais aussi une conséquence du procédé qui influe par rapport à l'incompatibilité d'une manière qui jusqu'à maintenant n'est pas prévisible. Ainsi les systèmes compatibles (miscibles homogenèses) se présentent souvent seulement dans une zone relativement restreinte pour des pourcentages différents de chaque mixture de biopolymère. Les changements importés par le procédé dans les substances particulières dans le système de la mixture peuvent causer un éloignement de la zone compatible dans le diagramme de phase et peuvent aussi causer des effets significatifs de séparation qui sont visible macroscopiquement. Pratiquement cela signifie souvent qu'un système de produits classifié stable, montre un comportement imprévu quand il est adapté aux plantes existantes.

L'objectif de cette thèse de doctorat est ainsi d'investiguer systématiquement les effets de certains paramètres sélectifs du procédé qui réfèrent à la consistance et la stabilité des mixtures de biopolymères pour qu'on puisse détecter le déplacement induit par le procédé dans la limite compatible ainsi que les causes sous-jacentes.

Comme exemples on a choisis deux systèmes typiquement différents:
1) un système lactaire neutre (3,4% de protéines) avec un additif de carragheen
2) un système lactaire acide (1,2% de protéines) avec pectine et un additif de sucre

Les deux systèmes sont très communs, ils se trouvent par exemple dans les boissons de cacao (système de carragheen) ou dans les boissons mixtes de jus et de yoghourt (système de pectine). Les systèmes se distinguent fondamentalement par le type et la structure de polysaccarides et par les possibilités qui résultent des interactions avec des protéines lactaires qui forment le deuxième composant de biopolymères. On a produit les mixtures étudiées ici dans une installation pilote UHT (Ultra Haute Température) avec un homogénéisateur de haute pression. On examinait l'influence des conditions d'échauffement (73-140° C) et de la pression d'homogénéisation (200-800 bar) ainsi que l'ordre des différents pas du procédé dans la production (moment du début du mixage, pré-échauffement des protéines lactaires). On a varié la composition des mixtures de manière à ce que, en les comparants avec les mixtures standards, on pouvait analyser les effets des substances particulières dans des conditions différentes du procédé de la consistance du système de mixture. Les changements introduits thermodynamiquement ainsi que les changements techniques du procédé en-soi sont relevées par mesures rhéologiques et mesures volumétriques des particules. Pour pouvoir comprendre les propriétés essentielles de la consistance, on analysait la courbe de vis-

cosité par une procédure de tension de poussée adaptée et on faisait en parallèle des mesures oscillantes non-destructives. Comme cela, on a obtenu des chiffres indicateurs rhéologiques importants et indépendants comme par exemple l'angle de la phase delta ou la limite de la charge de tension d'une structure. En plus, les procédés de mesure ont été coordonnés d'une manière qui reflète le comportement de la mixture d'après la soumission mécanique au gradient de cisaillement pourtant que la mixture stockée est au repos. Les mesures volumétriques des particules servent à pouvoir décrire la microstructure et pour identifier les changements de substances particulières introduits dans les procédés.

Dans le système "**Protéine Lacteo - Carragheen**", avec 0,03% de Carragheen, résulte une structure d'une maille de faible cohésion, dépendante des conditions UHT. La structure de la mixture de fibres de carragheen et de clusters de protéines n'est pas un gel imperméable mais délicat par sa faible cohésion. Si on contraint ce système pendant une courte durée comme par exemple au couler ou au moment d'avaler, ce système se comporte donc dans les conditions de fluide. Autrement il offre les qualités réelles de la texture d'un gel comme par exemple une partie élastique d'une structure en repos.

L'impression gustative de beaucoup de corps, la stabilité ou la conservabilité physique de cette structure de gel de faible cohésion s'intensifie quand on augmente les températures dans la zone UHT (120-139 °C). Seulement dans cette zone de températures résultent des changements dans les micelles de caséine, comme par exemple la libération des ions de calcium, qui favorisent les interactions avec les molécules de Carragheen. Pour les systèmes lactaires avec un additif de Carragheen cela signifie que seulement le choix des conditions de l'échauffement UHT peut décider si le système s'organise en une structure de gel ininterrompu et délicat, ou si seulement le système se forme en structures incohérentes. Pour loger une stabilisation effective de plus de colloïdes déjà existants dans la mixture, comme par exemple des particules de cacao, la structure de gel, assurément, doit être suffisamment forte pour empêcher une sédimentation des particules. D'autre part, la structure de gel formée ne doit pas être trop forte parce qu'en ce cas le Carragheen dominerait la structure de la mixture et causerait des phénomènes de synérèse avec une sédimentation pareille au pudding.

Dans ce travail on montre que, dans des conditionnes normales, les systèmes stables se déplaceront vers une zone de qualité de consistance non désirée quand on augmente la température UHT. La cause principale est que, dépendant du procédé choisi, se forment des microclusters de protéine qui créent des liens entre les hélix de Carragheen avoisinants qui ainsi influent fortement sur les propriétés rhéologiques et sur la consistance du système de mixture. Un antagoniste de l'effet d'échauffement UHT qui intensifie l'interaction des biopolymères est dans le procédé de production qui soumet le système contraintes par les forces de cisaillement. Les clusters de protéine formés dans le traitement UHT ont étés soumises aux contraintes de cisaillement définies par un homogénéisateur de haute pression (0-800 bar). Il a résulté que, dépendant de la température d'homogénéisation, la fonctionnalité des substances contenues pouvait disparaître dans les niveaux de haute pression. Pour obtenir un produit de mixture homogène, les contraintes de cisaillement sont un pas indispensable dans le procédé, mais il faut fixer son intensité avec beaucoup de précaution.

Comme la base de la structure de biopolymères composée est formée par l'interaction électrostatique spécifique entre les groupes de sulfate dans la fibre de Carragheen et la surface des micelles de caséine, le moment de mixer et les conditions de pré-échauffement ont une importance décisive. A cause de la proximité des centres présents et réactifs dans la surface des micelles, une situation de compétition se présente entre la formation d'une interaction électrostatique avec le polysaccharide et l'union des lignes covalentes quand les complexes de protéines de lactosérum dénaturalisés se groupent avec la caséine. Quand on ajoute Carragheen, si la surface de micelles de caséine est déjà occupée par les liens covalents de protéines de lactosérum, on ne réalisera assurément plus aucune intégration d'agrégats de protéines lactaires dans la structure de la maille qui détermine la consistance.

On a aussi investigué l'influence des conditions de l'échauffement et de l'homogénéisation dans le système "**Protéine Lactose - Pectine**". Les groupes de carboxyle de la pectine n'ont pas une négativité électrique aussi forte comparée aux groupes de sulfate du Carragheen. Comme dans ce système la formation du complexe de biopolymères se fonde en une réaction d'équilibre, la proportion des parts dans la réaction a une importance vitale.

La variation de la pression d'homogénéisation résulte du fait que dans ce cas la relation de quantité absolue entre la pectine et la protéine n'est pas tellement importante sinon plutôt la taille de la surface totale de protéine qui doit être stabilisante pour le polysaccharide. Cette surface totale dépend de la distribution de la taille des particules, comme la relation surface-volume des particules à stabiliser augmente drastiquement quand le diamètre des particules diminue. La distribution de la taille des particules détermine surtout les conditions de cisaillement au premier pas du procédé qui est l'homogénéisation. D'après les principes fondamentaux de la physique, la séparation de la mixture diminue quand le pourcentage de particules fines augmente, une homogénéisation haute pression (500-800 bar) aurait ses avantages. Mais seulement dans la condition si la quantité de pectine est adaptée et est capable de couvrir la surface récemment formée, il est possible d'amélioré en combinaison avec ces conditions de procédé la stabilisation de la mixture de biopolymères.

Ce jeu entre les conditions des premiers pas du procédé et la composition du système, assurément, se maintient uniquement si on ajuste d'une manière adéquate les conditions de l'échauffement dans le pas consécutif; cela veut dire qu'on ne doit pas choisir de températures trop hautes. On a examiné la bande de 73 à 140 °C. À cause du déplacement de la valeur de pH (dépendant de la température), on a observés que les différents facteurs pouvaient s'influencer dans le sens négatif, et particulièrement ceux qui en totalité sont les responsables pour stabiliser avec succès la suspension des particules de protéine. Une importance spéciale est ici surtout la réduction des poids moléculaires de pectine causée par la chaleur, en plus d'un double changement du potentiel de la charge électrique de la surface des particules des protéines ou bien la formation d'une structure de gel de faible cohésion ce qui après d'une stabilisation efficace, par des interactions avec les hydrates de carbone avec les molécules réduites, lie les particules de protéine dans une maille ininterrompue, bien que avec les températures très hautes des agrégats massifs de Protéine-Protéine appariés

rendent impossible toute stabilisation efficace. Jusqu'à un certain point on peut résister à ce changement de structure des particules de protéine lactose causé par l'augmentation de la température par un pré-échauffement pendant la phase lactose pendant laquelle se forment des protéines complexes de caséine-lactosérum.

Ce thèse de doctorat montre ainsi à base de deux exemples différents mais typiques pour des groupes différents d'aliments que l'on peut voir jusqu'à quel point la consistance des systèmes lactaires avec un additif de polysaccharide dépend du contrôle du procédé. Par la confrontation de différentes variations du procédé et les compositions de la mixture on montre les causes importantes du procédé de séparation souvent observé, ou bien les causes de la modification de propriétés différentes de la mixture. De cela résultent toujours des effets d'interaction observés entre les biopolymères toujours enraciné dans le jeu de l'ensemble complexe de facteurs différents. En conséquence, il faut toujours considérer le rôle des différentes variables du procédé spécialement pour le système exclusif de la mixture des biopolymères. Il faut connaître surtout ces relations pour pouvoir structurer d'une manière fiable et prédictible les systèmes alimentaires, qui ont la structure formée par les protéines et les polysaccharides. Avec cela ce travail couvre une importance étendue car ces aliments se trouvent largement répandus et ces connaissances importantes sont fondamentales pour le développement du succès des produits et de l'adaptation adéquate de leur production.

Resumen

Añadir polisacaridos a los productos alimentícios y también a muchos productos lácteos es muy común para lograr cierta calidad sensitiva al gusto (consistencia/textura) y para aumentar el contenido de fibras y estabilizar el producto. Sin embargo, las posibilidades de ordenación de las macromoléculas dentro del sistema están limitadas por razón de la longitud de la cadena y de las posibles interacciones entre los biopolímeros particulares. En la industria de alimentos, la incompatibilidad entre biopolímeros es un fenómeno poco conocido y sin embargo muy común. Esto no es sólo consecuencia de las causas termodinámicas, sino también de las condiciones del proceso que influyen la incompatibilidad de un modo hasta ahora casi no pronosticable. Por lo tanto, sistemas compatibles (mezclables homogéneamente) muchas veces sólo se presentan dentro de un margen relativamente limitado en los diferentes porcentajes de cada biopolímero en la mezcla. Los cambios inducidos por el proceso en las substancias particulares del sistema de la mezcla pueden causar un alejamiento del área compatible en el diagrama de fase y también causar efectos significativos al desmezclar, macroscópicamente visibles. En la práctica, a menudo eso significa que un sistema de producto clasificado estable, muestra un comportamiento imprevisto al adaptarlo a las plantas existentes.

El objeto de esta tesis doctoral, por lo tanto, es investigar sistemáticamente efectos de ciertos parámetros de proceso selectivos, referentes a la consistencia y estabilidad de mezclas de biopolímeros para que se pueda incluir el corrimiento inducido en el proceso en la línea de frontera compatible y sus causas.

Como ejemplos se ha escogido dos sistemas típicamente diferentes:

1) un sistema lácteo neutral (un 3,4% de proteinas) con un aditivo de Carrageenan.
2) un sistema lácteo acidificado (un 1,2% de proteinas) con pectina y un aditivo de azúcar.

Ambos sistemas son muy comunes, se encuentran p.e. en bebidas de cacao (sistema de Carrageenan) o en bebidas mezcladas de jugos y yogur (sistema de pectina). Estos sistemas se distinguen fundamentalmente por el tipo y la estructura del polisacarido y de las posibilidades resultantes de interacciones con proteinas lácteas, las que forman la segunda componente de biopolímeros. Las mezclas aquí preparadas se produjeron en una planta piloto UHT con un homogenizador de alta presión. Se examinaba la influencia de las condiciones de calentamiento (73 - 140 °C) y de la presión de homogenización (200 - 800 bar) así como el orden de los diferentes pasos del proceso en la producción (momento de mezclar, precalentamiento de las proteinas lácteas). Se varió la composición de las mezclas de modo que, comparándolas con las respectivas mezclas standard, se podía realzar los efectos de las substancias particulares bajo diferentes condiciones de proceso de la consistencia del sistema de mezcla. Los cambios inducidos termodinámicamente así como los cambios técnicos del proceso en sí se registraban metrológicamente mediante mediciones rheológicas y mediciones volumétricas de las partículas. Para poder comprender las propiedades relevantes de consistencia se analizaba la curva de viscosidad mediante un procedimiento de tensión de empuje adaptado, y se hacían paralelamente mediciones oscilantes no destructivas. Así

se consiguieron importantes cifras indicadoras rheológicas e independientes, como p.e. el ángulo de fase delta o el límite de carga de tensión de una estructura. Además, los procedimientos de medición se coordinaban de manera que se reflejaba el comportamiento de la mezcla después de someterla mecánicamente con un gradiente de cizallamiento reducido al encontrarse en reposo. Las mediciones volumétricas de las partículas servían para poder describir la microestructura y para identificar cambios de substancias particulares inducidas en el proceso.

En el sistema **proteina láctea-carrageenan**, con un 0,03% de Carrageenan, resulta una estructura de malla delicada, dependiente de las condiciones UHT. La estructura de una mezcla de filamentos de Carrageenan y de clústeres de proteinas no es un gel imperforable sino delicado. Si se esfuerza este sistema brevemente, como p.e. al derramarlo, o en el momento de tragar, entonces está en condiciones de fluír. Por el contrario ofrece las calidades de textura de un gel auténtico, como p.e. una parte elástica de una estructura en reposo.

La impresión sensorial de mucho cuerpo y, por lo tanto, también la estabilidad o sea la conservabilidad física de esta estructura de gel delicada se intensifica al subir las temperaturas en la zona UHT (120 - 139 °C). Solamente en esta zona de temperaturas resultan cambios en las micelas de caseina, como p.e. la liberación de iones de calcio, los que favorecen las interacciones con moléculas de Carrageenan. Para los sistemas lácteos con un aditivo de Carrageenan eso significa que únicamente la elección de las condiciones de calentamiento UHT puede decidir si el sistema se organiza en una estructura de gel ininterrumpida y delicada, o si solamente se forman estructuras incoherentes. Para lograr una estabilización efectiva de más coloídes ya existentes en la mezcla, como p.e. de partículas de cacao, la estructura del gel, sin embargo, tiene que ser suficientemente fuerte para impedir una sedimentación de las partículas. Por otra parte, la estructura de gel no debe haberse formado demasiado fuerte porque entonces el Carrageenan dominaría la estructura de mezcla causando fenómenos de sineresis, con sedimentación parecida al flan.

En este trabajo se muestra que, bajo condiciones normales, los sistemas estables se desplazarían a una zona de calidades de consistencia no deseada al subir la temperatura UHT. La causa principal es que, dependiendo del proceso elegido, se forman microclústeres de proteina que crean enlaces entre hélices de Carrageenan vecinas influyendo fuertemente así las propiedades rheologicas y la consistencia del sistema de mezcla. Un antagonista del efecto de las condiciones de calentamiento UHT que intensifica la interacción de biopolímeros es en el proceso de producción el sometimiento a carga por fuerzas de cizallamiento. Los clústeres de proteina formados en el tratamiento UHT fueron sometidos a cargas de cizallamiento definidas mediante un homogenizador de alta presión (0 - 800 bar). Resultó que, dependiendo de la temperatura de homogenización, la funcionalidad de las sustancias contenidas podía perderse en los niveles de alta presión. Para obtener un producto de mezcla homogéneo, en procedimientos prácticos ciertamente las cargas de cizallamiento constituyen un paso indispensable en el proceso, sin embargo hay que fijar con mucho cuidado su intensidad.

Como la base de la estructura de biopolímeros compuesta está formada por la interaccíon electrostática específica entre los grupos de sulfato en el filamento de Carrageenan y la superficie de las micelas de caseina, el momento de mezclar y las condiciones de precalentamiento tienen una importancia decisiva. Debido a la proximidad de los correspondientes centros reactivos en la

superficie de las micelas se presenta una situación de competencia entre la formación de una interacción electrostática con el polisacarido y la unión de enlaces covalentes al agruparse complejos de proteinas de suero desnaturalizadas con la caseina. Si, al añadir Carrageenan, la superficie de micelas de caseina ya está ocupada por los enlaces covalentes de proteinas de suero, no se realizará ya más ninguna integración de agregados de proteina lactosos en la estructura de malla que determina la consistencia.

Tambíen se investigó en el **sistema proteina lactosa-pectina** acidificada la influencia de las condiciones de calentamiento y de homogenización. Los grupos de carboxilio de la pectina no tienen una electronegatividad tan fuerte como los grupos de sulfato del Carrageenan. Como en este sistema la formación del complejo de biopolímeros se basa en una reacción de equilibrio, la relación de las partes en la reacción tiene una importancia vital.

Sin embargo, una variación de la presión de homogenización destaca el hecho que en este caso no es tan importante la relación de cantidad absoluta entre pectina y proteina, sino, mas bien, lo decide el tamaño de la superficie total de proteina, la que debe ser estabilizada por el polisacarido. Esta superficie total depende de la distribución del tamaño de las partículas, pues la relación superficie-volumen de partículas a estabilizar sube drásticamente al disminuir el diámetro de las partículas. La distribución del tamaño de las partículas ante todo la determinan las condiciones de cizallamiento en el primer paso del proceso que es la homogenización. Debido a que, según relaciones físicas fundamentales, al aumentar el porcentaje de partículas finas se disminuye la desmezclación, una homogenización de alta presión (500 - 800 bar) tendría sus ventajas. Esto sólo bajo la condición de que la cantidad de la pectina esté debidamente adaptada, siendo capaz de cubrir la superficie recién formada y mejorando así, en combinación con estas condiciones de proceso, claramente la estabilización de la mezcla de biopolímeros.

Este juego en conjunto entre las condiciones del proceso en su primer paso y la composición del sistema, sin embargo, se mantiene únicamente si se ajusta de un modo adecuado las condiciones de calentamiento en el paso siguiente; es decir, no se deben elegir temperaturas demasiado altas. Se examinó el rango de 73 a 140 °C resultando que debido al desplazamiento del valor de pH (dependiente de la temperatura) varios factores podrían influenciarse en sentido negativo, y exactamente aquellos que en suma total son los responsables para estabilizar con éxito la suspensión de las partículas de proteina. Especial relevancia tiene aquí en primer lugar la reducción del peso molecular de pectina causado por el calor, además de un doble cambio del potencial de la carga electrica de la superficie de las partículas de proteina, o bien la formación reducida de una estructura de gel delicada, la que, despúes de una estabilización eficaz, mediante interacciones con hidratos de carbono con moléculas reducidas, enlace las partículas de proteina en una malla ininterrumpida, ya que con temperaturas muy altas aparecen agregados masivos de proteina-proteina imposibilitando ya cualquiera estabilización eficaz. Hasta cierto punto se puede contrarestar este cambio de estructura de las partículas de proteina lactosa causado por la elevación de temperatura mediante un precalentamiento durante la fase lactosa ya que en esta se forman complejos de proteina de caseina-suero.

Este trabajo muestra por lo tanto como a base de dos ejemplos diferentes pero típicos para diversos grupos de alimentos se puede ver hasta qué punto la consistencia de sistemas lácteos con un

aditivo de polisacarido depende del control del proceso. Mediante confrontación de diversas variaciones del proceso y composiciones de la mezcla se destacan las causas de fondo del proceso de desmezclación frecuentemente observado, o sea las causas de la modificación de varias propiedades de la mezcla. De ello resulta que siempre los efectos de interacción observados entre biopolímeros radican en un juego en conjunto complejo de varios factores.

En consecuencia, el papel de las distintas variables de proceso siempre hay que considerarlo específicamente para el respectivo sistema de mezcla de biopolímeros. Hay que conocer esencialmente estas relaciones para poder estructurar de un modo confiable y pronosticable los sistemas alimentícios, cuya estructura la forman tanto proteinas como polisacaridos. Con ello recibe este trabajo una amplia relevancia puesto que tales alimentos se encuentran ampliamente difundidos y estos conocimientos de fondo son esenciales para un exitoso desarrollo del producto y un ajuste adecuado en la producción.

1. Einleitung

Eine der Grundlagen für die Vorratshaltung von Lebensmitteln ist neben der Kontrolle des mikrobiologischen Verderbs die Verhinderung von physikalisch bedingten Entmischungserscheinungen. Sichtbare Phasentrennung führt ebenso wie spürbare Veränderungen der Textureigenschaften zum Verwerfen des Lebensmittels. Die Textur von Nahrungsmitteln beruht auf der Funktionalität und dem Zusammenspiel einzelner Inhaltsstoffe. In diesem Zusammenhang sind besonders Proteine zu erwähnen, da diese Stoffklasse allgemein eine hohe Strukturbildungskapazität aufweist. Diese Eigenschaft nimmt jedoch aufgrund thermodynamisch bedingter Umlagerungen mit zunehmender Lagerdauer ab. Oft kommt es wegen unzureichender Strukturbildungskapazität bzw. zu geringer Proteinkonzentration zu Situationen, in denen die Proteinkomponente durch andere Biopolymere, wie beispielsweise Polysaccharide, in ihrer Funktionalität ergänzt werden muss. Polysaccharide übernehmen dabei die Rolle eines Stabilisators im physikalischen Sinn, d.h. sie verstärken die Serumbildung und sollen Entmischungsereignisse verhindern.

Polysaccharidmakromoleküle erhöhen aufgrund ihrer viskositätssteigernden Eigenschaften oder ihrer Fähigkeit, schwache, aber stabilisierende Netzwerkstrukturen auszubilden, die Strukturbildungskapazität eines Mischsystems. Da die Textureigenschaften auch einen Faktor für den qualitativen Wert der Lebensmittel darstellen, liegt der Zweck der Zugabe dieser Biopolymere oft nicht allein in einer Langzeitstabilisierung, sondern auch in der Feinabstimmung gewünschter sensorischer Eigenschaften.

Die Auswahl der Polysaccharide, die zur Stabilisierung in Lebensmittelsysteme eingebracht werden, beruht oft zum großen Teil auf empirischen Erfahrungen, da systematische wissenschaftliche Untersuchungen bisher nur für einige vereinfachte Modellsysteme vorliegen. Zwar sind die dort gewonnenen Daten grundsätzlich sehr wertvoll für das Verständnis grundlegender Wechselwirkungen zwischen einzelnen Biopolymeren, weil durch den definierten Aufbau der Modellsysteme Synergismen und spezifische Wechselwirkungen eindeutig der Funktionalität einzelner Inhaltsstoffe zugeordnet werden können. Allerdings sind die daraus gewonnenen Erkenntnisse bei weitem noch nicht ausreichend, um oft beobachtete Inkompatibilitätsphänomene zwischen unterschiedlichen Biopolymeren, wie beispielsweise Proteinen und Biopolymeren, zu verstehen und daraus abgeleitete praktische Problemstellungen zu lösen.

Bereits bei einfach aufgebauten Modellsystemen zeigt sich, dass neben den im System enthaltenen Makromolekülen auch minore Komponenten, wie beispielsweise die Ionenzusammensetzung im Lösungsmittel, das thermodynamische Verhalten einer ternären Mischung stark beeinflussen können. Das bedeutet, dass die Ergebnisse aus wissenschaftlichen Untersuchungen an Modellsystemen grundsätzlich schon zum Verständnis der Auswirkungen von Polysaccharidzugaben auf die Textureigenschaften von Lebensmitteln beitragen. Da aber mit der Anzahl der Inhaltsstoffe die Anzahl sekundärer Wechselwirkungen exponentiell ansteigt, bleibt immer ein Unsicherheitsfaktor bei der Übertragung auf komplexe Mischsysteme bestehen. Dazu kommt, dass die Datenbasis durch die Untersuchungen an Modellsystemen meistens im Labormaßstab erstellt wird. Dadurch ist die Auswahl an realisierbaren Prozessparametern oft eingeschränkt und wird zur einfacheren Vergleichbarkeit meistens auf nur einen Herstellungsablauf beschränkt. Es ist aber

bekannt, dass verschiedene Prozessbedingungen Reaktionen an funktionellen Gruppen der Biopolymere hervorrufen können und somit zu einer Modifikation verschiedener Eigenschaften der Makromoleküle führen (KIRCHMEIER, 1987). Auch können Herstellungsvarianten, bei denen hohe Scherkräfte auftreten, das Molekulargewicht von Polymeren vermindern. Dies hat Auswirkungen auf die mögliche Raumverteilung der Molekülketten und damit auf das thermodynamische Verhalten im System. Somit wird bei Modellversuchen oft nicht das gesamte Zusammenspiel aller Wechselwirkungen erfasst, was in ungünstigen Fällen Fehler im Mischungsverhalten verursachen kann. Da die meisten Wechselwirkungen und Prozesseinflüsse nicht-linear zusammenhängen, können oft schon relativ geringe Änderungen bestehender Rezepturen oder Prozessbedingungen zu unvorhersehbaren Produktionsausfällen führen.

Es besteht daher der unabweisbare Bedarf nach weiterführenden wissenschaftlichen Untersuchungen, um die Lücken zu schließen, die sich in der Übertragbarkeit von Labormaßstabsversuchen auf in der Praxis angewandte Herstellungsmethoden ergeben. Konkret zu nennen sind hier Versuche unter definierter Variation der Prozessbedingungen im Pilotmaßstab. Damit können mögliche Einflüsse der Herstellungsbedingungen auf die thermodynamischen Eigenschaften des Mischsystems systematisch erfasst werden. Durch eine Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit den aktuellen Modellvorstellungen in der entsprechenden Fachliteratur kann zudem der Hintergrund der Auswirkungen verschiedener Prozessparameter auf die Kompatibilität der jeweiligen Biopolymermischungen abgeschätzt werden. Die Untersuchungen im Pilotanlagenmaßstab ergeben damit weitere Bausteine für eine präzisere Vorhersage des thermodynamischen Verhaltens dieser Mischsysteme bei der Anpassung von Rezepturen an die Produktion.

Vor dem Hintergrund dieses Problemfeldes der Prozesseinflüsse auf die Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren sollen zunächst die Grundlagen und der Stand des Wissens erläutert werden, um daraus dann die Arbeitshypothese und den Lösungsansatz aufzuzeigen.

Daran schliessen die experimentellen Untersuchungen und die Diskussion der dabei erzielten Ergebnisse an. Den einzelnen Abschnitten folgt eine kurze Zusammenfassung der jeweils ermittelten Ergebnissen; diese werden am Ende der Unterkapitel im Zusammenhang detailliert diskutiert. Den Abschluss der Untersuchungen an den Beispielssystemen bildet jeweils ein eigenes Unterkapitel (5.1.7 bzw. 5.2.7), in dem die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen unter Verweis auf die Experiment- bzw. Kapitelnummer zusammengefasst sind. Dadurch ist es dem Nutzer dieser Arbeit möglich, auch direkt auf einzelne, spezifische Fragestellungen und Ergebnisteile zuzugreifen.

2. Grundlagen und Stand des Wissens

2.1 Chemisch-physikalische Grundlagen

2.1.1 Thermodynamik

Der bereits erwähnte Einfluss von Prozessbedingungen auf Strukturbildungsfunktionalität, Mischbarkeit und Inkompatibilitätserscheinungen von Biopolymerlösungen macht deutlich, dass für die Beschreibung der Ursachen von Entmischungsphänomenen eine Betrachtung von einzelnen Eigenschaften der beteiligten Makromoleküle, wie chemischer Aufbau, Molekulargewicht etc., nicht ausreicht. Diese Angaben beziehen sich allein auf einen einzigen definierten Zustand bei Normalbedingungen. Die Beachtung von Prozesseinflüssen erfordert eine differenziertere Betrachtungsweise bei verschiedenen physikalischen Bedingungen. Zur Beschreibung der dabei auftretenden makroskopischen Eigenschaften des Mischsystems wie auch der dabei beteiligten chemischen und physikalischen Gleichgewichte steht mit der Thermodynamik ein fundierter theoretischer Ansatz zur Verfügung (Czeslik et al., 2001). Im Folgenden sollen daher die wichtigsten thermodynamischen Grundlagen zur Beschreibung, Erfassung und Vorhersage von Energieänderungen und damit verknüpften Gleichgewichtsänderungen bei Phasenumwandlungen vorgestellt werden.

Der erste Hauptsatz der Thermodynamik sagt aus, dass die innere Energie U in einem abgeschlossenen System konstant bleiben muss. Die innere Energie kann also nur umverteilt werden. Bei dieser Umverteilung beobachtet man freiwillig ablaufende Prozesse, also ohne dass Arbeit aufgewendet werden muss. Zur Erklärung dieses Phänomens muss die Richtung der Verteilung der Energie betrachtet werden.

In naturwissenschaftlichen Beobachtungen zeigt sich immer wieder, dass freiwillige Prozesse oder Zustandsänderungen stets so verlaufen, dass bei der Umverteilung von Energie eine größere „Unordnung“ entsteht. Der Begriff „Unordnung“ soll hier zunächst allgemein verstanden und für den molekularen Bereich erst dann betrachtet werden, nachdem die Begriffe der Entropie S und Enthalpie H erläutert sind.

Die Freiwilligkeit von Vorgängen hat in der Thermodynamik eine grundsätzliche Bedeutung, sie führt zu einer Zustandsfunktion, die nur vom aktuellen Zustand des Systems abhängt, der Entropie S. Die mathematische Formulierung der freiwilligen Zustandsänderung enthält der zweite Hauptsatz der Thermodynamik (Δ bezeichnet eine Änderung der entsprechenden Größe; S die Entropie):

$$\Delta S_{gesamt} > 0 \qquad \text{(Gl. 2.1)}$$

Bei freiwilligen Zustandsänderungen nimmt die Entropie zu. Dies bedeutet, dass irreversible Prozesse Entropie produzieren. Reversible Prozesse produzieren dagegen keine Entropie, in die-

sem Fall kann sie nur von einer Stelle des abgeschlossenen Systems zu einer anderen verschoben werden. Das heißt, das zur Verfügung stehende Volumen besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Entropie.

Da bei thermodynamischen Prozessen, also physikalischen oder chemischen Umwandlungen, Entropieänderungen ΔS auftreten, ist für die Entropie eine thermodynamische Definition mittels folgender Überlegung zu wählen:

Während eines thermodynamischen Prozesses kann das Ausmaß der zufälligen Energieumverteilung aus den dabei ausgetauschten Wärmemengen abgeleitet werden. Es kann als bekannt vorausgesetzt werden, dass die Übertragung von Wärme immer mit thermischer Bewegung von Teilchen (Molekülen) verbunden ist. Im Gegensatz dazu ist die Übertragung von Energie in Form von Arbeit gegeben durch „Kraft mal Weg" als geordnete Bewegung der Teilchen. Sie ändert daher den Ordnungszustand nicht und damit auch nicht die vorhandene Entropie.

Bei Weiterführung dieser Gedanken erkennt man, dass bei der Energieumverteilung die Größe der Wärmemenge q für die Intensität der Energieumverteilung wie auch für die thermische Anregung der Bewegung der Teilchen bzw. Moleküle steht. Dies wird in differenzieller Form ausgedrückt durch:

$$dS \sim dq \qquad \text{(Gl. 2.2)}$$

Dabei steht S für die Entropie und q für die Wärmemenge. Um diese proportionale Relation mit einem Proportionalitätsfaktor zu versehen, muss folgende Überlegung angewendet werden: Bei hohen absoluten Temperaturen T sind Teilchen in einem Körper wenig geordnet, die Brown'sche Molekularbewegung besitzt eine große Amplitude. Die Zufuhr einer bestimmten Wärmemenge wird bei solchen Temperaturen diese Unordnung nur geringfügig vergrößern, d.h. die Entropie erhöht sich kaum. Führt man dagegen einem Körper mit niedriger Temperatur diese Wärmemenge zu, werden seine Teilchen aus einem Zustand geringerer Unordnung signifikant durcheinandergebracht. Die Entropie erhöht sich in diesem System also stärker. Formal wird dies wie folgt ausgedrückt:

$$dS = \frac{dq}{T} \qquad \text{(Gl. 2.3)}$$

Damit erscheint der Kehrwert der Temperatur als Proportionalitätsfaktor. Zur Beurteilung experimenteller Ergebnisse ist die Betrachtung der Entropieveränderungen an Phasenübergängen ebenso von Bedeutung. Ein System am Phasenübergang wird hier an dem Punkt untersucht, bei dem sich beide Phasen bei Normaldruck und einer Temperatur T_{trans} im Phasengleichgewicht befinden. Der Wärmeaustausch q verläuft in diesem Fall zwischen beiden Phasen reversibel. Bei konstantem Druck gilt mit der Enthalpie H_{trans} am Punkt des Phasengleichgewichts:

$$q = \Delta H_{trans} \qquad \text{(Gl. 2.4)}$$

Auf die physikalische Definition der Enthalpie H wird noch nachfolgend in Gleichung 2.6 eingegangen. Die Wärmemenge q entspricht damit der Enthalpieänderung ΔH_{trans} am Punkt des Phasengleichgewichts. Die Entropieänderung, in Differenzenform ΔS geschrieben, ist dann gemäß Gleichung 2.3 bei der Temperatur beim Phasengleichgewicht T_{trans}:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{trans}}{T_{trans}} \qquad \text{(Gl. 2.5)}$$

Bei Phasenübergängen kann ΔH_{trans} positive (endotherm, wie z.B. beim Schmelzen) oder negative Werte (exotherm, wie beispielsweise beim Kondensieren) annehmen. Anders ausgedrückt ändert sich das Vorzeichen von ΔS je nachdem, ob der Zustand nach dem Phasenübergang weniger oder mehr geordnet ist.

Nach dieser Zusammenstellung und Erläuterung der theoretischen Grundlagen zur Zustandsfunktion Entropie soll im nächsten Abschnitt die für chemische Prozesse sehr bedeutsame freie Enthalpie schrittweise betrachtet werden, da sie in ähnlicher Weise für das Verständnis verschiedener Zustandsformen von Biopolymeren und ihr Mischungsvermögen relevant ist.

Viele wichtige chemische Prozesse in Systemen laufen bei konstant bleibendem Druck p, aber mit Änderung des Volumens V ab. Das heißt, wenn einem solchen System Energie in Form von Wärme zugeführt wird, ändert dies nur einen Teil der inneren Energie U, während der andere Teil zur Volumenänderung dient. Dieser letztgenannte Anteil wird in Form von Arbeit mit der Umgebung ausgetauscht. Dies führt zur Beschreibung der Enthalpie H gemäß folgender Gleichung:

$$H = U + p \cdot V \qquad \text{(Gl. 2.6)}$$

Da die Größen innere Energie U, Druck p und Volumen V nur vom aktuellen Zustand des Systems abhängen, stellt H eine Zustandsfunktion dar. Um chemische Prozesse, wie z.B. die Voraussetzungen für spontane Komplexbildung zweier Biopolymere in einer Mischung, zu beurteilen, muß dazu die entscheidende Größe, nämlich die freie Enthalpie G (Gibbsche freie Enthalpie) betrachtet werden. Sie wird aus den in der Thermodynamik bekannten Ungleichungen abgeleitet.

Zunächst ist festzuhalten, dass bei Änderungen im System ohne Volumenänderungen, also bei Vorgängen ohne Leistung von Volumen- oder anderer Arbeit, die Änderung der inneren Energie dU dem Produkt von Entropieänderung dS und Temperatur T, bei der dieser Vorgang stattfindet, entspricht oder kleiner als dieses Produkt ist:

$$T \cdot dS \geq dU \qquad \text{(Gl. 2.7)}$$

Wie gesagt, das Volumen bleibt in diesem Fall konstant, es wird also keine Volumen- oder andere

Arbeit verrichtet. Um die Bedeutung von Verschiebungen der Entropie (dS) bzw. der inneren Energie (dU) zu verdeutlichen, sollen folgende zwei Fälle, in denen die innere Energie U (dU = 0) oder die Entropie S (dS = 0) konstant sind, näher betrachtet werden. Mathematisch werden diese beiden Fälle wie folgt ausgedrückt:

$$dS_{U,V} \geq 0 \qquad \text{(Gl. 2.8)}$$

$$dU_{S,V} \leq 0 \qquad \text{(Gl. 2.9)}$$

Die erste, unter Gl. 2.8 genannte Relation ist wie folgt zu interpretieren: Bei einem System, in dem das Volumen V und die innere Energie U konstant bleiben, nimmt bei einer freiwilligen Zustandsänderung die Entropie S zu. Man spricht hier von entropiegetriebenen Vorgängen. Dieser Zusammenhang entspricht dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik.

Die zweite, unter Gl. 2.9 genannte Relation sagt aus, dass bei einem System, in dem das Volumen V und die Entropie S konstant bleiben, bei einem freiwilligen Prozess die innere Energie U abnimmt.

In Fällen, bei denen die Entropie des Systems konstant bleibt, erfordern die thermodynamischen Gesetzmässigkeiten, dass die Entropie der Umgebung zunimmt (SCHRÖDINGER, 1948; PRATCHETT ET AL., 2006). Diese Zunahme kann jedoch nur erfolgen, wenn durch Entzug von Wärme die Energie des Systems abnimmt. Bei gleichbleibendem Druck wird dieser Wärmeaustausch nur als Volumenarbeit verrichtet, so dass folgender Zusammenhang gilt bzw. auch unter Bezug auf Gl. 2.4 gefolgert werden kann:

$$dq_p = dH \qquad \text{(Gl. 2.10)}$$

Daraus folgt bei konstantem Druck, wenn also nur Volumenarbeit verrichtet wird:

$$T \cdot dS \geq dH \qquad \text{(Gl. 2.11)}$$

Bei konstanter Enthalpie H bzw. konstanter Entropie S wird aus Gl. 2.11:

$$dS_{H,p} \geq 0 \qquad \text{(Gl. 2.12)}$$

$$dH_{S,p} \leq 0 \qquad \text{(Gl. 2.13)}$$

Unter Verwendung der unter Gl. 2.12 & 2.13 dargestellten Zusammenhänge kann man eine neue thermodynamische Funktion beschreiben. Sie dient zur Berechnung der für chemische Prozesse bedeutsamen freien Enthalpie G (Gibbsche freie Enthalpie):

$$G = H - T \cdot S \qquad \text{(Gl. 2.14)}$$

Gleichung 2.14 macht deutlich, dass in Biopolymermischungen die Differenz zwischen dem im System auf Wechselwirkungsenergien bezogenen Anteil (Enthalpie H) und dem Anteil, der die Konformationsmöglichkeiten repräsentiert (Entropie S), ausschlaggebend für die Vorhersage des Systemsverhaltens ist.

Darauf soll im Folgenden noch im Detail eingegangen werden, zunächst muss in diesem Zusammenhang aber auch der Ansatz für den Fall einer Druckänderung bei konstantem Volumen genannt werden. Unter Verwendung von analogen, in Gl. 2.8 & 2.9 genannten Fällen, beschreibt die folgende thermodynamische Funktion zur Berechnung der freien Energie A (Helmholtz-Energie) die Verhältnisse mit Druckänderung bei konstantem Volumen:

$$A = U - T \cdot S \qquad \text{(Gl. 2.15)}$$

Da in den Fällen, die mit Gleichung 2.15 beschrieben werden, keine Volumenarbeit geleistet wird, muss bei der energiebezogenen Größe mit der inneren Energie U statt mit der Enthalpie H gearbeitet werden. Dieser Ansatz findet beispielsweise in der Hochdrucktechnik Anwendung.

In dieser Arbeit werden dagegen Mischungsvorgänge von Biopolymeren unter konstanten Druckverhältnissen betrachtet. Hier gilt die freie Enthalpie G als wichtiges Kriterium zur Bewertung von Verhaltensweisen der an Prozessabläufen beteiligten Reaktionspartner. So bildet folgender Zusammenhang die Basis zur Einteilung chemischer Prozesse in exotherme oder endotherme Reaktionen:

$$\Delta G_{T,p} \leq 0 \qquad \text{(Gl. 2.16)}$$

Das bedeutet, dass chemische Reaktionen bei konstanter Temperatur und konstantem Druck freiwillig ablaufen (endotherm), wenn damit eine Abnahme der freien Enthalpie verbunden ist. Um die Bedeutung von G nochmals zu unterstreichen, werden die Bedingungen für eine freiwillige endotherme Reaktion im Folgenden im Detail dargelegt:

Bei einer solchen Reaktion nimmt die Enthalpie H spontan zu (H > 0). Soll die Reaktion nun freiwillig verlaufen, muss trotz der Zunahme von H die Bedingung dG < 0 gelten. Dies ist aber nur dann möglich, wenn die Entropie des Systems so stark zunimmt, dass T*dS positiv wird und sein Betrag größer als dH ist (vgl. entsprechend Gl. 2.14). Aus diesem Zusammenhang wird deutlich, dass die Triebkraft für endotherme Reaktionen die Entropiezunahme im System ist. Sie muss die Entropieabnahme der Umgebung aufgrund der Wärmeabgabe von der Umgebung an das System überwiegen. Grundlegend muss hier betont werden, dass die Ursache für freiwillige Reaktionen thermodynamischer Art in der Zunahme der Entropie liegt, nicht in einer Energieminimierung.

Wie am Anfang dieser Beschreibung thermodynamischer Vorgänge angegeben, ist nun noch der Begriff „Unordnung der Teilchen“ in Bezug auf die Entropie genauer zu erläutern. Grundlage dazu bildet eine statistische Betrachtungsweise von Vorgängen, die mit der Entropie verknüpft sind. Sie führt mit der Anzahl der Möglichkeiten zur Energieverteilung W zu der von Ludwig Boltzmann vorgeschlagenen Formel:

$$S = k \cdot \ln W \qquad \text{(Gl. 2.17)}$$

In der Formel ist k die Boltzmannkonstante und W gibt die Anzahl der verschiedenen Möglichkeiten an, um die Gesamtenergie des Systems auf die unterschiedlichen Zustände von Atomen oder Molekülen zu verteilen. Auf Lösungen von Biopolymeren und Serummolekülen übertragen, bedeutet dies die Gesamtsumme der Anordnungsmöglichkeiten von Elementarteilchen aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung im Systemvolumen. Da die Entropie beispielsweise aus DSC-Messungen abgeleitet werden kann, ermöglicht diese Formel die Berechnung des Ordnungszustands eines Systems.

Im Hinblick auf die durchgeführten Untersuchungen von Polymeren/Makromolekülen in dieser Arbeit entspricht also eine maximale Entropie einer Maximierung der Konformationsmöglichkeiten aller im System vorhandenen Stoffe (COTTERILL, 2002). Diese Aussage bezieht sich nicht nur auf Polymerketten, sondern ebenso auf die Anordnungsmöglichkeiten der Lösungsmittelmoleküle. Entsprechend strebt in verdünnten Polymerlösungen die Konformation der Makromoleküle eine Minimierung der hydrophoben Oberfläche an, um die große Anzahl an Lösungsmittelmolekülen, die vor dieser Fläche in quasi-kristallinem Zustand fixiert sind, zu minimieren (SINGH ET AL., 1998).

Eine Vermischung verschiedener Stoffe kann jedoch aufgrund des Molekülaufbaus oder anderer spezifischer Eigenheiten des Systems dazu führen, dass eine Anordnung bestimmter Komponenten bevorzugt wird. Auf diese realen, also nicht-idealen Fälle soll aber erst später eingegangen werden. Zum besseren Verständnis soll zunächst die Anwendung statistischer Thermodynamik bei Mischsystemen anhand idealer Systeme eingeführt werden.

In diesen idealen Fällen, wie z.B. bei einer Mischung idealer Gase, treten keine Volumen- und Enthalpieänderungen auf (FLORY, 1953; ATKINS, 1990; SYRBE, 1998). Damit wird die freie Gibbsche Energie in diesen idealen Systemen nur durch die Temperatur und die Anordnungsmöglichkeiten aller im System vorhandenen molekularen Einheiten, die sich in gewisser Weise im Betrag von W widerspiegeln, bestimmt. Ausgangspunkt für die folgende Betrachtung soll ein System idealer Gase sein, denn die daraus gewonnenen Erkenntnisse lassen sich grundsätzlich auch auf flüssige Mischungen übertragen. Lediglich die Eigenschaften, die im Begriff "ideal" definiert sind, beziehen sich spezifisch auf Gase bzw. Flüssigkeiten, wie später erläutert wird. Die freie Mischungsenthalpie ΔG_M, also die Gibbsche freie Enthalpie, die zum Mischungszeitpunkt (z.B. bei der Lösung von Biopolymeren) vorliegt, erhält man aus folgender Beziehung unter Verwendung der Stoffmenge n, allgemeinen Gaskonstante R, der Temperatur T und dem Molenbruch x_i des Stoffes i:

$$\Delta G_M = n \cdot R \cdot T \cdot \sum (x_i \cdot \ln x_i) \qquad \text{(Gl. 2.18)}$$

Da $x_i < 1$ ist, nimmt auch die freie Mischungsenthalpie ΔG_M negative Werte an. Für eine vollständige thermodynamische Betrachtung ist diese Beziehung durch den Ausdruck für die Mischungsentropie ΔS_M zu ergänzen. Diese erhält man durch partielle Differentiation der freien Mischungsenthalpie nach der Temperatur (ATKINS, 1990):

$$\Delta S_M = -\left(\frac{\partial \Delta G_M}{\partial T}\right)_{p,n} \qquad \text{(Gl. 2.19)}$$

Damit erhält man:

$$\Delta S_M = -n \cdot R \cdot \sum (x_i \cdot \ln x_i) \qquad \text{(Gl. 2.20)}$$

Zur Verdeutlichung dieser für die Beschreibung von Mischvorgängen wichtigen Grundlagen wird zunächst der einfache Fall des Vermischungsprozesses zweier idealer Gase betrachtet. Danach wird die Betrachtung auf den komplexen Fall der Mischung von Makromolekülen erweitert. Da bei idealen Gasen keine Wechselwirkungen auftreten, kann man die beiden Beziehungen Gl. 2.18 und Gl. 2.20 in Gl. 2.14 einsetzen und es wird deutlich, dass die Mischenthalpie gleich null ist. Die Triebkraft für den Mischungsvorgang von idealen Gasen stammt damit nur aus der Entropiezunahme des Systems.

Geht man nun zu flüssigen Mischsystemen über, so gilt für die freie Mischungsenthalpie die gleiche thermodynamische Beziehung (vgl. Gl. 2.18). Damit bleiben die bereits genannten Schlussfolgerungen auch für flüssige Mischungen gültig. Allerdings muss noch der Begriff „ideal“ von gasförmigen auf flüssige Mischsysteme übertragen werden. Konkret bedeutet dies, dass in idealen Lösungen Wechselwirkungen prinzipiell möglich sind. Eine Lösung gilt aber nur dann als “ideal”, wenn die Forderung erfüllt ist, dass bei einem System aus Teilchen der Sorten A und B die mittleren Wechselwirkungen zwischen A-B den mittleren Wechselwirkungen zwischen A-A und B–B entsprechen.

Übertragen auf Biopolymerlösungen würde sich der ideale Lösungsfall beispielsweise in der einfachen Mischung eines makromolekularen Stoffs A in einem definierten Volumen von Serummolekülen der Sorte B ergeben. Im nächst komplexeren Fall, der Mischung zweier gelöster Biopolymere, würden die beiden Biopolymere A und B in einer dreidimensionalen Matrix von Serummolekülen C angeordnet werden. Bei realen Systemen bedeutet dies jedoch aus thermodynamischer Sicht in der Regel, dass alle Wechselwirkungen im allgemeinen Fall voneinander verschieden sind (A-A ≠ A-B ≠ A–C ≠ B–B etc.). Dies hat zur Konsequenz, dass bei dem Mischungsvorgang komplexer realer Systeme Enthalpieänderungen und zusätzliche Entropiebeiträge auftreten können, wie beispielsweise bei einer unvollkommenen Mischung mit Clusterbildung. Als weitere Möglichkeit ist in diesem Zusammenhang das Entstehen einer positiven freien Mischungsenthalpie zu nennen. Dies kann bei großer positiver Enthalpieänderung oder bei negativer Entropieänderung der Fall sein, wie bei einer Umorganisation der Moleküle während der Mischung zu einem geordneten System. Letzteres würde beispielsweise bei einem Anstieg der hydrophoben Gesamtoberfläche auftreten, da dann das Lösungsmittel in diesen Grenzflächen eine quasi-kristalline Struktur annimmt. Eine positive freie Mischungsenthalpie führt letztendlich zu spontanen Entmischungserscheinungen, wie Gleichung 2.16 verdeutlicht, da für ein freiwilliges Beibehalten des Zustands einer homogenen Mischung die freie Enthalpie G kleiner gleich null sein muss.

Der vorhergehende Abschnitt zeigte die theoretischen Grundlagen bei Mischungen von

Flüssigkeiten. Dabei wurden die beteiligten Moleküle, wie üblich, als Kugelmodelle angenommen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit werden jedoch an wässrigen Biopolymerlösungen durchgeführt, so dass nicht ausschließlich von kugelförmigen Teilchen ausgegangen werden kann. Die theoretischen Grundlagen müssen daher schrittweise durch eine Betrachtung der Molekülform erweitert werden. Dabei ist aufzuzeigen, welche Vereinfachungen in diesem Zusammenhang gemacht wurden und wie weit dadurch auch der Gültigkeitsbereich von theoretischen Beschreibungen festgelegt wird.

Das Modell zur Betrachtung des Einflusses der Molekülform auf das Mischungsverhalten geht bei der Mischung von der statistischen Besetzungsmöglichkeit einer Fläche durch die Stoffe aus, die beispielsweise als Polymerkettenmoleküle vorliegen können. Zur Erläuterung sind nachfolgend zwei Beispiele, die halbverdünnte Verhältnisse repräsentieren, angeführt. Der zugrundeliegende Denkansatz und die daraus resultierenden mathematischen Beziehungen beruhen auf der Flory-Huggins-Theorie (FLORY, 1953).

Zum besseren Gesamtverständnis dieses theoretischen Ansatzes sollen zunächst zwei exemplarische Beispiele erörtet werden. Das erste Beispiel dient dem Grundverständnis des Einflusses der Serumqualität und des Molekulargewichts auf das Löslichkeitsvermögen der Biopolymere, welches eine Grundvoraussetzung für den Aufbau komplexerer Mischungen ist. Im zweiten Beispiel wird dann auf ein Mischsystem aus zwei verschiedenen Makromolekültypen eingegangen.

Beispiel 1: Solvent s + Polymer y *(mit Solventlänge s = 1)*

Abbildung 2.1 zeigt, dass die Möglichkeiten der Anordnung auf der Fläche mit zunehmender Kettenlänge y abnehmen. Wie bereits dargelegt, hat die Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten, also der möglichen Konformationen der Makromolekülketten, einen direkten Bezug zur Entropie. Aus diesem Zusammenhang heraus berechnet sich die Mischungsentropie ΔS_{mix} pro Mol unter

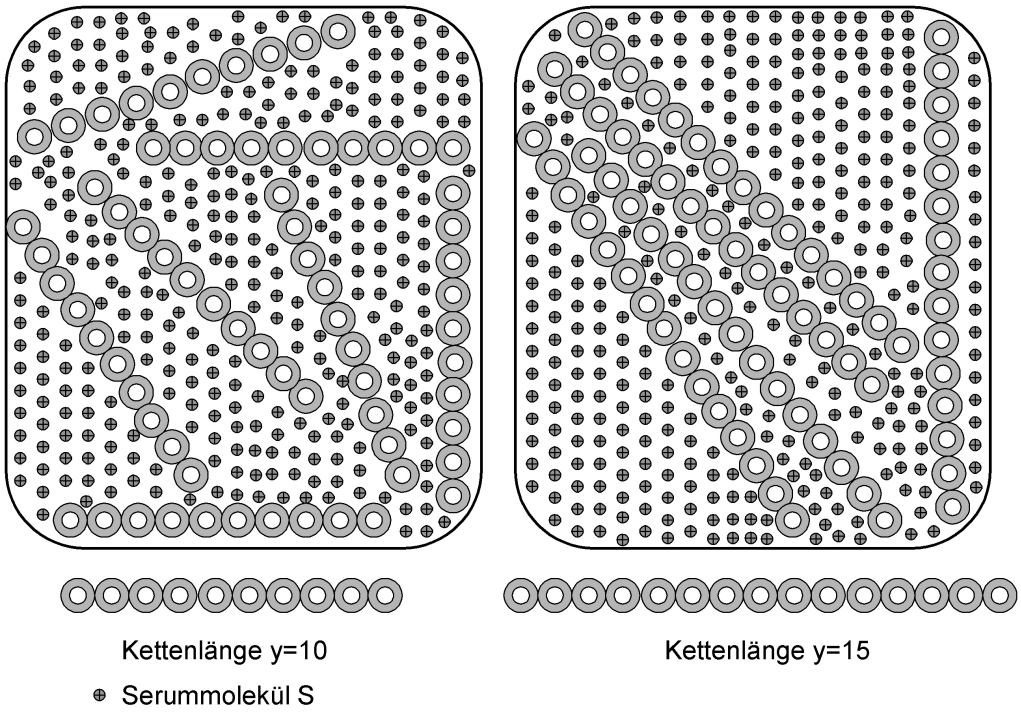

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Einflusses der Kettenlänge y auf die Anordnungsmöglichkeiten in einem System mit Solvent S.

Verwendung des Volumenbruchs des Solvents Φ_S, des Volumenbruchs des Polymers Φ_y und der Kettenlänge y des Polymers wie folgt:

$$\Delta S_{mix} = -R \cdot \left(\Phi_S \cdot \ln \Phi_S + \frac{\Phi_y}{y} \cdot \ln \Phi_y \right) \qquad \text{(Gl. 2.21)}$$

Die Einführung von Volumenbrüchen in Gl. 2.21 ergibt sich aus einer besseren geometrischen Vorstellung der Besetzungsmöglichkeiten in einem definierten dreidimensionalen Raum (FLORY, 1953; SYRBE, 1998). Grundsätzlich ist die Gleichung 2.21 wie Gl. 2.20 aufgebaut, die Stoffbezeichnung i wird hier entsprechend durch die Solventmoleküle S und den Polymertyp y ersetzt.

Beispiel 2: Polymer y + Polymer z

Auch beim zweiten Beispiel, der Mischung zweier Makromoleküle der Längen y und z, nehmen die Besetzungsmöglichkeiten mit zunehmender Kettenlänge ab. Verdeutlicht wird dies mit Abbildung 2.2., in der schematisch gezeigt wird, dass bei größeren Kettenlängen im gleichen Volumenelement die flexiblen Anordnungsmöglichkeiten durch die benachbarter Makromoleküle stärker eingeschränkt sind und damit eine wesentlich größere Beeinflussung der Entropie stattfindet. Die Mischungsentropie ΔS_{mix} pro Mol berechnet sich in diesem Fall wie folgt:

$$\Delta S_{mix} = -R \cdot \left(\frac{\Phi_y}{y} \cdot \ln \Phi_y + \frac{\Phi_z}{z} \cdot \ln \Phi_z \right) \qquad \text{(Gl. 2.22)}$$

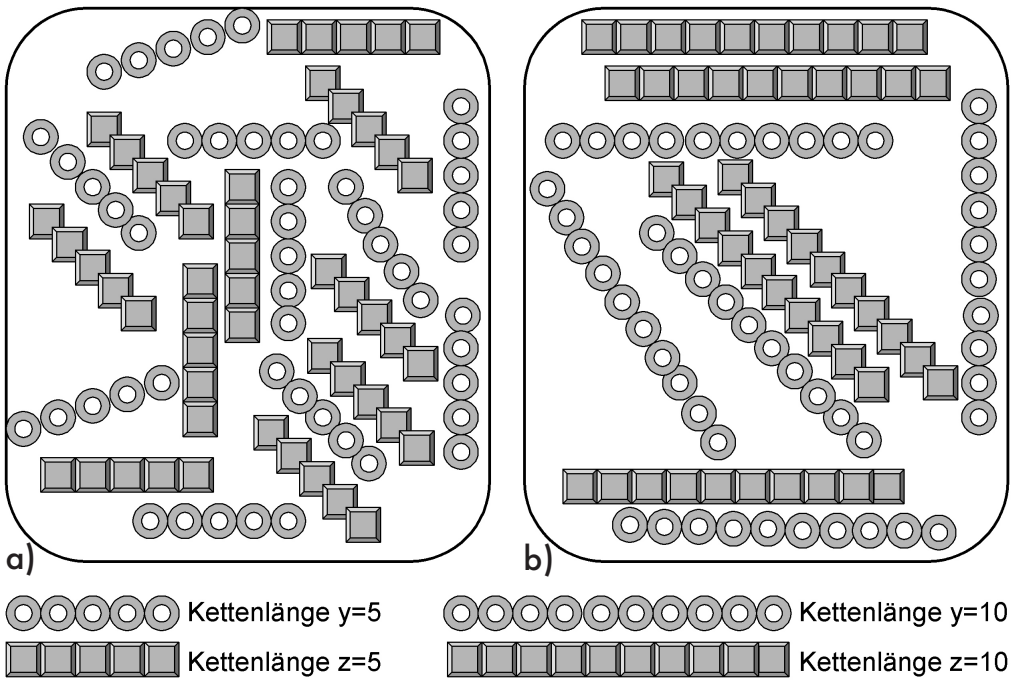

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Einflusses der Kettenlänge y eines Polymers auf die Anordnungsmöglichkeiten in einer Mischung mit einem Polymer der Kettenlänge z. Links (a): Kurze Kettenlänge; rechts (b): längere Kettenlänge.

Dabei steht ΔS_{mix} für die Mischungsentropie pro Mol, R für die allgemeine Gaskonstante, Φ_y für den Volumenbruch des Polymers y, Φ_z für den Volumenbruch des Polymers z, y für die Kettenlänge des Polymers y und z für die Kettenlänge des Polymers z. Durch die grundlegende Bedeutung von Gl. 2.20 wird auch hier die Analogie zu Gl. 2.22 deutlich. Gleichung 2.20 gilt für ideale Flüssigkeiten, und genau diese idealen Voraussetzungen ($\Delta H_{mix} = O$) sind auch für die Berechnung der Mischentropie nach Gl. 2.21 oder Gl. 2.22 bei Polymerlösungen oder -mischungen notwendig. Explizit bedeutet dies, dass keine Wechselwirkung zwischen Polymer und Solvent bzw. zwischen Polymer y und Polymer z stattfinden darf. Will man also in einer theoretischen Betrachtung auch diese tatsächlich vorhandenen Wechselwirkungen ($\Delta H_{mix} \neq O$) berücksichtigen, so muss dies durch Einführen eines Wechselwirkungsparameters χ_{ij} geschehen. Auf den Wechselwirkungsparameter χ wird nach Darstellung der entsprechenden mathematischen Zusammenhänge der obigen Bedingungen noch im Detail eingegangen.

Ein solches System, mit Wechselwirkungen ($\Delta H_{mix} \neq O$) und $\Delta S_{mix} \neq O$, wird sinnvollerweise mit der freien Gibbschen Mischenthalpie beschrieben. Sie berechnet sich in ihrer Gesamtheit ("total") wie folgt (Tompa, 1956; Syrbe, 1998):

$$\Delta G_{mix,total} = R \cdot T \cdot \left(\sum n_i \cdot \ln \Phi_i + \sum \chi_{ij} \cdot \Phi_i \cdot \Phi_j \cdot \sum m_i \cdot n_i \right) \quad \text{(Gl. 2.23)}$$

Dabei steht $\Delta G_{mix,total}$ für die freie Gibbsche Mischungsenthalpie, R für die allgemeine Gaskonstante, T für die Temperatur, n_i für die Stoffmenge des Polymers i, Φ_i für den Volumenbruch des Polymers i, Φ_j für den Volumenbruch des Polymers j, m_i für die Kettenlänge des Polymers i und χ_{ij} für den Wechselwirkungsparameter zwischen Polymer i und j. Aus Gl. 2.23 geht hervor, dass $\Delta G_{mix,total}$ je nach Größe der beiden Summanden im Klammerausdruck negativ oder positiv sein kann. Damit kann erkannt werden, ob das System zu einem spontanen Mischungs- oder Entmischungsprozess neigt.

Wenn ΔG_{mix} und die Stoffmenge n_i der Komponente i bekannt ist, lässt sich über eine partielle Differentiation der freien Gibbschen Mischungsenthalpie nach der Stoffmenge der Komponente n_i das chemische Potential μ_i der i-ten Komponente ableiten (Atkins, 1990):

$$\Delta \mu_i = \left(\frac{\partial \Delta G_{mix}}{\partial n_i} \right)_{p,T,n(j \neq i)} \quad \text{(Gl. 2.24)}$$

Das thermodynamische Gleichgewicht, dessen Einstellung bei einer Mischung und dem Komponentenaustausch zwischen zwei Phasen gefordert ist, kann hier nur erreicht werden, wenn das chemische Potential für alle Komponenten in jeder der zwei Phasen gleich ist. Dies stellt schon bei zwei Komponenten eine nicht leicht zu erfüllende Bedingung dar. Bereits bei einem System mit drei Komponenten erweitern sich die gezeigten Gleichungssysteme beträchtlich (Doublier et al., 2000). Die Erörterung der Wechselwirkungskoeffizienten bzw. -parameter führt zu einer all-

gemeineren Beurteilung der Flory-Huggins Theorie, wie im Nachfolgenden gezeigt wird.

Physikalisch gesehen gibt der Parameter χ_{ij} die Wechselwirkungsenergie für ij-Polymermolekülpaare an, da es sich ja um ein reales System handelt, das nicht die Annahmen für eine ideale, flüssige Mischung erfüllt. Zur praktischen Ermittlung von χ_{ij} können je nach Eignung des Systems Lichtstreuung oder Messungen der osmotischen Eigenschaften angewendet werden. Die theoretische Berechnung von χ_{ij} aus vorgegebenen Werten des Mischsystems (z.B. Volumenbrüchen) führt auf ein unterbestimmtes Gleichungssystem (CLARK, 2000). Zur Lösung muss man einen Wert von χ_{ij} kennen. CLARK (2000) befasst sich sehr ausführlich mit der experimentellen Überprüfung der Flory-Huggins Theorie mittels verschiedener ternärer Systeme (Polymer/Polymer/Solvent) für den noch weniger komplexen Fall eines Systems aus ungeladenen Teilchen. Es zeigt sich, dass gerade die nachfolgend genannten Zusammenhänge zwischen Biopolymermischsystemeigenschaften und den entsprechenden Werten von χ_{ij} eine Schlüsselrolle dafür spielen, ob die Theorie aus der Flory-Huggins-Modellvorstellung erfolgreich anwendbar ist oder nicht.

Dabei sind konkret 3 wichtige Punkte festzuhalten:

1.) Die χ_{ij} Parameter hängen von der Verteilung der Molmassen und der Konzentration ab, sind also nicht konstant (REHAGE ET AL., 1965; KONIGSVELD ET AL., 1968; CLARK, 2000).

2.) Die χ_{ij} Parameter stehen zudem auch noch in Relation zu den sog. Virialkoeffizienten (CLARK, 2000). Die Virialkoeffizienten werden daher anschließend noch im Detail erläutert.

3.) Schon für den einfacheren Fall von (Polymer-)Komponenten ohne Ladungen müssten die χ_{ij} Werte nicht nur aus den zweiten, sondern auch aus höheren Virialkoeffizienten berechnet werden, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (CLARK, 2000). Damit steigt nicht nur der mathematische Aufwand sehr, sondern auch die Schwierigkeit der Bereitstellung von vollständigen Messdaten.

Bei der Erläuterung der Virialkoeffizienten (VK) muss zunächst darauf hingewiesen werden, dass die Gültigkeit von Zustandsgleichungen grundsätzlich an Voraussetzungen gebunden ist. Ein gutes Beispiel dafür ist die Abhängigkeit der zwischenmolekularen Kräfte vom Teilchenabstand. Diese Abhängigkeit wird mit dem Kompressionsfaktor Z beschrieben. Für ideale Gase besitzt dieser Faktor Z den Wert 1:

$$\frac{p \cdot V}{n \cdot R \cdot T} = Z = 1 \qquad \text{(Gl. 2.25)}$$

Die Abweichung von Z=1, wie es die Form Z=f(p) beschreibt, ist ein Maß für die Abweichung von realen Gasen gegenüber idealen Gassystemen. Mathematisch führt dies zur einer Reihenentwicklung, mit deren Gliedern zusätzlich auch verschiedene nicht-lineare Effekte erfasst

werden. Aus Gleichung 2.25, die den idealen Fall beschreibt, erhält man dann für Z=f(p):

$$p \cdot V_m = R \cdot T \cdot \left(1 + B \cdot p + C \cdot p^2 + \ldots\right) \qquad \text{(Gl. 2.26)}$$

V_m steht in diesem Ansatz für das molare Volumen, während B, C etc. die Koeffizenten der verschiedenen nicht-linearen Effekte repräsentieren. Der Koeffizent B in dieser Gleichung entspricht dem zweiten Virialkoeffizienten (in den folgenden Gleichungen in Einklang mit den zitierten Literaturstellen als A bezeichnet), C entsprechend dem dritte Virialkoeffizienten etc. Anwendung findet der zweite Virialkoeffizient bei einem theoretischen Ansatz von EDMOND ET AL. (1968) zur Ermittlung des Phasenverhaltens bei Mischungen ungeladener Polymere. Basis dieser Theorie bildet die thermodynamische Natur des Systems. Die zweiten Virialkoeffizienten erscheinen hier direkt bei der Berechnung des chemischen Potentials und werden bei diesem Ansatz gegebenenfalls als genügend aussagekräftig zur Bewertung der Bedingungen für eine Phasentrennung angesehen. Neben einer auf das Volumen bezogenen ausreichenden Polymerkonzentration wird vorausgesetzt, dass es sich um ungeladene Polymere handelt. In der praktischen Anwendung dieser Theorie gilt (ANTONOV ET AL., 1979; GRINBERG ET AL., 1997; SYRBE ET AL., 1998; ANTONOV ET AL., 1999):

$$A_{y,z} > A_{y,y} \cdot A_{z,z} \qquad \text{(Gl. 2.27)}$$

Dabei steht A für den zweiten Virialkoeffizienten, die Indices y und z für die jeweiligen Polymertypen y und z. Gemäß CLARK (2000) erfordern jedoch beide Theorien zur besseren Übereinstimmung mit den experimentellen Daten die Einbeziehung höherer Virialkoeffizienten. Die Brauchbarkeit vor allem der Flory-Huggins Theorie zur Beschreibung von polydispersen Biopolymermischsystemen wird auch bei SYRBE (1998) angezweifelt. CLARK (2000) hebt die physikalische Bedeutung von χ hervor, gibt aber mit einem Beispielsystem folgenden Hinweis hinsichtlich der praktischen Anwendung: "χ values are not truly independent of the polymer molecular weights (or indeed polymer concentration), nor are calculated molecular weight values always in good agreement with experimental values." (CLARK, 2000). Zudem wurden bei einem Vergleich von berechneten und von auf Messungen basierten Phasendiagrammen verschiedene Inkonsistenzen festgestellt. Als Beispielsystem wird hier ein Vergleich von synthetischen Polymeren mit verzweigten Biopolymeren natürlichen Ursprungs genannt. Es ist eine Tatsache, dass Veränderungen in Makromolekülaufbau und Polydispersität gemäß dieser Theorie in einem gewissen Grad die Qualität der Korrelation zwischen der Aussage aus dem theoretischen Ansatz und den praktischen Messwerten beeinträchtigen müssten. Dies ist hier keineswegs der Fall, was als weiterer Hinweis gewertet wird, dass das "model was unlikely to have an accurate (quantitative) predictive role to play in the biopolymer case .." (CLARK, 2000).

Da die theoretischen Ansätze, wie in den vorangegangenen Gleichungen gezeigt, auf den thermodynamischen Gesetzen begründet sind, verdeutlichen sie die physikalischen Einflußgrößen, die im

Hintergrund wirken. Die Gültigkeit der Theorie beschränkt sich jedoch auf einige definierte Systeme, da - wie bereits erwähnt - Vereinfachungen bezüglich Molekülform und Ladungsverhältnisse getroffen werden mussten. Insgesamt zeigt sich, dass die vorhandenen Grundlagen bestenfalls zu einer überschlägigen qualitativen Beurteilung des Verhaltens von untersuchten Solvent/Biopolymer-Biopolymer-Systemen dienen können. Diese Mischungen weisen in der Realität eine sehr viel höhere Komplexität auf, vor allem in den Fällen, in denen die Auswirkungen geladener (Makro-)Moleküle auf das thermodynamische Verhalten zu berücksichtigen sind.

Für das Verständnis und die Diskussion der anschliessend vorgestellten Untersuchungsergebnisse werden daher weitere Grundlagen zu den Bereichen

elektrische Wechselwirkungsphänomene,

chemisches Potential

erörtert. Die hier dargelegten Zusammenhänge dienen damit als Basis, um aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten aussagekräftige qualitative Angaben abzuleiten.

2.1.2 Elektrische Wechselwirkungsphänomene

2.1.2.1 Einfluss von Ionen und Aufbau der Dipolmatrix

Bei Anwesenheit von Ionen in einer Lösung treten verschiedene Phänomene auf, deren physikalischer Hintergrund im Folgenden beschrieben und dargelegt wird. Die starken elektrostatischen Kräfte in solchen intermolekularen Interaktionserscheinungen führen im Vergleich zu anderen Wechselwirkungen (wie z.B. van-der-Waals-Kräfte) dazu, dass ein zentrales Ion hoher Ladungsdichte eine Ionenwolke aus Ionen mit entgegengesetzter Ladung zum elektrostatischen Ausgleich assoziiert.

Ein weiterer Effekt tritt bei Lösungsmitteln aus polaren Molekülen (z. B. Wasser) auf. Die Teilchen umgeben das Ion wie eine Hülle – ein Vorgang, der als Solvatierung bezeichnet wird und welcher die Beweglichkeit des Ions bestimmt. Als Maß für dieses Zusammenwirken der vorhandenen Ionen gilt die Ionenstärke I, bestimmt aus Anzahl der Ladung z_i des Ions i und der Stoffkonzentration c_i (WEDLER, 1997):

$$I = 0{,}5 \cdot \sum z_i^2 \cdot c_i \qquad \text{(Gl. 2.28)}$$

Da sich die Untersuchungen in dieser Arbeit überwiegend auf Mischungen mit Polyelektrolyten beziehen, werden im Folgenden die wichtigsten Grundlagen zu polaren Molekülen angeführt. Ein polares Molekül besitzt ein permanentes elektrisches Dipolmoment. Dieses Dipolmoment entsteht aus Partialladungen bzw. einer Ungleichverteilung der Ladungen. Induzierte Dipole werden durch ein entsprechendes elektrisches Feld erzeugt. Die Ungleichverteilung der Ladungen kann ferner auf einer asymmetrischen Anordnung der Atome in den Molekülen beruhen. Damit ist eine ungleiche Ladungsverteilung verbunden, die besonders bei funktionellen Gruppen deutlich wird, die aus stark elektronegativen Atomen bestehen.

Von zentraler Bedeutung ist im Zusammenhang mit polaren Molekülen das Wassermolekül selbst, da es die Grundmatrix in verdünnten Biopolymerlösungen darstellt. Seine Polarität bewirkt die Solvatierung von Ionen. Im Zusammenhang mit dem Begriff "Solvatierung" ist auch auf die grundlegende Tatsache hinzuweisen, dass Dipoleffekte auch van-der-Waals´sche Bindungen in einem Biopolymersystem bestimmen können, wie Folgendes zeigt:

Geht man von der vollständigen Solvatierung jedes Biopolymers durch Lösungsmittelmoleküle aus, so wäre das Auftreten von Molekülverbänden mit einem höheren Ordnungsgrad, wie beispielsweise die Micellenbildung von Caseinen, aufgrund der Zusammenlagerung hydrophober Gruppen über eine endotherme Reaktion nicht möglich. Die Realität zeigt jedoch das Gegenteil. Der Antrieb für diese Reaktion liegt darin, dass bei einer Solvatation kolloidale Molekülcluster bei Annahme einer micellaren Form von weniger Lösungsmittelmolekülen umgeben sind als die einzelnen Biomoleküle. Damit steigt die Zahl nicht-assoziierter, also nicht an eine Konformation oder Anordnung im Raum gebundener Lösungsmittelmoleküle, was die Entropie im System "Lösungsmittelmatrix" erhöht. Gleichzeitig sinkt zwar die Entropie im System "Biopolymermicellen" durch den geordneten Aufbau hydrophober Gruppen. Jedoch bei verdünnten Lösungen

bedeutet dies für das Gesamtsystem aufgrund der höheren Anzahl der relativ kleineren Lösungsmittelmoleküle mit relativ mehr Konformationsmöglichkeiten die bestmögliche Maximierung der Gesamtentropie.

Die Auflösung quasi-kristalliner Bereiche in der Lösungsmittelmatrix (Abb. 2.3) aufgrund der Verringerung exponierter hydrophober Oberflächen durch die Knüpfung hydrophober Wechselwirkungen ist ein Beispiel dafür, dass durch Zunahme der Ordnung in einem Systemteil die Abnahme in dem anderen Bereich mehr als ausgeglichen werden kann und daher thermodynamisch als vorteilhaft gilt. Gelöste Ionen forcieren durch ihren eigenen Bedarf an assoziierten Serumdipolen (zum Aufbau ihrer Hydrathülle) die Minimierung hydrophober Oberflächen, damit weitere Wassermoleküle, die vorher in den quasi-kristallinen Bereichen fixiert waren, zur Verfügung stehen.

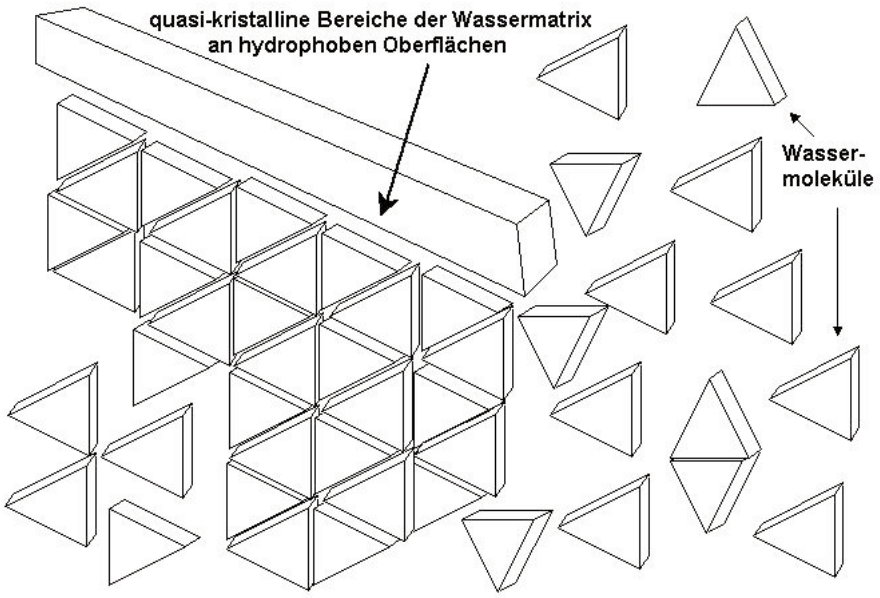

Abb. 2.3: Schematische Darstellung quasi-kristalliner Bereiche in der Wassermatrix vor hydrophoben Oberflächen.

In den vorangegangenen Kapiteln zu den Grundlagen der Thermodynamik wurde bereits die wichtige Rolle des Entropiezuwachses für den Fall freiwillig ablaufender Reaktionen dargestellt. Auf die hier zu untersuchenden Biopolymersysteme bezogen, wäre als Beispiel für eine freiwillig ablaufende Reaktion die Mischbarkeit zu nennen, d.h. dass beide Biopolymere in einem Volumen homogen gemischt verbleiben. In der Einleitung wurde aber bereits angesprochen, dass auch Änderungen der Serumzusammensetzung, wie z.B. in der Ionenstärke, diese freiwillige Mischbarkeit stören können. Da es sich bei den Polysacchariden in dieser Arbeit zudem um Polyanionen handelt, wird im folgenden Abschnitt das etablierte Hintergrundwissen zum Verständnis von elektrostatischen Wechselwirkungen dargelegt.

2.1.2.2 Elektrische Doppelschicht

Die etablierten physikalischen Modelle betrachten das nach außen geladene, ionische Teilchen wie eine aufgeladene Elektrode, da ein Kugelmodell mathematisch selbst näherungsweise nur

schwierig erfasst werden kann (PAULI ET AL., 1929). Entsprechend werden die polyionischen Biopolymere in den nachfolgenden Abbildungen einer Elektrode gleichgestellt. Sind keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Umgebung vorhanden, so zeigt sich eine Zufallsverteilung der Systemelemente. Im Falle eines polaren Lösungsmittels wie Wasser mit darin gelösten Ionen werden dagegen bei negativ aufgeladener Elektrode die Dipole und Kationen sich an die Elektrode anlagern. Dies hat den Aufbau eines Konzentrationsgradienten zur Folge, an der Elektrodengrenzfläche baut sich eine höhere (Ionen-)Konzentration gegenüber dem übrigen Lösungsmittelvolumen auf. Vor der Elektrode selbst tritt eine elektrische Doppelschicht in Erscheinung.

Diese Vorgänge wurden im Modell von Helmholtz und Perrin nachgebildet (Abb. 2.4). Da es nur eine statische Betrachtungsweise beinhaltet, werden hier jedoch thermische Bewegungen nicht berücksichtigt. Das Modell von Gouy und Chapman vermeidet zwar eine solche Einschränkung mittels der Einführung einer diffusen Doppelschicht, die in die Flüssigkeit hineinreicht (Abb. 2.5). Es kann jedoch im Vergleich zu experimentellen Daten ebenfalls nicht überzeugen. Erst aus der Kombination beider Modelle ergibt sich ein in Bezug auf Übereinstimmung mit realen Versuchsdaten befriedigendes Modell, das als Sternmodell sowohl einen statischen als auch einen diffusen Anteil berücksichtigt.

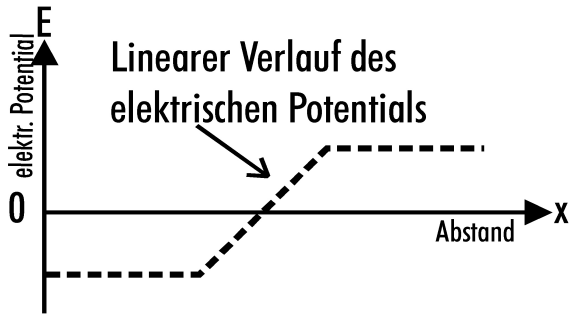

Abb. 2.4: Verlauf des elektrischen Potentials nach dem Modell von Helmholtz und Perrin.

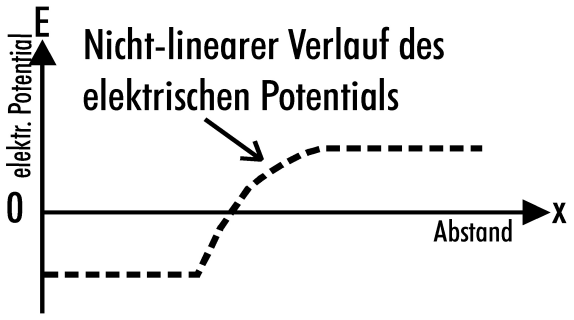

Abb. 2.5: Verlauf des elektrischen Potentials nach dem Modell von Gouy und Chapman.

Das Prinzip des Sternmodells beruht auf einer linearen Abhängigkeit des elektrischen Potentials in unmittelbarer Nähe der Grenzfläche des Polyions. Mit steigendem Abstand sind geladene Teilchen, die als Gegenionen fungieren, nur noch diffus gebunden. Dies spiegelt sich in einer nicht-linearen Potentialsfunktion wider (Abb. 2.6).

Die im Modell von Stern herangezogene Elektrode entspricht bei Biopolymerlösungen dem polyionischen Makromolekül. Der Kurvenverlauf, der die elektrische Wechselwirkung der an das Biopolymer asoziierten Gegenionen beschreibt, hängt bei diesen immer noch einfach aufgebauten Verhältnissen von der Konzentration der Ionen im Lösungsmittel ab. Bei einem Konzentrationsanstieg wird der diffuse Anteil kleiner und der Potentialabfall ist auf die Phasengrenze zwischen Elektrode und dem Lösungsmittel mit den enthaltenen Ionen zusammengedrängt. Die Verhältnisse bei einer Verdünnung der Lösung verändern sich entsprechend gegenläufig.

Bei geladenen Biopolymeren muss auch noch ein weiterer Fall dieser Modellvorstellung betrachtet werden: eine unerwartete makroskopische Entmischung unter Ausfällung von Biopolymerkomplexaggregaten. Dies kann auf schwach solvatisierten Ionen beruhen, wie beispielsweise Anionen

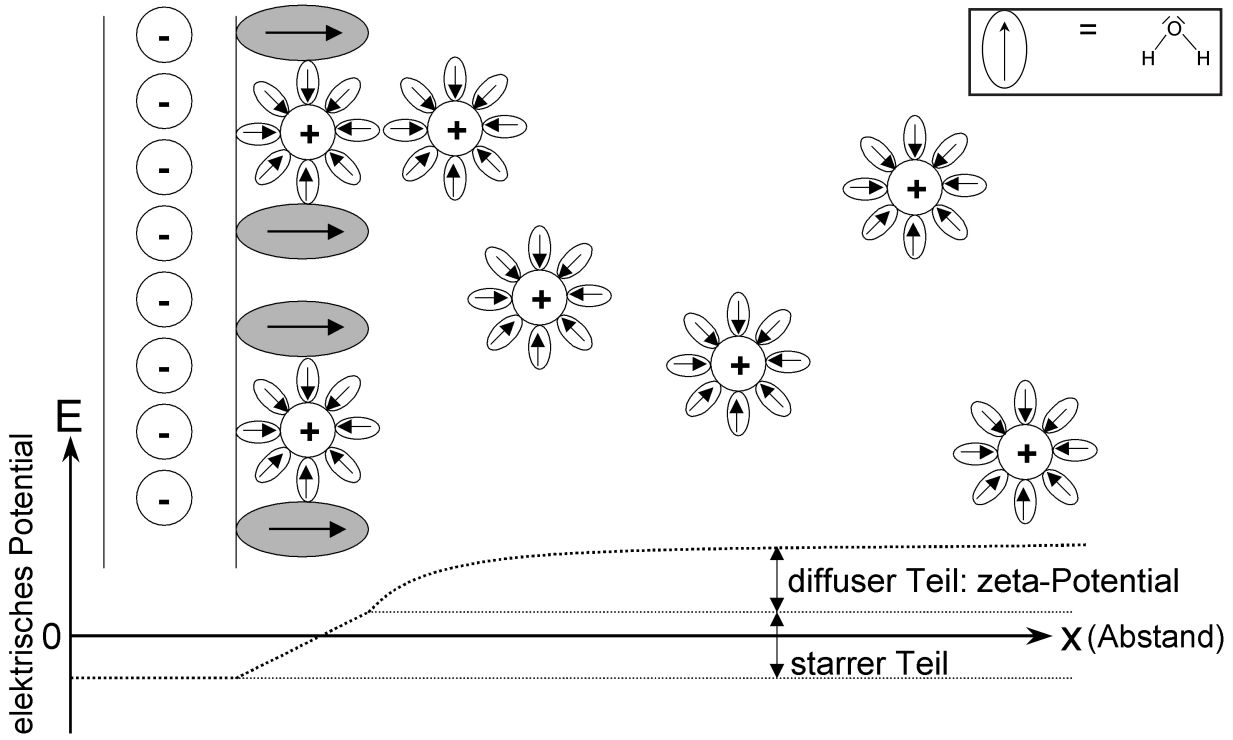

Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Stern-Modells (modifiziert nach HOLZE, 1998).

mit niedriger Ladungsdichte. Sie können an der Phasengrenze teilweise desolvatiert und damit kontaktadsorbiert werden. Damit entstehen elektrostatische wie auch chemische Wechselwirkungen an der Phasengrenze und der inneren Helmholtzebene (Abb. 2.7). Bei starken chemischen Wechselwirkungen kann die kontaktadsorbierte Ladung sogar größer sein als die Ladung der Kontaktfläche, was zu ungewöhnlichen Potentialverläufen führt (PAULI & VALKÓ, 1929; HOLZE, 1998; vgl. Einbruch des Potentialverlaufs E über x in Abb. 2.7).

Diese Kenntnis der Verhältnisse über die elektrische Doppelschicht an formalen Modellen ist damit auf Biopolymerlösungen grundsätzlich übertragbar. Die bereits im Modell dargestellten Schichten finden sich auch bei geladenen Biopolymeren, die als Kolloidteilchen in einer wässrigen Lösung vorliegen, in ähnlicher Form wieder. Direkt an der Oberfläche des Teilchens liegt eine sehr stark assoziierte Schicht von Ionen und Wassermolekülen, die für die Solvatisierung verantwortlich sind. Der Radius

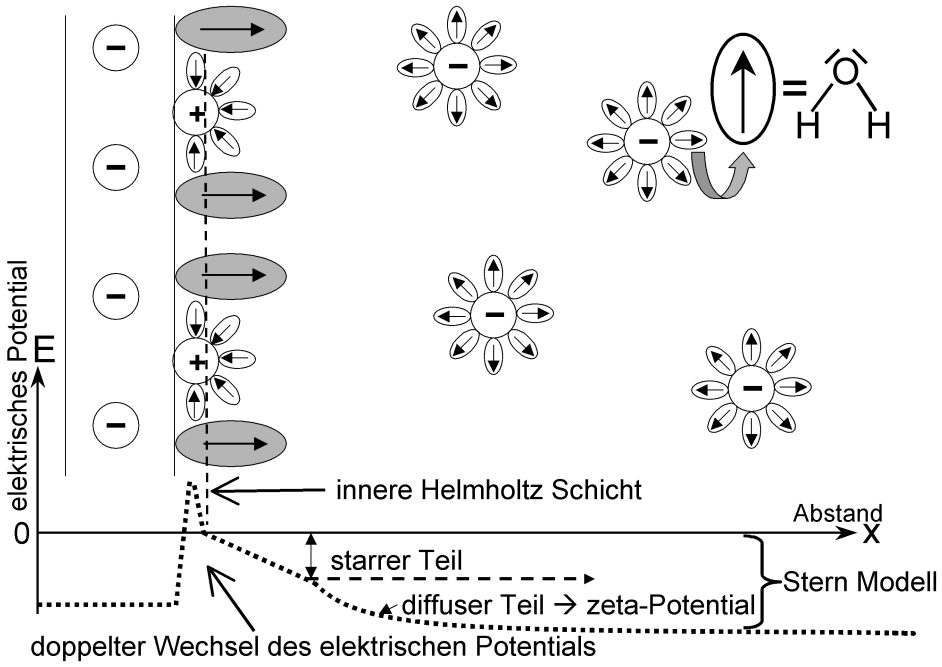

Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Potentialwechsels durch die Adsorption von Gegenionen an der inneren Helmholtz-Ebene (mod. nach HOLZE, 1998).

dieser Schicht wird Scherr-Radius genannt, er beeinflusst die Teilchenbeweglichkeit. Das Potential an der Oberfläche der für die Betrachtung angenommenen Kugel in Bezug zum Potential im Inneren des Lösungsmittelsystems aus Wasser und Ionen wird als zeta-Potential oder elektrokinetisches Potential bezeichnet. Die innere und äußere Schicht von Ladungsträgern bilden die elektrische Doppelschicht, davon ist die erste Ladungsschicht von einer beweglichen diffusen Schicht aus Gegenionen umgeben. Für die durchgeführten Untersuchungen an geladenen Biopolymeren ist es daher notwendig, die Grundlagenbetrachtung auch auf das Verhalten der Polyelektrolyte gegenüber dem Lösungsmittelsystem auszudehnen. Es kann lyophil oder lyophob sein, bei Wasser als Lösungsmittel wird entsprechend von hydrophil und hydrophob gesprochen.

Die Klärung der Stabilitätsmechanismen, die die Aggregation hydrophober Teilchen in wässrigen Dispersionen verhindern, ist grundlegend für die Beurteilung der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit. Eine weitverbreitete Theorie zur Betrachtung dieser Dispersionen ist als DLVO-Theorie (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeck) bekannt (VERWEY ET AL., 1948). Der Grundgedanke dieses theoretischen Ansatzes ist, dass sich die abstoßenden Kräfte zwischen den Ladungen der elektrischen Doppelschichten benachbarter Teilchen durch die anziehenden Kräfte der van-der-Waals-Wechselwirkung der Moleküle gerade ausgleichen. Mathematisch wird dies für große Moleküle wie folgt ausgedrückt:

$$V_{Abstoßung} = +0{,}5 \cdot A \cdot a \cdot \zeta^2 \cdot \ln\left(1 + e^{\frac{-s}{r_d}}\right) \qquad \text{(Gl. 2.29)}$$

Physikalisch ist $V_{Abstoßung}$ wie eine potentielle Energie zu werten. Einflussgrößen sind mit r_d die Dicke der Doppelschicht, der Teilchenradius a, eine Konstante A, das zeta-Potential ζ und der Abstand s der Oberflächen. Letzterer ergibt sich aus der Substraktion des doppelten Teilchenradius a von dem Abstand der Teilchenmittelpunkte R.

Auch $V_{Anziehung}$ kann physikalisch wie eine potentielle Energie gewertet werden. Einflußgrößen sind hier neben einer Konstante B der Abstand s der Oberflächen.

$$V_{Anziehung} = \frac{-B}{s} \qquad \text{(Gl. 2.30)}$$

Die Gesamtenergie ergibt sich aus der Summe von $V_{Abstoßung}$ und $V_{Anziehung}$. Um die Größe von r_d, also die Dicke der Doppelschicht, abschätzen zu können, müssen Ergebnisse aus der Debye-Hückel-Theorie genutzt werden. Sie beschreibt das wirkliche Verhalten von Ionen in neutralen Lösungen in Form von Ionenwolken und thermischer Bewegung. Dabei wird das elektrische Potential eines Zentralions ϕ_i betrachtet. ϕ_i fällt bei Abschirmung durch die Ionenwolke mit schrittweiser Entfernung stark ab. Es ist durch folgenden Zusammenhang gegeben:

$$\phi_i = \frac{Z_i}{r} \cdot e^{\frac{-r}{r_D}} \quad \text{mit} \quad Z_i = \frac{z_i \cdot e_0}{4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \qquad \text{(Gl. 2.31)}$$

Einflußgrößen sind neben der Entfernung r die Debyesche Länge r_D, die den mittleren Abstand zwischen dem Zentralion i und den innersten Gegenionen in der assoziierten Wolke beschreibt. In den Zähler gehen neben der Zahl der Ladungen des Ions i, z_i, die Elementarladung e_0, die Dielektrizitätskonstante im Vakuum ε_0 und die relative Dielektrizitätskonstante des ionenfreien Lösungsmittels ε_r ein. Den von DEBYE und HÜCKEL (1923) angegebenen Ausdruck für r_D erhält man mit der heutigen Nomenklatur durch folgende Berechnung:

$$r_D = \sqrt{\frac{1}{k^2}} \quad \text{mit} \quad k^2 = \frac{4 \cdot \pi \cdot e_0^2}{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot k \cdot T} \sum n_i \cdot z_i^2 \qquad \text{(Gl. 2.32)}$$

Neben den bereits erwähnten Dielektrizitätskonstanten und der Zahl der Ionenladungen z_i gehen die Ionenzahlen pro cm^3 n_i, die Boltzmannkonstante k und die Temperatur T in die Berechnung der Debyeschen Länge ein. Es zeigt sich, dass die Dicke der Doppelschicht r_d durch die Debyesche Länge r_D abgeschätzt werden kann.

Eine wichtige Eigenschaft von Biopolymeren ist, dass ihre Gesamtladung vom pH-Wert der Lösung abhängen kann, wenn sie beispielsweise Carboxylgruppen tragen. Diese Seitengruppen werden bei Kontakt mit dem wässrigen Lösungmittel abhängig von dem aktuellen pH protoniert oder treten Protonen ab. Das hat zur Folge, dass die Gesamtladung des Biopolymers in sauren Lösungen durch Protonenanlagerung positiv, in basischen durch Protonenabgabe negativ wird. Aus diesem Zusammenhang heraus ergibt sich die Folgerung, dass für jedes betrachtete Biopolymer ein spezifischer pH-Wert existiert, an dem die Polymergesamtladung gleich null ist. Dieser Fall wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet.

Die hier beschriebenen Eigenschaften führen zu der Überlegung, dass bei experimentellen Untersuchungen ein deutlicher Unterschied zu erwarten ist in der Verhaltensweise von Biopolymeren, deren Gesamtladung stark vom pH abhängt, gegenüber Biopolymeren, deren Gesamtladung nur wenig von dem vorliegenden pH-Wert beeinflußt wird.

2.1.3 Chemisches Potential

2.1.3.1 Berechnung bei Lösungen

Bei den vorausgegangenen thermodynamischen Betrachtungen wurde die wichtige Größe des chemischen Potentials μ (für reine Phasen) bereits beschrieben. Es lässt sich bei bekannter freier Enthalpie ΔG_{mix} und Stoffmenge n_i der Komponente i über eine partielle Differentiation berechnen und stellt damit die partielle molare freie Enthalpie dieser Komponente dar. Flüssige, reale Lebensmittelsysteme liegen in der Regel als Ionenlösungen vor. Der Ausdruck für das chemische Potential ist deshalb so zu erweitern, dass die bei diesen Mischsystemen hinzukommenden Einflussgrößen berücksichtigt werden.

Wird als Ausgangspunkt eine Lösung ohne Wechselwirkungen, also ohne Ionen, herangezogen, so muss nur die Konzentration c_i (für die i-te Komponente) berücksichtigt werden. Als Beschreibung des chemischen Potentials μ_i erhält man in diesem Fall:

$$\mu_i = \mu_{i0} + R \cdot T \cdot \ln c_i \qquad \text{(Gl. 2.33)}$$

Dabei stellt μ_{i0} das chemische Potential der Komponente i, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur und c_i die Konzentration des Stoffes i dar. Da in realen Mischungen aber aufgrund des Ioneneinflusses Wechselwirkungen auftreten, muss die Konzentration der einzelnen Komponenten durch die jeweilige Konzentrationsaktivität a_i ersetzt werden:

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i \qquad \text{(Gl. 2.34)}$$

Die Konzentrationsaktivität a_i ergibt sich aus dem Produkt des Aktivitätskoeffizienten γ_i der Komponente i und ihrer Konzentration c_i. Eingesetzt in Gl. 2.33 erhält man somit folgenden Zusammenhang:

$$\mu_i = \mu_{i0} + R \cdot T \cdot \ln a_i = \mu_{i0} + R \cdot T \cdot \ln \gamma_i + R \cdot T \cdot \ln c_i \qquad \text{(Gl. 2.35)}$$

Unter der Voraussetzung, dass es sich um stark verdünnte Ionenlösungen handelt, kann folgender Ansatz als hinreichend genau zur Berechnung des Aktivitätskoeffizenten γ_i mit Hilfe der Debye-Hückel-Theorie angesehen werden:

$$\ln \gamma_i = \frac{-z_i^2 \cdot e_0^2}{8 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k \cdot T \cdot r_D} \qquad \text{(Gl. 2.36)}$$

Bei anziehenden Wechselwirkungen nimmt physikalisch gesehen die Arbeitsfähigkeit des Systems ab, γ_i zeigt dann Werte kleiner als 1.

2.1.3.2 Intermolekulare Betrachtungsweise: elektrochemisches Potential

Entlang und innerhalb von Strukturelementen, die in Biopolymerlösungen aufgebaut werden, können Mikrophasengrenzen auftreten. Hier beeinflussen sowohl chemische wie auch elektrostatische Mechanismen das Verhalten von Grenzschichtkomponenten. Zum Verständnis dieser Mechanismen verdeutlicht die DLVO-Theorie das Zusammenspiel von elektrostatischen und van-der-Waals-Kräften. An Hand des Sternmodells werden die Verhältnisse in der elektrostatischen Doppelschicht der Kolloidteilchen beschrieben. Zur thermodynamisch begründeten Betrachtung der Auswirkungen von Grenzschichtphänomenen stellt das chemische Potential eine Schlüsselkomponente dar, da es den Beitrag einzelner Komponenten zur freien Enthalpie beschreibt. Um ein vollständiges Bild bei der Interpretation der experimentellen Daten für das Verständnis der Prozesseinflüsse auf ablaufende thermodynamische Mechanismen im komplexen Mischsystem zu erhalten, ist bei der Betrachtung von elektrischen Doppelschichten auf intermolekularer Ebene noch eine weitere Einflussgröße auf das chemische Potential zu berücksichtigen. Die Bedeutung dieser physikalischen Größe liegt in den elektrostatischen Feldern, die von den einzelnen Komponenten im molekularen Maßstab aufgebaut werden können. In komplexen Polyelektrolytlösungen kann ihr Einfluss daher nicht vernachlässigt werden.

Besteht nun ein auf die Komponente i einwirkendes elektrisches Potential Θ_i, wie es bei Ionen der Fall ist, so muss es als weitere Einflussgröße auf das chemische Potential μ_i herangezogen werden. Dadurch erhält man für eine Ionenlösung auf Mol bezogen das sog. elektrochemische Potential μ^*_i:

$$\mu_i^* = \mu_{i0} + R \cdot T \cdot \ln a_i + z_i \cdot F \cdot \Theta_i \qquad \text{(Gl. 2.37)}$$

Zu dem ursprünglichen, stoffbezogenen chemischen Potential der Komponente i, μ_{iO}, wird daher neben einer Komponente, in die die Konzentrationsaktivität a_i eingeht, noch ein Term aus Faraday-Konstante, dem auf die Komponente i einwirkenden elektrischen Potential Θ_i und der Zahl ihrer Ladungen z_i addiert.

2.1.4 Anwendung der theoretischen Modelle

In Bezug auf die dargelegten theoretischen Zusammenhänge der Wechselwirkungen elektrischer Natur sind folgende Aspekte bei der Anwendung von Theorien zur Beschreibung des Mischungsverhaltens bei komplexen Systemen mit geladenen Teilchen von Bedeutung:

Für geladene Biopolymere ist eine direkte Anwendbarkeit beider Theorien – also die Berechnung der chemischen Potentiale μ_i nach EDMOND ET AL. (1968) oder nach dem Flory-Huggins-Ansatz nicht gegeben (FLORY, 1953). Um brauchbare Ergebnisse zu erzielen, müssten in die Berechnung von μ_i gemäß EDMOND ET AL. (1968) zumindest die Aktivitätskoeffizienten γ_i einbezogen werden. Bei der Flory-Huggins-Berechnung wäre eine Erweiterung des Wechselwirkungskoeffizienten χ_{ij} in jedem Fall notwendig:

$$\chi_{ij} = \chi_{ij,nicht-elektrisch} + \chi_{ij,elektrisch} \qquad \text{(Gl. 2.38)}$$

χ_{ij} ergibt sich demnach aus einer Erweiterung des nach Flory (1953) berechneten Wechselwirkungskoeffizienten $\chi_{ij,nicht\text{-}elektrisch}$ durch einen weiteren Term $\chi_{ij,elektrisch}$. Dieser Term stellt eine Funktion verschiedener elementarer physikalischer Stoffeigenschaften dar: $f(\varepsilon_r, \gamma_i, ...)$.

Dabei ist jedoch fraglich, ob hier diese Einflüsse überhaupt getrennt berechenbar sind. Auch ist nicht sehr wahrscheinlich, dass alle notwendigen Funktionsparameter unabhängig voneinander messbar sind. Selbst wenn man bei den angeführten Theorien bei den notwendigen weiteren theoretischen Überlegungen zu einer Lösung käme, bleiben bestimmte prinzipielle Schwierigkeiten immer bestehen. Da die Grundlage zur Verbesserung der beiden oben angegebenen Theorien die Debye-Hückel-Theorie bilden muss, sind insbesondere zwei Schwachpunkte dieser Theorie zu bedenken:

1.) Der Debye-Radius r_D bezieht sich auf kugelförmige Ionentypen. Polymerketten oder Makromoleküle mit verteilten Ladungen (wie bei Biopolymeren) werden in seine Berechnung nicht einbezogen.

2.) Die relative Dielektrizitätskonstante ε_r des reinen Lösungsmittels gibt nicht die dielektrischen Verhältnisse für die Feldbeeinflussung im molekularen Maßstab in der Nähe der Ionen wieder. Eine korrektere Messung ist jedoch in der Praxis kaum möglich. Die Anmerkung, dass diese Verhältnisse bei geladenen Biopolymeren noch um einiges komplizierter sind, bedarf keiner weiteren Diskussion.

Diese beiden genannten Schwächen haften prinzipiell auch der DLVO-Theorie an. Die etwas ausführlichere Darstellung der theoretischen Grundlagen bildet damit die Basis, um das Problemfeld abzustecken und dann die prinzipiellen Möglichkeiten für einen Lösungsansatz konkretisieren zu können. Die theoretischen Grundlagen zeigen grundsätzliche Mechanismen auf, wie beispielswei-

se die Beschreibung von Partikelwechselwirkungen als multifaktorielle Funktion verschiedener Einflussfaktoren. Gleichzeitig ergibt sich jedoch aus den Randbedingungen, welche die einzelnen theoretischen Ansätze fordern, dass ihre Anwendung nur zu qualitativen Aussagen führt.

Die thermodynamischen Grundlagen unterstreichen die Bedeutung der Prozessbedingungen. Für die Untersuchung ihres Einflusses auf Mischungen mit geladenen Biopolymersystemen ist jedoch aus den oben genannten Gründen keine vollständige Berechungsgrundlage gegeben. Auch schränkt die statistische Streuung realer komplexer Systeme und Herstellungsprozesse die Zielsetzungen entsprechend der Nikomachischen Ethik von Aristoteles ein, d.h. es wird keine größere Genauigkeit erstrebt, als es das Wesen des Gegenstandes zuläßt (KRISCHER ET AL., 1978; KESSLER, 1996). Die Erkenntnisse aus Modellsystemen können jedoch als Grundlage zur Beurteilung experimenteller Ergebnisse bei der Untersuchung komplexer, realer Mischungen herangezogen werden. Zudem lassen sich aus den Untersuchungsergebnissen von ähnlich aufgebauten komplexen Systemen oder Systemvariationen durch Vergleich des Verhaltens neue Erkenntnisse gewinnen. Die Versuchsbedingungen sind dabei so zu variieren, dass als Schnittmenge das ungeklärte Verhalten sichtbar wird. Es ist damit grundsätzlich ein Ansatz gegeben, um den Einfluss verschiedener thermodynamischer Bedingungen auch auf das Mischungsverhalten komplexer Biopolymersysteme herauszuarbeiten.

Im Folgenden sollen nun Messverfahren, auftretende Produktzustände und Sichtweisen des Biopolymerverhaltens unter Einbeziehung der gezeigten Grundlagen dargelegt werden.

2.1.5 Messtechnische Erfassung verschiedener Produktzustände von realen, komplexen Lebensmittelsystemen

Auf der Basis des bereits dargelegten theoretischen Hintergrundes lässt die Kenntnis des zweiten Virialkoeffizienten $A_{y,z}$ aus einer experimentellen Bestimmung nach Gl. 2.27 eine qualitative Differenzierung der auslösenden Mechanismen von Phasentrennungsphänomenen zu. Beispielsweise stehen positive Virialkoeffizienten für überwiegend abstoßende Wechselwirkungen zwischen beiden Polymeren (ANTONOV ET AL., 1979). Diese gegenseitige Abstoßung hat zur Folge, dass bei einer Konkurrenzsituation um Lösungsmittelmoleküle nicht alle Bereiche des Systemvolumens für die einzelnen Polymerstränge erreichbar sind (Abb. 2.8a; "excluded volume effect"). Wie bereits im Grundlagenteil in Kapitel 2.1.1 erläutert, wird zur Entropiesteigerung die Packungsdichte eines der beiden Polymere erhöht (Abb. 2.8b; "depletion flocculation"), damit die sonst eingeschlossenen Lösungsmittelmoleküle mehr Konformationsmöglichkeiten erlangen.

Assoziative Kräfte zwischen den Polymeren in einer Lösung würden dagegen zu einer Komplex-

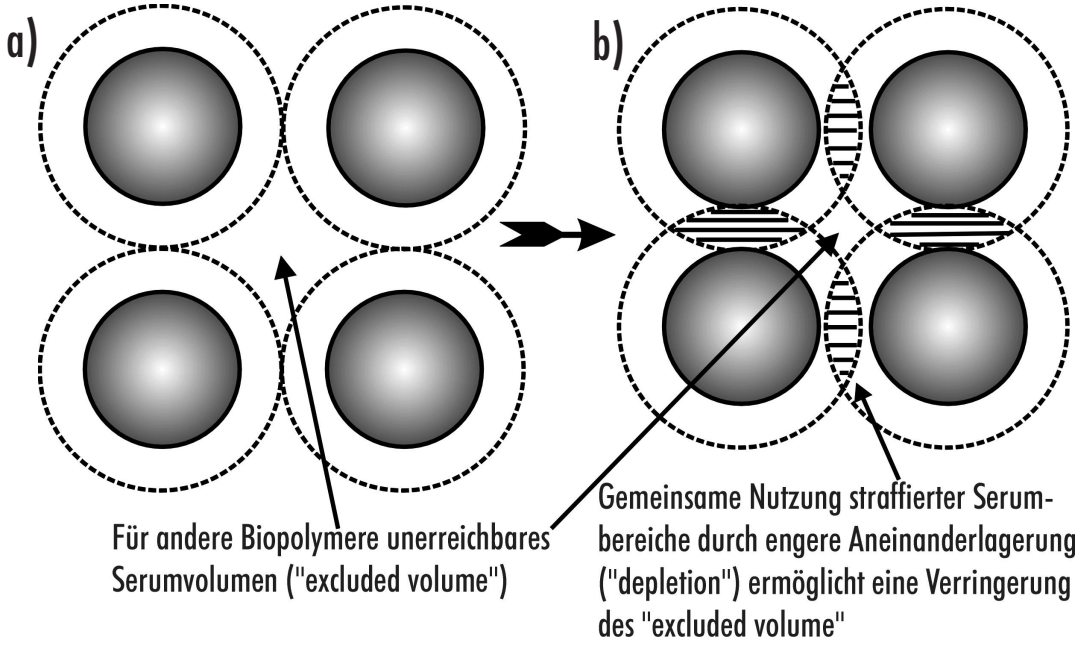

Abb. 2.8: Schematische Darstellung von a) "excluded volume" und b) Aneinanderlagerung ("depletion"), die in der Regel eine Flockenbildung zur Folge hat.

bildung führen und sich in einem negativen Wert des Virialkoeffizienten widerspiegeln (ANTONOV ET AL., 1999). Makroskopisch werden in diesem Zusammenhang bei wässrigen Mischungen zweier Polymere drei Fälle unterschieden (ALBERTSSON, 1971; SYRBE ET AL., 1998):

1.) Mischbarkeit: Das System zeigt eine homogene Phase.
2.) Komplexbildung mit Niederschlag: Das System zeigt zwei Phasen und beide Polymere liegen als Komplex in nur einer Phase vor ("complex coacervation").
3.) Inkompatibilität: Das System zeigt zwei Phasen, in denen jeweils getrennt eines der beiden Polymere vorliegt.

Abbildung 2.9 verdeutlicht die drei Fälle dieser Aufstellung. Wie bereits beim Hintergrund zum Flory-Huggins-Ansatz erwähnt, wird mit steigendem Molekulargewicht eine stärkere Tendenz zur Entmischung beobachtet (GRINDBERG ET AL., 1997). Da in realen Biopolymersystemen hohe Molekulargewichte die Regel sind, ist der erste Fall, das freiwillige Entstehen einer in sich homogenen Mischung, eher die Ausnahme.

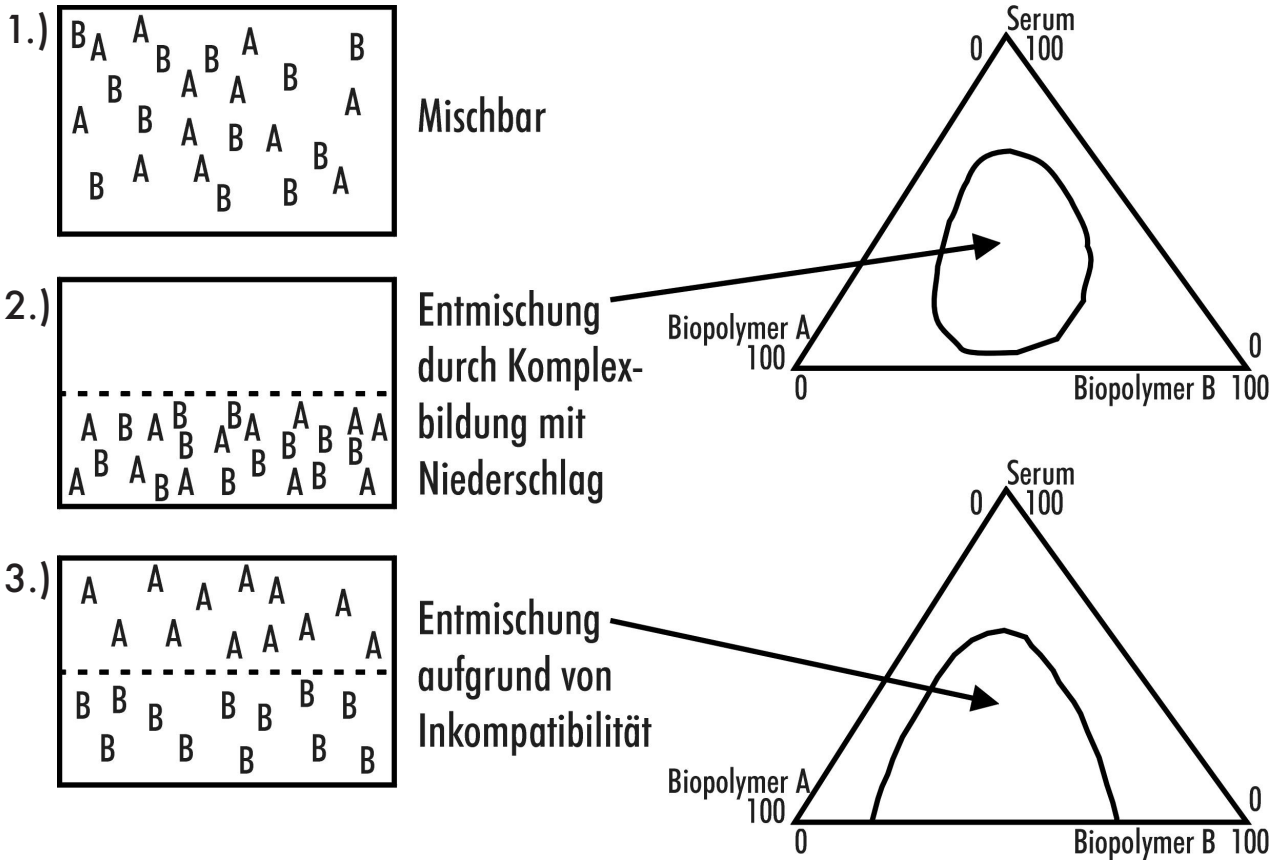

Abb. 2.9: Schematische Darstellung der möglichen makroskopischen Erscheinungsbilder von ternären Systemen mit zwei Biopolymeren. Rechts die entsprechenden Phasendiagramme.

Als Sonderfall ist das Vorliegen einer Mikrophasentrennung zu betrachten. Hier findet die Phasentrennung auf nur mikroskopischer Ebene statt. Es entstehen Mischstrukturen, welche lokale Konzentrations- und Dichteunterschiede aufweisen, die sich aber makroskopisch nicht bemerkbar machen. Das Mischsystem besitzt damit trotz einer grundsätzlichen Inkompatibilität der beteiligten Biopolymere eine makroskopisch einheitliche und stabile Struktur. Die Langzeitstabilität dieser Systeme ist jedoch für jeden Fall individuell einzuschätzen, da sich aufgrund der o.g. Konzentrations- und Dichtegradienten die metastabile Anordnung der Biopolymerkompeneten noch verschieben kann.

Bei sichtbarer Entmischung (Fälle 2 und 3) wird abhängig von der Phasenzusammensetzung zwischen einer Komplexbildung mit Niederschlag oder einer Inkompatibilität mit Trennung der Biopolymere in zwei Phasen unterschieden. Der zweite Virialkoeffizient A_{yz} hat dabei einen deutlichen Wertzuwachs erreicht, während die beiden zweiten Virialkoeffizienten (A_{yy} bzw. A_{zz}), welche die jeweilige Selbstassoziation der beiden Polymere beschreiben, relativ klein ausfallen. Im Idealfall ergibt sich damit ein differenziertes Phasendiagramm (Abb. 2.10). Diese Unterschiede messtechnisch mittels Lichtstreuung oder osmotischen Methoden in einer Qualität zu erfassen,

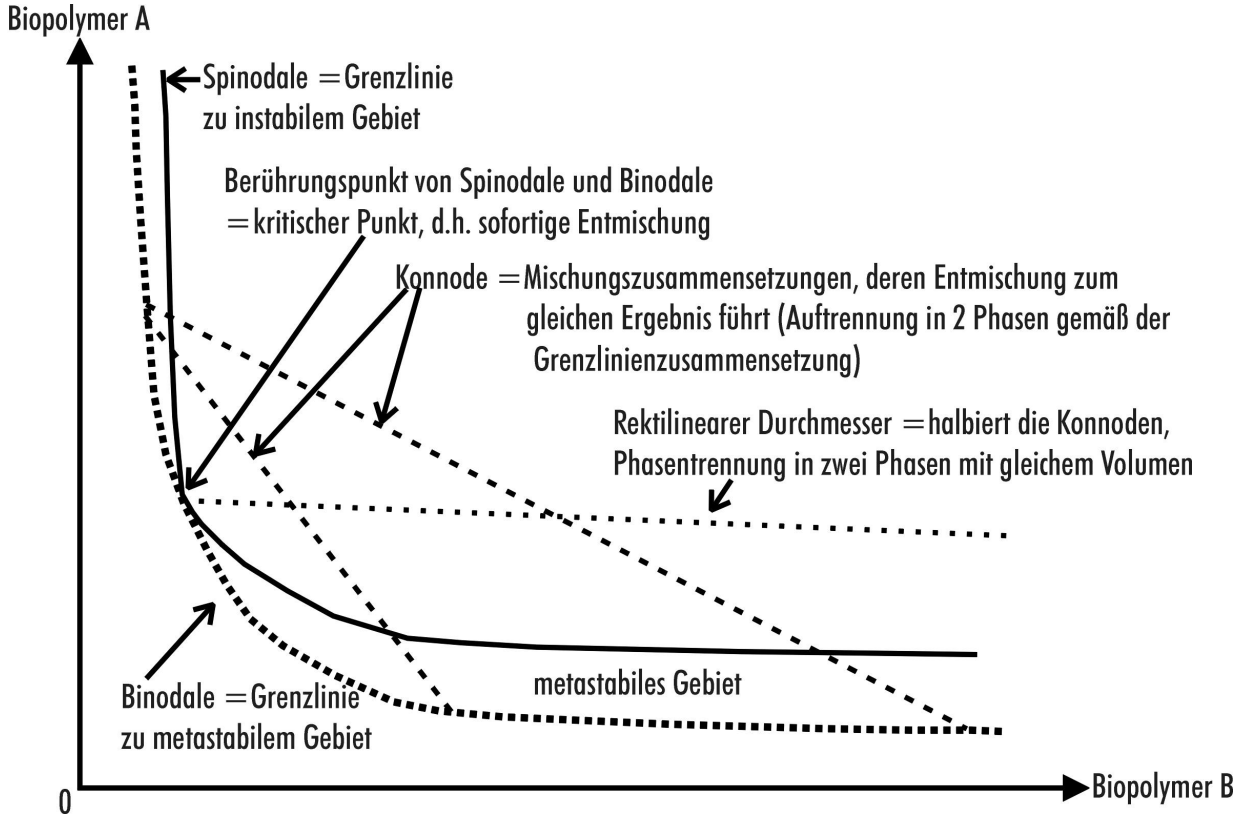

Abb. 2.10: Prinzipieller Aufbau eines Phasendiagramms für eine Biopolymermischung mit den Komponenten A und B.

dass sie reproduzierbar sind, stellt eines der größeren Probleme dar, so dass oft nur eine qualitative Beschreibung eines Phasendiagramms bevorzugt wird (Doublier et al., 2000). Abbildung 2.11 zeigt dies am Beispiel der Entwicklung von Inhomogenitäten aufgrund einer Komplexbildung zwischen den vorhandenen Biopolymeren.

Bei der Bestimmung des Übergangs von metastabilen zu instabilen Mischungen ist zu bedenken,

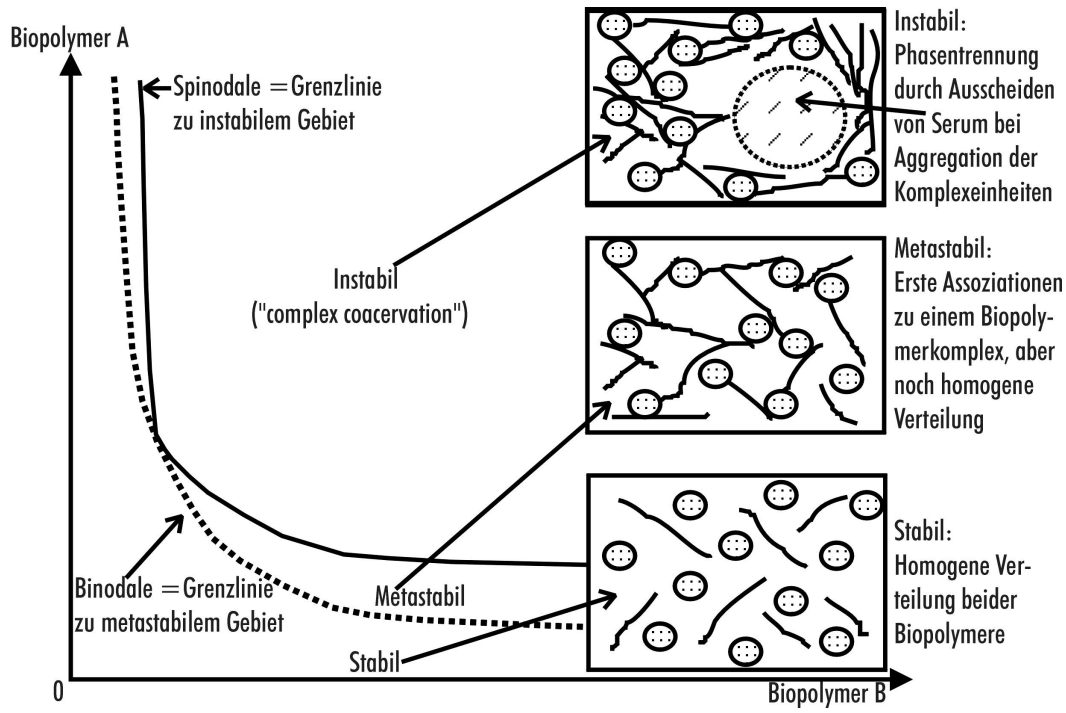

Abb. 2.11: Umsetzung der Entwicklung von Inhomogenitäten aufgrund einer Biopolymerkomplexbildung im Mischsystem in ein qualitatives Phasendiagramm.

dass in der Regel eine breite Polydispersität in der Molekulargewichtsverteilung der Inhaltsstoffe realer Lebensmittelsysteme unvermeidbar ist. Diese naturbedingte Vorgabe hat zur Konsequenz, dass bei der Bestimmung der zweiten Virialkoeffizienten die Streuung entsprechend verbreitert wird. Wissenschaftlich differenzierte und damit reproduzierbare Aussagen aus experimentellen Ergebnissen lassen sich daher nur innerhalb dieser stofflich bedingten Vorgaben ableiten. Ebenfalls unvermeidlich ist bei der Anwendung verschiedener Prozesseinflüsse ein bestimmtes Maß an applikationstechnisch bedingter Streuung. Damit prozessabhängige Änderungen auch wirklich erfasst werden können, ist daher die Abschätzung unabdingbar, welche Wiederholbarkeit die einzelnen Messmethoden erlauben. Die in der einschlägigen Fachliteratur veröffentlichten Phasendiagramme beruhen auf verschiedenen Messmethoden. Zu nennen sind hier:

1.) Direkte Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Phasen durch die Messung spezifischer chemischer oder physikalischer Eigenschaften der jeweiligen Biopolymere.
2.) Trübungsmessung zur Bestimmung des Übergangs zu einem inhomogenen, entmischten System.
3.) Messung des Phasenvolumens zur Ableitung der Phasengrenze nach der Phasenvolumenverhältnismethode nach Rehage et al. (1965).

Polyakov, Grinberg und Tolstoguzov (1980) evaluieren diese unterschiedlichen Ansätze auf ihre Anwendbarkeit bei wässrigen Mischungen verschiedener Eiweiße. Als Schwierigkeit erweist sich bei der Erstellung eines Phasendiagramms durch direkte Bestimmung der chemischen Zusammensetzung, wenn chemisch-physikalische Eigenschaften eines der beiden Biopolymere durch die Ähnlichkeit oder Dominanz des zweiten überdeckt werden. Dieser Punkt muss gerade bei Mischungen von Polysacchariden und Proteinen bedacht werden.

In diesen Biopolymermischungen führen schon sehr niedrige Polysaccharidkonzentrationen zu Entmischungserscheinungen, da Polysaccharide in der Regel ein sehr hohes Molekulargewicht besitzen. Bei einer Untersuchung der Phasenzusammensetzung liegen damit im Vergleich zu anderen Inhaltsstoffen hier nur sehr geringe Polysaccharidmengen vor. Damit wird der direkte Nachweis des Polysaccharidgehalts in einer Phase schwierig, vor allem wenn der Nachweis in einer Konkurrenzreaktion zu anderen Kohlenhydraten, wie z.B. niedermolekulare Zucker, durchgeführt werden muss. Die messtechnische Erfassung des Biopolymers ist damit oft aufgrund der Zusammensetzung realer Lebensmittel nicht möglich. Der Grund dafür soll an folgendem Beispiel verdeutlicht werden:

Eine direkte Bestimmung des Carrageenangehalts ist prinzipiell durch die Bildung eines photometrisch quantifizierbaren Farbkomplexes mit Anthrone möglich (Yaphe, 1960; Arsenault, 1965). Da die Bildungsstellen für diesen Farbkomplex jedoch auch bei niedermolekularen Kohlenhydraten vorhanden sind, stehen bei milchbasierten Systemen 0,03 % Carrageenan in Konkurrenz zu 4,6 % Lactose, was einen differenzierten Nachweis der Carrageenanmenge verhindert (Graham et al., 1963).

Als ein verbreitetes Messverfahren zur Bestimmung des Gehalts an Makromolekülen gilt auch die

Interpretation von osmotischen Messungen. Ihre Anwendung bei Polyelektrolyten, wie es die meisten Biopolymere darstellen, ist jedoch stark eingeschränkt, da für eine quantitative Interpretation der Messergebnisse der aktuelle Ladungszusstand dieser Makromoleküle bekannt sein muss (ATKINS, 1990). Dieser unterliegt jedoch dem Einfluss des pH-Werts und der realen Serumionenzusammensetzung. Letztere inkludiert auch mögliche Biopolymerkomplexe und stellt damit in der Realität einen Hinderungsgrund für differenzierte Messergebnisse dar. Schwierigkeiten verursachen einige Eigenschaften der Biopolymere selbst. Genannt sei hier neben der im Grundlagenteil bereits angesprochenen relativ breiten Molekulargewichtsverteilung von Biopolymeren auch deren Einfluss auf die Viskosität des Systems. POLYAKOV, GRINBERG und TOLSTOGUZOV (1980) sehen aus diesem Grund bei der Untersuchung ihrer proteinbasierten Mischsysteme von der Anwendung der Trübungsmethode ab und entscheiden sich für die Phasenvolumenverhältnismethode. Diese beruht auf der Messung des Phasenvolumens. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wird bei der Messung der Phasenvolumina die Verwendung eines horizontalen Mikroskops empfohlen (POLYAKOV ET AL., 1980). Die Beurteilung, ob Mischbarkeit oder heterogene Entmischung vorliegt, erfolgt vorher ebenfalls visuell per Mikroskop.

Bei einer visuellen Beurteilung lässt sich eine gewisse Subjektivität jedoch nicht vollständig vermeiden. LANGENDORFF, CUVELIER, MICHON, LAUNAY, PARKER und DE KRUIF (2000) ergänzen daher bei der Bestimmung des Phasendiagramms für iota-Carrageeenan-Casein-Mischungen die visuelle Beurteilung der einzelnen Punkte durch eine Ermittlung des Proteingehalts bzw. Carrageenangehalts durch Gelpermeationschromatographie. Dieses Vorgehen ist bei Carrageenansystemen jedoch nur bei höheren Temperaturen, wie z.B. 60 °C, möglich. Bei tieferen Temperaturen (z.B. 10 °C) liegen die meisten Carrageenansysteme als Gel vor. Eine getrennte direkte Untersuchung der Phasen ist dann nicht möglich. SCHORSCH, JONES und NORTON (2000) ergänzen daher eine visuelle Beurteilung mittels CLSM und Elektronenmikroskopie durch Trübungsmessungen und rheologische Messungen.

Der rheologische Ansatz stellt bei Hydrokolloidsystemen eine gute Möglichkeit zur Erfassung von Mikrophasentrennungen dar. Auch die Sensitivität ist bei dieser Messmethodik als sehr gut einzuschätzen, da selbst geringe Hydrokolloidmengen durch ihre Wechselwirkungen mit den übrigen Strukturelementen auch in komplexen, realen Mischsystemen große Auswirkungen in Bezug auf deren rheologische Eigenschaften zeigen. Gerade bei verdünnten Polymerlösungen kann man dadurch auch Verstärkereffekte über die im Hydrathüllenverband assoziierten Moleküle nutzen (WELCHNER, 1993). Dies ist ein Vorteil gegenüber Messverfahren, welche ausschließlich direkt auf die Erfassung der relativ geringen Einsatzmengen von Polysacchariden abzielen. Die Wiederholbarkeit von Messungen, welche die Antwort des gesamten Systemvolumens auswerten, ist gegenüber Methoden, die vom Antwortsignal eines gering dosierten Inhaltsstoffes abhängen, verbessert.

Rheologische Messmethoden nehmen die mechanischen Eigenschaften von Mischsystemen durch Messung der Kräfteverhältnisse bei der Wechselwirkung mit einem Messkörper auf (DE CARVALHO JUNIOR, 1986). Bei großer Auslenkung des Messkörpers wirkt die Messung zerstörend auf die Probenstruktur, es lassen sich so die Bedingungen für eine maximale Dehnung bis zum Auseinanderreißen von zusammenhängenden Strukturen bestimmen (Abb. 2.12). Durch oszillierende Messungen mit einer geringen Amplitude im linear-viskoelastischen Bereich des

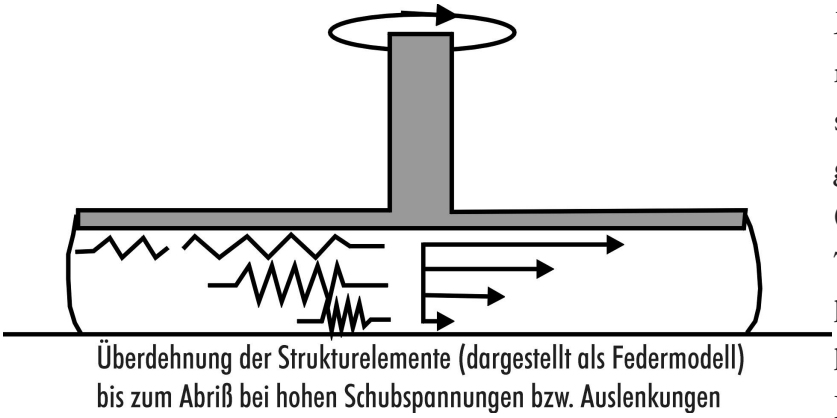

Abb. 2.12: Schubspannungsbelastung auf die Strukturelemente im Scherkraftgefälle bei rheologischen Messungen mit großer Auslenkung.

Mischsystems sind dagegen zerstörungsfreie Messungen des elastischen und viskosen Anteils im gesamten Systemvolumen möglich (Abb. 2.13). Liegen suspendierte Teilchen vor, so ist vom Einsatz kegelförmiger Messkörper abzusehen, "da der Meßspalt bei kleinen Radien für die in der Flüssigkeit suspendierten Teilchen zu klein wird" (SOMMER, 1974).

Aufgrund des physikalischen Hintergrunds rheologischer Messungen lässt sich der Übergang von unzusammenhängenden Biopolymerflocken zu einer kontinuierlichen, das ganze Volumen umfassenden Netzwerkstruktur gut als Phasenübergang zu einer homogenen Mikrostruktur definieren. Grundlage für die rheologische Erfassung dieses Phasenübergangs ist die Differenzierung des elastischen (G') und viskosen (G") Anteils des Biopolymersystems durch zerstörungsfreie oszillatorische Messungen. Der Phasenwinkel (δ) spiegelt das Verhältnis von elastischem und viskosem Anteil wider. Überwiegt der elastische Anteil, so wird das gesamte Systemvolumen von einer zusammenhängenden Gelstruktur durchzogen. Der Phasenübergang lässt sich daher gut über eine Messung des Winkels δ der Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Antwortschwingung beschreiben. Werte von $\delta < 45^\circ$ entsprechen einem Verhältnis von G' > G" und damit einer zusammenhängenden Gelstruktur (Abb. 2.14). Die Existenz der durchgehenden, zusammenhängenden Netzwerkstruktur verursacht den dominierenden elastischen Anteil in der rheologisch messbaren Antwort des Systems auf die oszillierende Schubspannungsbelastung. Der viskose Anteil beruht dagegen auf Bereichen, in denen ungebundenes, frei bewegliches Serum eingeschlossen ist.

Bei Werten von $45^\circ < \delta < 90^\circ$ deutet der in diesem Fall verminderte, aber vorhandene elastische Anteil auf die Existenz von Gelfragmenten im Sinne von Biopolymerflocken hin. Ihr Umfang nimmt mit steigenden Phasenwinkelbeträgen ab. Als Kriterium für die Phasengrenze zwischen durchgehender Netzwerkstruktur und unzusammenhängenden, zur Entmischung neigenden Gelflocken wird daher ein Phasenwinkel von 45° herangezogen.

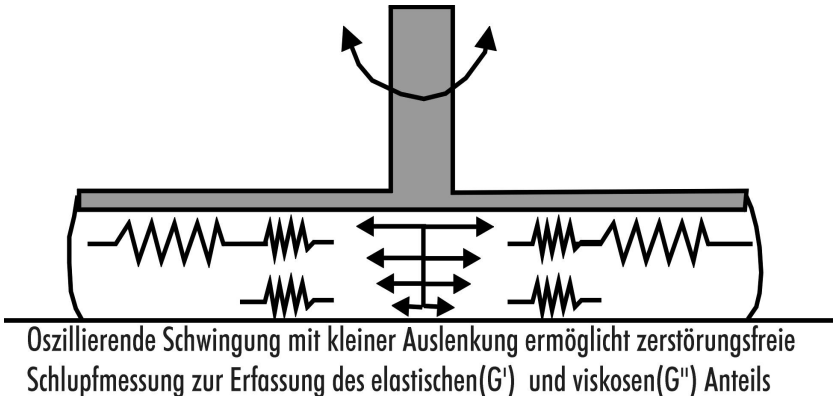

Abb. 2.13: Zerstörungsfreie Schubspannungsoszillation bei rheologischen Messungen mit kleiner Auslenkung.

Die Erfassung des Mikrostrukturaufbaus kann durch eine Frequenzspektrumsanalyse zur Bestimmung des Vernetzungsgrads der Biopolymerkomponenten ergänzt werden. Als Kriterium für den Vernetzungsgrad der Mischsystemstruktur wurde die Steigung von G' über der

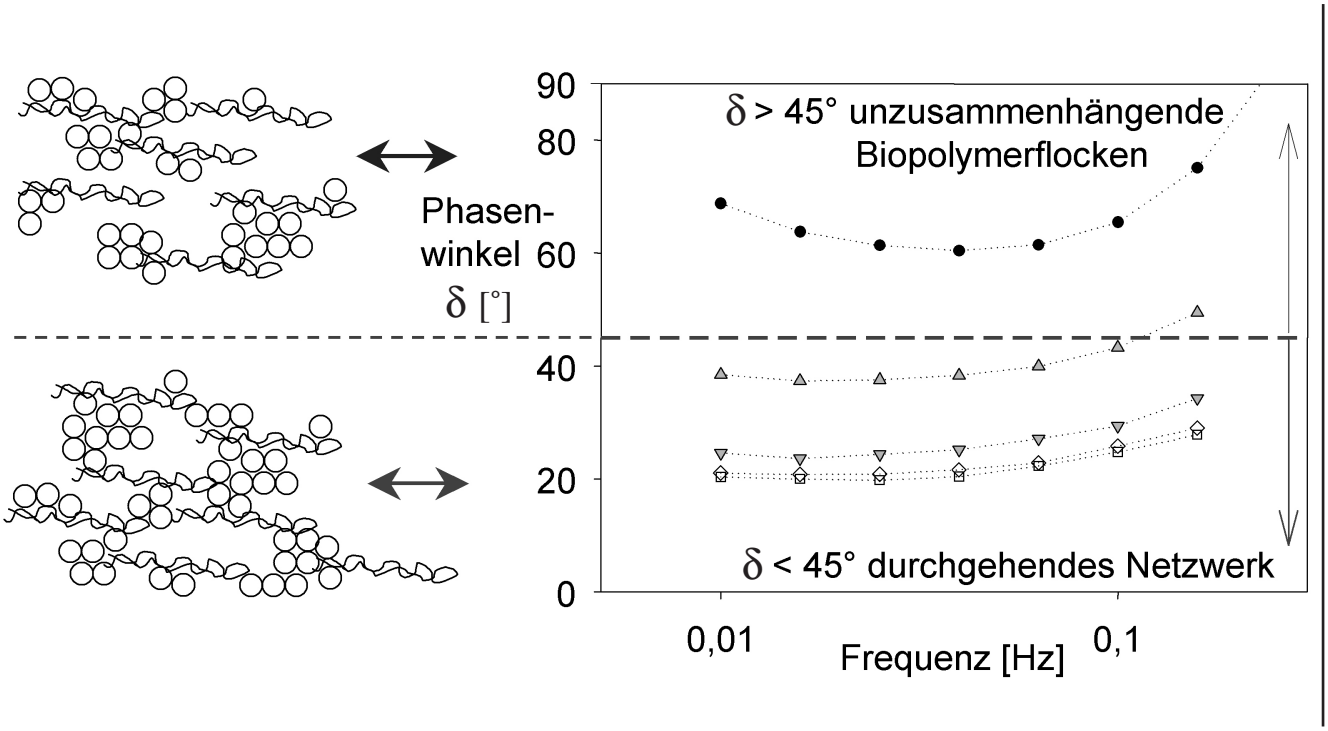

Abb. 2.14: Schematische Darstellung der Bestimmung des Übergangs zu durchgehenden Netzwerkstrukturen mittels oszillierenden rheologischen Messungen über die Bestimmung des Phasenwinkels δ.

Frequenz bei doppellogarithmischer Auftragung herangezogen. Die Abhängigkeit des elastischen Anteils von der Anregungsfrequenz basiert auf der Resonanzfrequenz der im System vorhandenen Einheiten assoziierter Inhaltsstoffe.

Liegen die Inhaltsstoffe unabhängig in der Mischung vor, d.h. mit einem niedrigen Vernetzungsgrad, so beruht die elastische Antwortschwingung bei einer bestimmten Frequenz nur auf den Inhaltsstoffen bzw. Einheiten, die hier eine Resonanzfrequenz besitzen. Damit ergibt sich eine deutlich höhere Abhängigkeit des elastischen Anteils vom jeweiligen Frequenzwert über dem aufgenommenen Frequenzbereich. Bestehen dagegen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Einheiten im Mischsystem, so ergibt sich eine gleichförmigere Antwort des elastischen Anteils auf Anregungsschwingungen bei den aufgenommenen verschiedenen Frequenzen. Entsprechend zeigt in diesem Fall G' eine geringere Abhängigkeit von der Frequenz (Abb. 2.15). Die Mikrostruktur des Mischsystems besitzt in einem solchen Fall einen höheren Vernetzungsgrad.

Das Antwortsignal der rheologischen Frequenzanalyse beruht auf dem mechanischen Zusammenspiel aller Struktureinheiten im Mischsystemvolumen auf die oszillierende Anregungskraft. Wird es über mehrere Frequenzdekaden aufgezeichnet, so ist es möglich, am Minimalwert des Phasenwinkels δ den elastischen Modulus G_{N0} zu bestimmen (Larson, 2003). Mit dieser rheologischen Größe kann man das Molekulargewicht aller mechanisch verbundenen Biopolymereinheiten wie folgt berechnen (Doi et al., 1986):

$$M_e = \frac{\rho \cdot R \cdot T}{G_{N0}} \qquad \text{(Gl. 2.39)}$$

M_e repräsentiert das Molekulargewicht aller miteinander verbundenen Molekülgruppen ("Verschlaufungsmolekulargewicht") und ergibt sich aus der Division des Produktes von Dichte ρ,

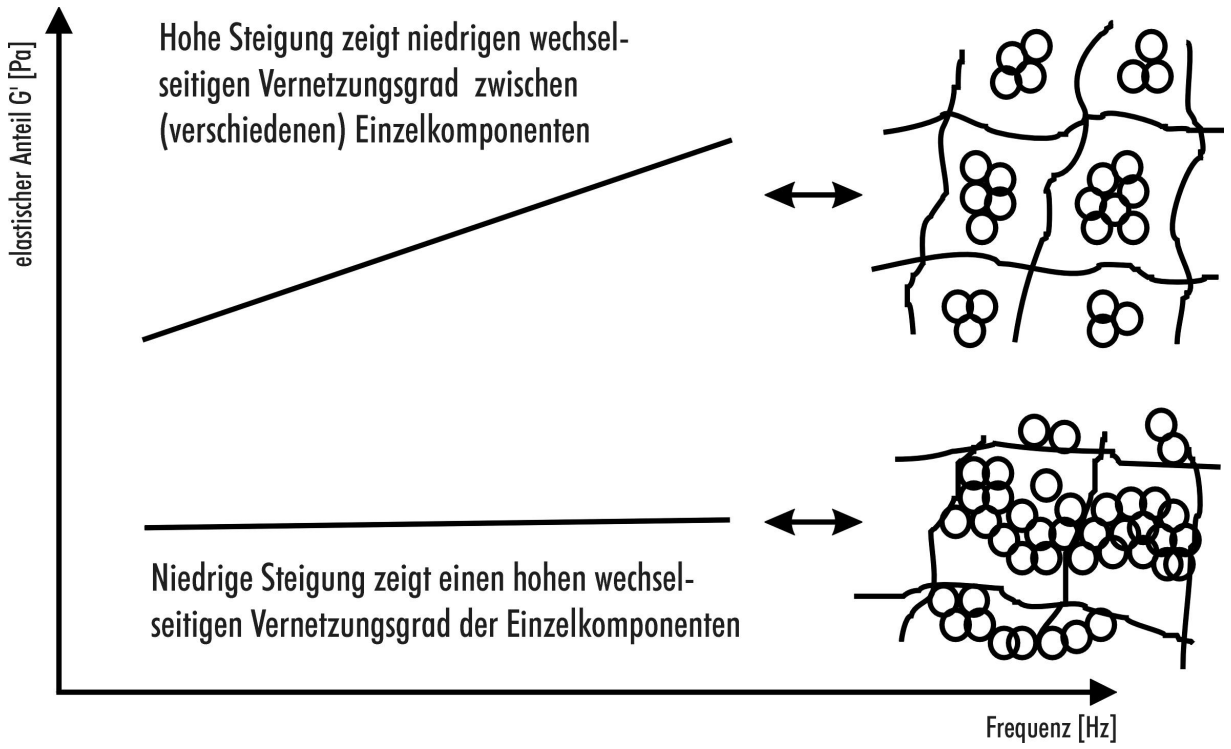

Abb. 2.15: Beispiele für die Ableitung unterschiedlicher Vernetzungsgrade aus einer rheologischen Frequenzanalyse.

allgemeiner Gaskonstante R und Temperatur T durch den elastischen Modulus G_{N0}. Das Kalkulationsverfahren ist zur Beschreibung von Anwendungen mit synthetischen Polymeren allgemein etabliert (FUCHS ET AL., 1996). Bei Biopolymermischungen ist jedoch die naturbedingte, breite Molekulargewichtsverteilung als Einschränkung zu werten. Zudem erfordert die Bestimmung von G_{N0} die Aufnahme eines sehr breiten Frequenzspektrums. Dies ist jedoch aus messtechnischen Gründen bei schwachen Biopolymermischstrukturen nicht immer realisierbar.

Aus der Berechnung des Verschlaufungsmolekulargewichts M_e ergibt sich die Möglichkeit, die Anzahl der Knickstellen in den Makromolekülen zu berechnen. Dies ist zur Beschreibung von Polymersystemen nach dem Flory-Huggins-Modell von Bedeutung. Die Grundlage dieser Modellvorstellung ist die Unterteilung der Aufenthaltsbereiche der Makromolekülketten in Röhrenabschnitte ("tubes"). Ein Röhrenabschnitt wird an seinen Enden jeweils durch eine Knickstelle im Aufenthaltsbereich der Molekülkette definiert (Abb. 2.16). Vereinfacht kann dies als Knickstelle im Aufbau der Makromolekülkette selbst gesehen werden. Durch dieses Verfahren wird in diesem theoretischen Ansatz die für die Entropie entscheidende Anzahl an möglichen Konformationen durch die Drehpunkte des Makromoleküls an den Knickstellen erfasst. Die Anzahl der Röhrenabschnitte Z wird aus dem Molekulargewicht M und dem Verschlaufungsmolekulargewicht M_e wie folgt berechnet (DOI ET AL., 1986):

$$Z = \frac{5}{4} \cdot \frac{M}{M_e} \qquad \text{(Gl. 2.40)}$$

Weiterführende Berechnungen von DOI und EDWARDS (1986) ergeben schließlich einen

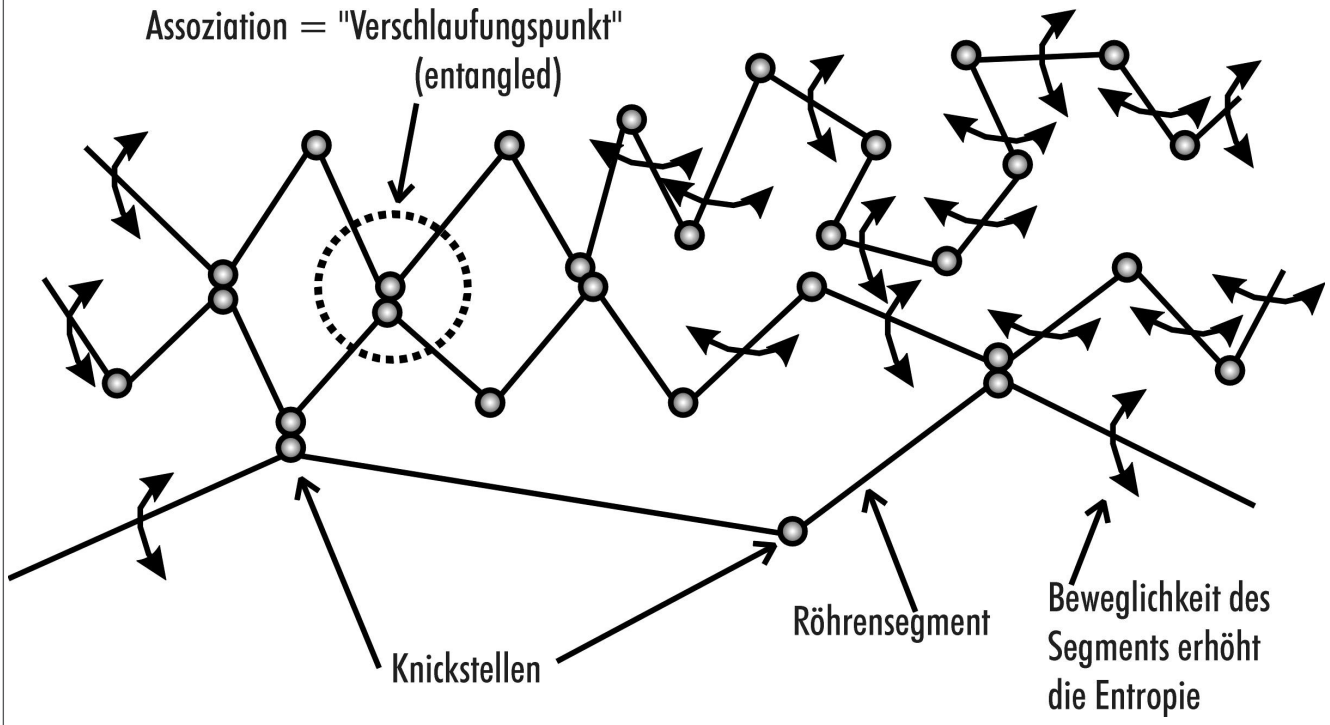

Abb. 2.16: Schematische Darstellung der Röhrensegmente gemäß dem Flory-Huggins-Modell.

Zusammenhang zwischen der Anzahl der Knickstellen im Röhrenmodell und den möglichen Konformationen der Kettenmoleküle. In Abbildung 2.16 ist die Beweglichkeit der einzelnen Segmente in verschiedene Konformationen mit Pfeilen angedeutet. Damit bedeutet eine Erhöhung der Knickstellen bei frei beweglichen Polymerlösungen immer auch eine Erhöhung der Entropie. Durch die Drehbewegung erhöht sich mit der Anzahl der Knickstellen in Polymerketten die Größe des dreidimensionalen Raumsegments im Systemvolumen, welches aufgrund der Brownschen Molekularbewegung vom Makromolekül durchstreift wird. Zur einfachen Vorstellung kann z.B. das scheibenförmige Luftsegment, dass bei einer schnellen Bewegung eines Propellers sichtbar wird, als übertragbare Analogie aus der makroskopischen Welt herangezogen werden. Für den Fall einer Netzwerkbildung steigt damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass zwei verschiedene Polymerketten während dieser Molekularschwingungen aufeinandertreffen und so eine assoziative Wechselwirkung zu einer gemeinsamen Netzwerkstruktur aufbauen können. Bei einer gemeinsamen Netzwerkstruktur gehen dann diese Assoziationspunkte als Begrenzungspunkte der Segmentabschnitte in die Anzahl der Knickstellen mit ein. Denkt man beispielsweise an die Konstruktion von Fachwerkhäusern oder älteren Eisenbahnbrücken, so sind damit auch Auswirkungen auf makroskopischer Ebene nachvollziehbar, wie z.B. eine Erhöhung der Netzwerkstabilität aufgrund der besseren Verteilung der Kräfte auf mehrere Punkte im Vergleich zu wenig verzweigten, geradlinigen Konstruktionen.

2.1.6 Geltypen und -aufbau

Klassifizierung von Mischgelen:

Bei Mischgelen, welche hauptsächlich aus zwei Biopolymeren aufgebaut sind, hat sich folgende Einteilung etabliert (MORRIS, 1985; ZSASYPKIN ET AL., 1997):

1.) Gefülltes Gel:
Bildet eine kontinuierliche Phase aus einem oder mehreren unabhängigen Biopolymernetzwerken und einer Füllung von dispergierten Teilchen (Abb. 2.17a).

2.) Gemischtes Gel:
Besteht aus zwei oder mehr sich durchdringenden Biopolymernetzwerken, welche nur topographisch in Wechselwirkung stehen, sich also durchdringen (Abb. 2.17b).

3.) Komplexes Mischgel:
Besteht aus Biopolymernetzwerken, welche auf direkten Wechselwirkungen zwischen mehreren Biopolymeren und daraus entstehenden, gemeinsam aufgebauten Strukturen beruhen (Abb. 2.17c).

a) Gefülltes Gel:
Entspricht einer Mikrophasentrennung aufgrund von Inkompatibilität. Ein Biopolymer bildet die Netzwerkstruktur, das zweite agiert als Füllstoff

b) Gemischtes Gel:
Beide Biopolymere bilden zwei unabhängige, sich einander durchdringende Netzwerkstrukturen

c) Komplexes Mischgel:
Eine raumausfüllende Netzwerkstruktur entsteht erst durch den Aufbau von Komplexen, an denen beide Biopolymere beteiligt sind

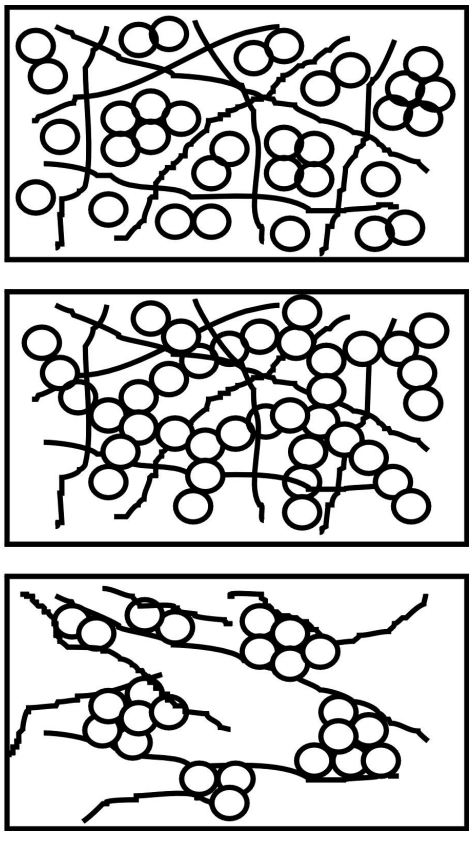

Abb. 2.17: Schematische Darstellung des Aufbaus verschiedener Mischgeltypen.

Allgemeinere Definitionen bezeichnen Gele als Stoffe mit einem Zustand zwischen Flüssigkeiten und Festkörpern (TANAKA, 1981; PLOCK, 1994). Nach der Form der beteiligten Baueinheiten können Strang- und Partikelgele als zwei Haupttypen gegenübergestellt und in 4 Gruppen differenziert werden (KONING ET AL., 1992):

1.) stark geordnete, lamellenartige Struktur --> Stranggele
2.) ungeordnete, kovalent verknüpfte Netzwerke
3.) ungeordnete Netzwerke aufgrund physikalisch bedingter Aggregation
4.) partikelhaltige, ungeordnete Strukturen --> Partikelgele

Die gegenüberliegenden Endpunkte der obigen Aufstellung bilden damit die Formen der Strang- bzw. Partikelgele (Abb. 2.18). Während Stranggele räumlich orientierte Netzwerke mit hohem Wasserbindungsvermögen darstellen und damit meist transparent sind (Abb. 2.18a), erscheinen Partikelgele als Koagulatstrukturen aufgrund von Dichteschwankungen milchig trüb (Abb. 2.18b; PLOCK, 1994).

Der Wachstumsprozess der Aggregation von Partikeln zu einer Koagulatstruktur kann mit Hilfe der Fraktaltheorie beschrieben werden (KENNEL, 1994). Denn aufgrund von Diffusions- bzw. Temperaturgradienten am Aggregationszentrum lagern sich Cluster bevorzugt an lokalen Inhomogenitäten an, so dass sich statt einem amorphen Klumpen Verästelungen mit Spitzen bilden (GERTHSEN ET AL., 1993). Dies hat unter anderem auch zur Konsequenz, daß mit der Gesamtgröße der Partikelcluster die Dichte abnimmt, d.h. die Struktur wird offener (WALSTRA, 2003). Bei Biopolymermischungen ist dieser Aspekt im Zusammenhang mit der Interaktionsfläche und dem Hydrathüllenumfang von Partikelclustern, die beispielsweise in Caseinsystemen auftreten können, zu beachten. Die zunehmende Lockerung der Strukturelemente mit steigender Größe fördert die Diffusion und Interaktion von weiteren Mischsystemelementen. Neben Diffusionsvorgängen können in fraktalbasierten Aggregationsmodellen damit auch die Auswirkungen verschiedener interpartikulärer Wechselwirkungen berücksichtigt werden (KENNEL, 1994).

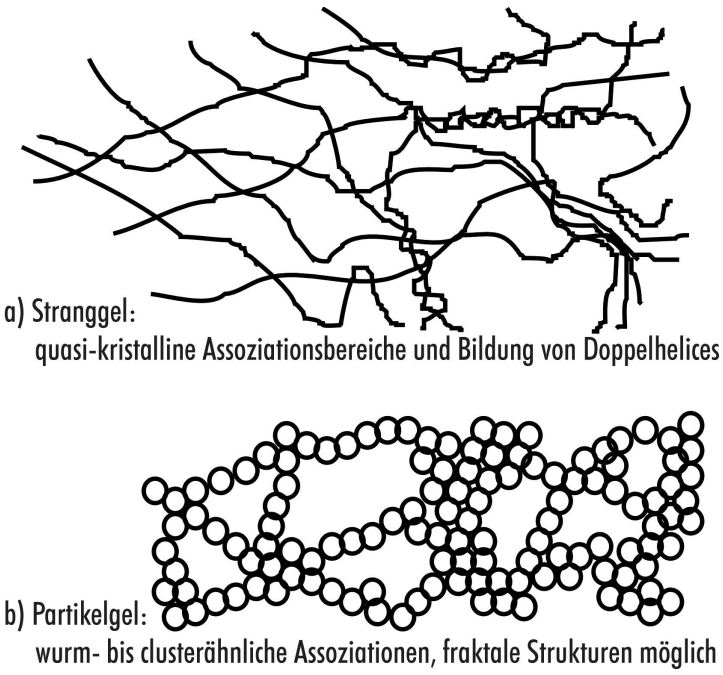

Abb. 2.18: Schematische Darstellung von Strang- bzw. Partikelgelen.

Interpartikuläre Wechselwirkungen werden aufgrund ihrer zugrundeliegenden Mechanismen wie folgt differenziert (Walstra, 2003):

1.) Kovalente Bindungen
2.) Coulombsche und elektrostatisch induzierte Wechselwirkungen
3.) Wasserstoffbrückenbindungen
4.) Hydrophobe Wechselwirkungen

Die Stärke der Wechselwirkungen nimmt mit ansteigender Aufzählungsnummer ab. Aufbauend auf dem physikalischen Hintergrund der vorangegangen Abschnitte, sollen an dieser Stelle die wichtigsten Aspekte verschiedener Wechselwirkungen im Hinblick auf den Strukturaufbau in Mischgelen zusammengefasst werden.

Bei der stärksten zwischenmolekularen Wechselwirkung, der kovalenten Bindung, entstehen irreversible Komplexe. Die Bildung dieser Struktureinheiten steht meist in Zusammenhang mit den Prozessbedingungen. Ein bekanntes Beispiel in Protein-Polysaccharidsystemen ist die Bildung einer kovalenten Amidgruppe durch chemische Reaktion einer Aminogruppe des Proteins mit einer Carboxylgruppe des Polysaccharids (STAINSBY, 1980). Bei Milchproteinen ist die Bildung von Disulfidbrücken bei der Denaturierung von Molkenproteinen und ihrer Komplexierung mit Caseinmicellen von großer Bedeutung (KIRCHMEIER ET AL., 1985; DANNENBERG & KESSLER, 1988).

Coulombsche und elektrostatisch induzierte Wechselwirkungen beruhen auf der Anziehungskraft zwischen ionischen Seitengruppen der Makromoleküle. Wie im physikalischen Grundlagenteil bereits dargestellt, werden reversible Komplexe zum Ladungsausgleich gebildet. Die Lage dieser Komplexe und die Stärke der Wechselwirkungen kann die Architektur der Mikrostruktur in Gelen stark beeinflussen. Unter anderem schränken benachbarte Bereiche mit hoher Ladungsdichte und gleicher Ladungsart die Drehbarkeit einer Polymerkette im Raum stark ein, da starke Abstossungskräfte bestehen.

Wasserstoffbrückenbindungen werden bevorzugt mit sinkenden Temperaturen aufgebaut (WALSTRA, 2003). Dies liegt in der eingeschränkten Brownschen Molekularbewegung bei tiefen Temperaturen. Dadurch können sich dipolkettenähnliche Ladungspaare innerhalb einer Brückenbindung, welche auch Serummoleküle einschließt, fixieren. Eine Voraussetzung für die Ausrichtung dieser Wechselwirkung ist eine induzierte positive Partialladung eines Wasserstoffatoms durch ein benachbartes, stark elektrophiles Atom, wie z.B. Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel (BRAUDO ET AL., 1993). Die Anordnung von Seitengruppen, welche ein solches Atom enthalten, kann sich aus diesen Gründen stark auf die Kompatibilität von Makromolekülen auswirken, da durch sie ein Partialladungsmuster erzeugt werden kann, was ähnlich wie bei einem Puzzle eine Annäherung bzw. temperaturabhängige, reversible Komplexbildung ermöglichen kann. Weitere Details zum physikalischen Hintergrund von Dipolsystemen wurden bereits im vorangegangenen Kapitel behandelt. Im Zusammenhang mit der Rolle dieser Wechselwirkungen beim Aufbau von Gelstrukturen muss noch auf ihren Beitrag zur Bildung und Stabilität von Protein-Polysaccharidkomplexen während der Kühllagerung hingewiesen werden (SCHMITT ET AL., 1998).

Auch hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle für die Komplexbildung zwischen Biopolymeren (SCHMITT ET AL., 1998). Sie stehen im engen Zusammenhang mit dem thermodynamischen Verhalten bei verdünnten Mischsystemen, da die Entropie des Systems durch die Bildung von hydrophoben Wechselwirkungen stark beeinflusst werden kann, wie bereits angemerkt wurde. Im Gegensatz zu den Wasserstoffbrückenbindungen nehmen hydrophobe Wechselwirkungen prinzipiell mit steigender Temperatur zu (WALSTRA, 2003). Ein Grund liegt in der temperaturabhängigen Zunahme der Intensität der Brownschen Molekularbewegung, mit der Konsequenz, dass auch die Anzahl möglicher Anordnungen für die einzelnen Lösungsmittelmoleküle steigt. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten für die Verkleinerung exponierter hydrophober Oberflächen, wie beispielsweise durch Assoziation gegenüberliegender hydrophober Gruppen.

Wie bereits dargelegt, ist dies im Sinne einer Entropiemaximierung positiv, da die Verkleinerung kristallin-ähnlicher Segmente im Lösungsmittel, wie sie vor exponierten hydrophoben Oberflächen entstehen, einen großen Entropiezuwachs bedeutet (SCHMITT ET AL., 1998; SINGH ET AL., 1998; WALSTRA, 2003). Sie spielen daher eine große Rolle im Neuarrangement von Lösungsmittelteilchen, ein Vorgang, der bei verdünnten Systemen starke Auswirkungen auf die Exposition von hydrophoben Abschnitten von Makromolekülen hat (STAINSBY, 1980; TOLSTOGUZOV, 1986; SAMANT ET AL., 1993; TOLSTOGUZOV, 1997).

Die Basis für das Auftreten dieser verschiedenen Wechselwirkungen bildet der molekulare Aufbau der am Gelaufbau beteiligten Mischungspartner. Für Biopolymere bedeutet dies, dass abhängig von ihrem makromolekularen Aufbau ein spezifisches Muster von Abschnitten mit der Basis für verschiedene Wechselwirkungen entsteht. Dieses Muster kann im übertragenen Sinne wie ein "Fingerabdruck" gesehen werden, der jedes Makromolekül mit verschiedenen funktionellen Gruppen kennzeichnet. Das Muster beruht jedoch nicht auf lauter gleichstarken und damit gleichberechtigten Arten von Wechselwirkungen. So werden sicher stärkere Wechselwirkungen, wie z.B. elektrostatische Bindungen, bestimmte Bereiche im Makromolekül gegenüber schwächeren, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, dominieren. Andererseits können verschiedene thermodynamische Verhältnisse dazu führen, dass sich schwächere Wechselwirkungen aufgrund ihrer Anzahl und Funktion durchsetzen. Als Beispiel sei hier der Einfluss von hydrophoben Wechselwirkungen auf die Entropie genannt. Die verschiedenen Wechselwirkungen bilden damit die Grundlage für den Aufbau von durchgehenden Netzwerkstrukturen. Das Zusammenspiel der einzelnen unterschiedlichen Wechselwirkungen ergibt den spezifischen Aufbau von Mikrostrukturen mit ihren jeweiligen makroskopisch sichtbaren Eigenschaften. Dabei besteht auch die Möglichkeit, dass trotz einer Phasentrennung auf mikroskopischem Level eine makroskopisch stabile Struktur aufgebaut wird. Ein Beispiel hierfür wäre die Gelierung eines Mischsystems, bevor eine Mikrophasentrennung zu einer Entmischung führen kann. Der Aufbau gemeinsamer Netzwerkstrukturen kann damit eine Stabilisierung von mikrophasengetrennten Systemen bedeuten. Für eine Langzeitstabilität gilt für diesen Mechanismus jedoch zusätzlich, dass Umlagerungen in der Mikroebene aufgrund von lokalen Dichte- bzw. Konzentrationsgradienten entsprechend langsam oder ohne effektive Auswirkungen auf die Gesamtstruktur ablaufen.

In den folgenden Kapiteln soll das Ineinandergreifen von Wechselwirkungen und Mikrostruktur anhand konkreter, in dieser Arbeit auch experimentell verwendeter Mischsysteme erläutert werden.

2.2 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Milch

Milch stellt eine sehr komplexe Mischung natürlichen Ursprungs dar, da in dieser Kombination Inhaltsstoffe als Emulsion, kolloidale Suspension und echte Lösung vorliegen und zu einem Mischsystem vereint werden (Abb. 2.19). Der Anteil, den die Hauptbestandteile in Milch ausmachen, ist in Tabelle 2.1 aufgelistet (Jenness et al. , 1967).

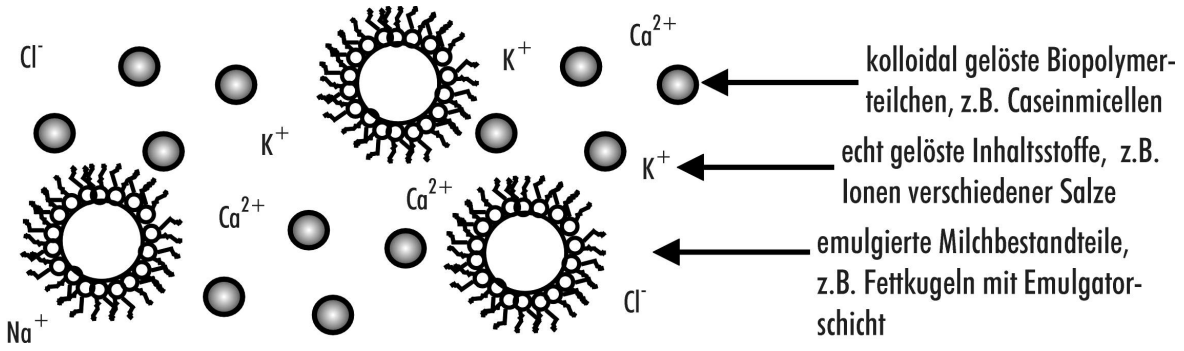

Abb. 2.19: Milch als komplexes Mischsystem mit emulgierten, collodial dispergierten und echt gelösten Bestandteilen

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Kuhmilch (Jennes et al., 1967)

Lösungsmittelmatrix	emulgierte Stoffe	kolloidal dispergierte Stoffe	gelöste Stoffe
Wasser 86-88 %	Milchfett 3-5 %	Caseine 2,8 %	Kohlenhydrate 4-5 %
	Phospholipide 0,3 %	Molkenproteine 0,61 %	Mineralstoffe 0,877 %
	Sterine 0,1 %		wasserlösliche Vitamine 0,0019 ‰
	fettlösliche Vitamine <0,003 ‰		

Wasser bildet mit einem Anteil von 86-88 % den Hauptinhaltsstoff und die Lösungsmittelmatrix, in der die übrigen Bestandteile meist in verdünnter Form vorliegen. Eine Ausnahme bilden einige Salzgleichgewichtssysteme, die übersättigt vorliegen und auf die später noch gesondert eingegangen wird. Abhängig von Rasse, Laktationszeitpunkt und weiteren Faktoren schwankt der Milchfettgehalt in der Regel in einem Bereich von 3 bis 5 % und macht damit neben Phospholipiden (0,3 %), Sterinen (0,1 %) und fettlöslichen Vitaminen (<0,003 ‰) den Hauptbestandteil der emulgierten Stoffe aus. In kolloidaler Dispersion liegen Milchproteine vor. Sie werden in zwei Hauptfraktionen unterschieden: Caseine (2,8 %) und Molkenproteine (0,61 %). Letztere dienen der Immunisierung des Kalbes und umfassen verschiedene Albumine und Globuline. Den größten Anteil stellen dabei ß-Lactoglobulin (0,3 %) und α-Lactalbumin (0,07 %). Auf besondere chemische und technologische Eigenschaften der Proteine wird später noch im Detail eingegangen. Bei Stoffen, die in echter Lösung vorliegen, können drei Hauptfraktionen unterschieden werden: Kohlenhydrate (4-5 %), wasserlösliche Vitamine (0,0019 ‰) und Mineralstoffe (0,877 %). Dabei gilt bei der Fraktion "Mineralstoffe" einschränkend, dass abhängig von der Löslichkeitskonstante in Fällen einer Übersättigung die anorganischen und organischen

Ionen und Salze z.T. auch in kolloidaler Dispersion vorliegen können (KIERMEIER ET AL., 1973).

Eine umfassende Beschreibung aller chemisch-physikalischen Eigenschaften würde den Rahmen dieser Arbeit jedoch bei weitem übersteigen. Für ein vollständiges Bild wird daher auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen (WALSTRA ET AL., 1984). Im Folgenden werden verschiedene für das Verständnis dieser Arbeit relevante Aspekte herausgegriffen.

Die Lösungsmittelmatrix, die ja gleichzeitig den Hauptbestandteil des Mischsystems darstellt, bildet die Grundlage für die in dieser Arbeit untersuchten Mischsysteme. Im physikalischen Grundlagenteil wurde bereits auf die Auswirkungen von geladenen Stoffen auf die Anordnung der Serummoleküle hingewiesen. Daher verdienen die 8-9 g/L anorganischen und organischen Ionen und Salzsysteme im Mischsystem "Milch" ein besondere Aufmerksamkeit. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang das Gleichgewicht zwischen echt gelöster und colloidal suspendierter Form von Calcium- bzw. Magnesiumphosphat. Da der Gehalt von gelöstem Calciumphosphat in Milch bereits der Sättigungsgrenze entspricht, liegt ein höherer Calciumphosphatgehalt nur in kolloidalen Teilchen vor, welche bei normalen Bedingungen (pH=6,8) in Assoziationen mit Caseinen stehen. Dieses Gleichgewicht hat zur Folge, dass sich Veränderungen der Caseinmicellen immer auch auf die Serumionenzusammensetzung auswirken können. Gleichzeitig ist zu beachten, dass das Löslichkeitsgleichgewicht grundsätzlich temperaturabhängig ist. Im Fall von Calciumphosphat sind zudem Auswirkungen auf die Puffersysteme der Milch bzw. den pH-Wert zu berücksichtigen, da das Phosphatanion sich zusätzlich im Gleichgewicht mit Hydrogenphosphat befindet. Der pH-Wert und die Serumzusammensetzung von Milch beruhen insgesamt noch auf weiteren ineinandergreifenden Gleichgewichtssystemen (z.B. Citrate). Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Löslichkeitskonstanten dieser Ionengleichgewichte führt das Zusammenspiel der einzelnen Salzsysteme zu einer nicht-linearen Abhängigkeit der Lage verschiedener chemischer Gleichgewichte in Milchsystemen auch von der Temperatur (Abb. 2.20; KIRCHMEIER, 1987). Als konkretes Beispiel sei hier die Gleichgewichtskonstante für den Übergang von gelöstem zu kolloidal dispergiertem Calcium angeführt. Während bei einer Temperatur von 20 °C das Verhältnis zwischen kolloidalem und gelöstem Calciumanteil 46 zu 33 beträgt, so verschiebt es sich bei einer Temperaturerhöhung auf 50 °C auf 62 zu 15. Entsprechend steigt die Gleichgewichtskonstante von 1,4 auf 4,1 . Damit erniedrigt sich die Konzentrationsschwelle, ab der eine Übersättigung an gelösten Calciumionen eintritt, mit der Folge, dass der Anteil an kolloidalem Calcium ansteigt (Abb.2.20; Kirchmeier, 1982 & 1987).

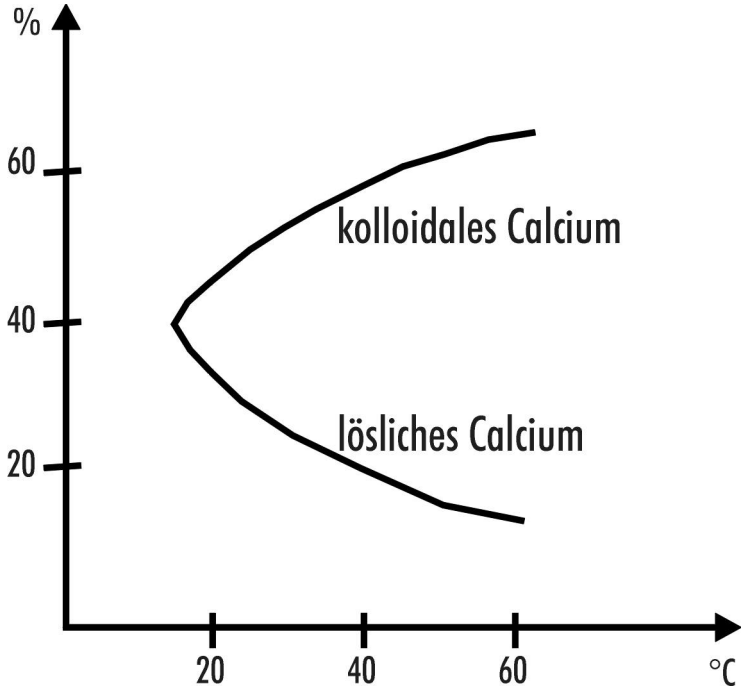

Abb. 2.20: Temperatureinfluss auf das Gleichgewicht zwischen kolloidalem und gelöstem Calcium (KIRCHMEIER, 1987).

Für ein vollständiges Bild dieser

Aspekte zur Serumzusammensetzung sind noch einige Details zu der Biopolymerhauptfraktion in Milch, den Caseinen, zu nennen:

Caseine

Caseine bilden im neutralen pH Micellen. Sie liegen in einer bimodalen Partikelgrößenverteilung vor, mit Peaks bei 90 bzw. 180 nm (Hui, 1993). Inklusive Hydrathülle können als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser 230 nm angenommen werden. Für den inneren Micellenaufbau (Abb. 2.21) werden verschiedene Modelle propagiert, wie zum einen das Submicellenmodell nach SCHMIDT bzw. WALSTRA (1990) oder das Caseinmodell nach HOLT (1992) bzw. HORNE (1998). Allen Modellen ist gemeinsam, dass kolloidale Calciumphosphateinheiten als Kristallisationspunkte im Micelleninneren integriert sind. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die bereits genannten Salzgleichgewichte verwiesen.

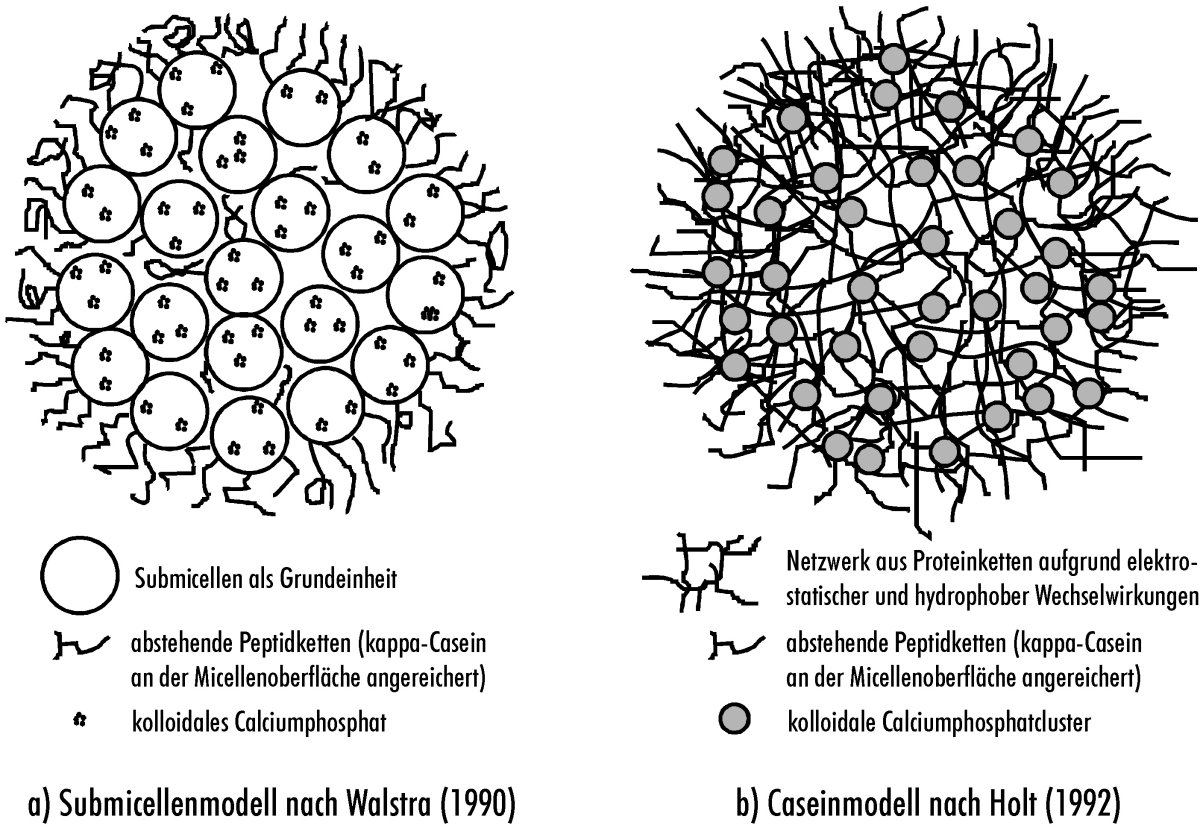

Abb. 2.21: Modellvorstellungen des Caseinmicellenaufbaus nach WALSTRA (1990) und HOLT (1992).

Der Zusammenhalt der micellaren Struktur beruht auf hydrophoben Assoziationen und elektrostatischen Wechselwirkungen geladener Seitengruppen der verschiedenen Caseintypen. Zu nennen sind hier α_S-Casein, ß-Casein und κ-Casein. Da relativ große Molekülabschnitte von α- und ß-Caseinen aus hydrophoben Aminosäuren bestehen, sind diese eher im Micelleninneren angereichert. Das κ-Caseinmolekül besteht dagegen aus einem hydrophoben und hydrophilen Teil. Es übernimmt daher auch eine Schnittstellenfunktion zum Serum, das die Micelle umgibt. Da es im neutralen pH-Bereich eine negative Gesamtladung trägt, stoßen sich die nicht in der Micellenstruktur integrierten Teile des k-Caseins gegenseitig ab und ragen ähnlich einer haarigen Schicht von der kugelförmigen Micelle in den Raum. Dadurch verhindern sie sterisch eine Aneinanderlagerung und Aggregation mit benachbarten Micellen (Abb. 2.22).

Bei Säuerung des Milchsystems wird ab einem pH-Wert unter 4,9 der Bereich der isoelektrischen Punkte der einzelnen Caseintypen erreicht. Aufgrund fehlender elektrostatischer Wechselwirkungen löst sich die Micellenstruktur dann teilweise auf, so dass unregelmässig geformte Proteinpartikel entstehen. Dabei geht auch die haarige κ-Caseinaußenhülle verloren, so dass Aggregationen zu größeren Proteinclustereinheiten nicht mehr zu vermeiden sind. (Abb 2.23).

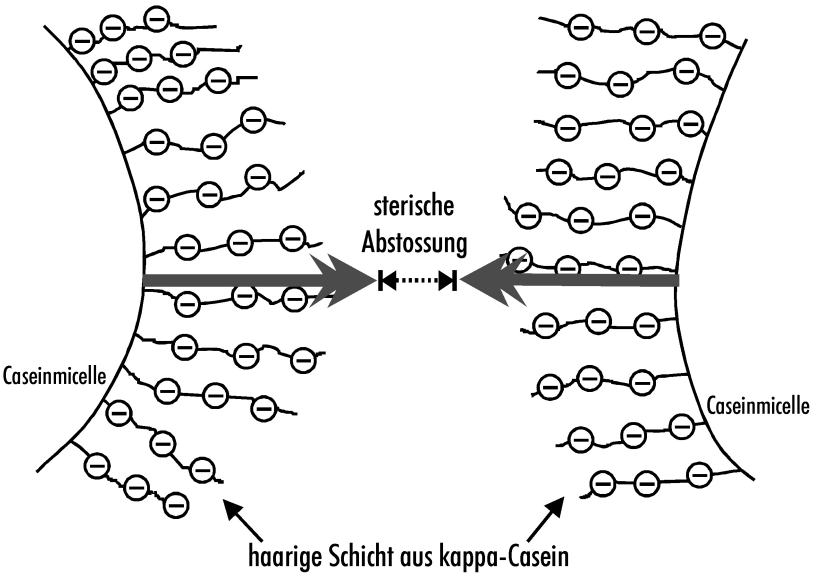

Abb. 2.22: Schematische Darstellung der sterischen Caseinmicellenstabilisierung durch κ-Casein (modifiziert nach DE KRUIF, 1999).

Molkenproteine

Eine technologisch bedeutsame Eigenschaft der Molkenproteine liegt in ihrem Denaturierungsverhalten. Als im nativen Zustand globuläre Proteine unterliegen sie bei Temperaturen ab 60 °C aufwärts einem Konformationswechsel und falten ihre Struktur auf. Dies ermöglicht bisher im Inneren verborgenen SH-Gruppen, neue kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) mit benachbarten Biopolymeren zu schließen. Auch bisher verborgene hydrophobe Seitengruppen der Aminosäurenkette müssen sich nach der Auffaltung neue Assoziationspartner suchen.

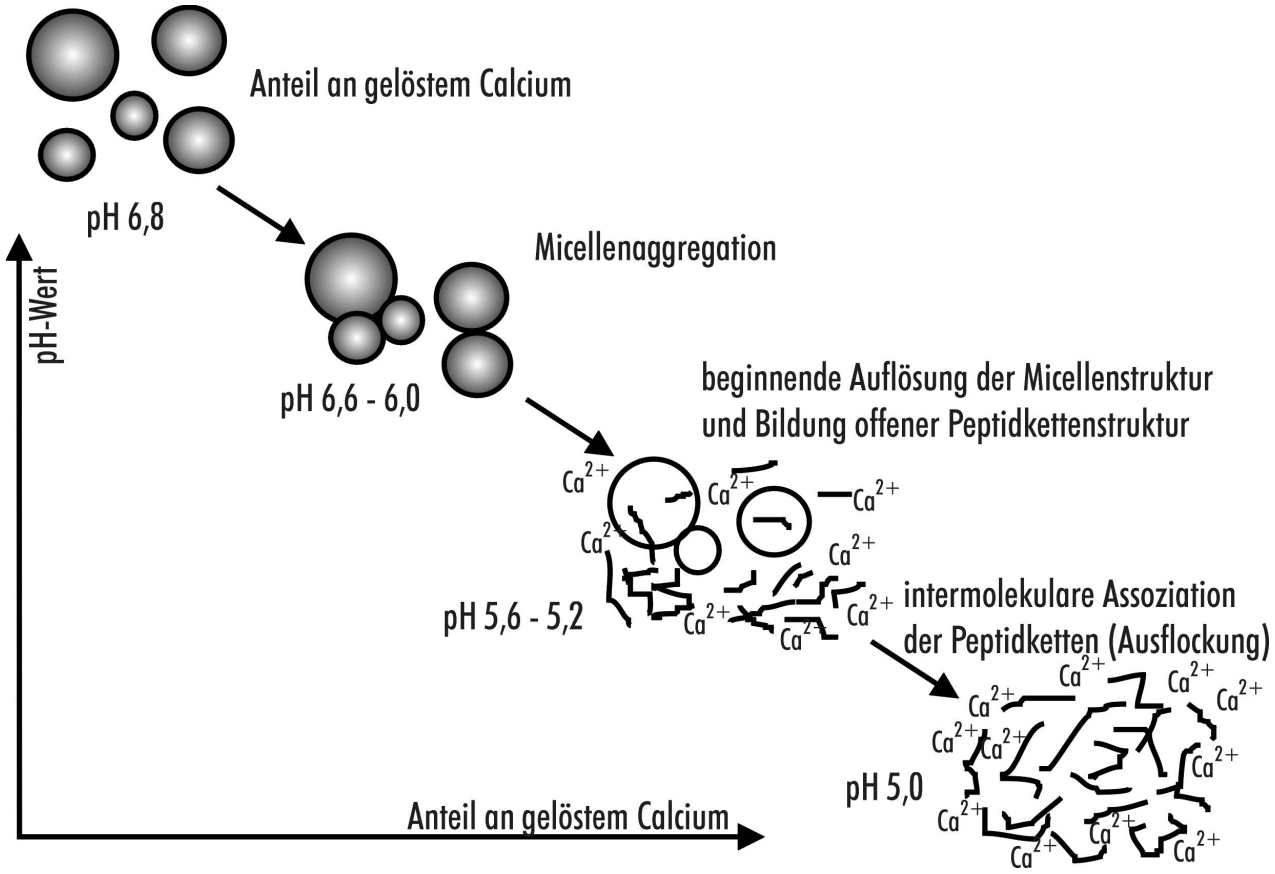

Abb. 2.23: Einfluss des pH-Werts auf die Caseinmakrostruktur (modifiziert nach KIRCHMEIER, 1987).

Abhängig von Erhitzungs- und Milieubedingungen werden daher Komplexe mit Caseinen und anderen Molkenproteinketten aufgebaut, wie in verschiedenen Arbeiten im Detail untersucht wurde (El-Shobery, 1983; Dannenberg et al., 1988; Beyer, 1990; Kennel, 1994; Plock, 1994; Spiegel, 1999).

Casein-Molkenproteinkomplexe

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Biopolymerkomplexe kovalent gebundener, denaturierter Molkenproteine an der Caseinmicellenoberfläche (Abb. 2.24). Das Ladungsmuster und der Anteil hydrophober Oberflächenabschnitte wird dadurch verändert. Aber auch der Zusammenhalt der Proteinpartikel bei Säuerung des Milchsystems wird positiv beeinflusst, eine Funktionalität, die sich beispielsweise bei Joghurtsystemen in einer höheren Gelfestigkeit bemerkbar macht (Klupsch, 1984; Dannenberg, 1986). Weitere Details zu prozessinduzierten Veränderungen in Milchproteinsystemen werden im Kapitel 2.5 "Auswirkungen thermischer und mechanischer Verfahrensschritte auf Biopolymere" behandelt.

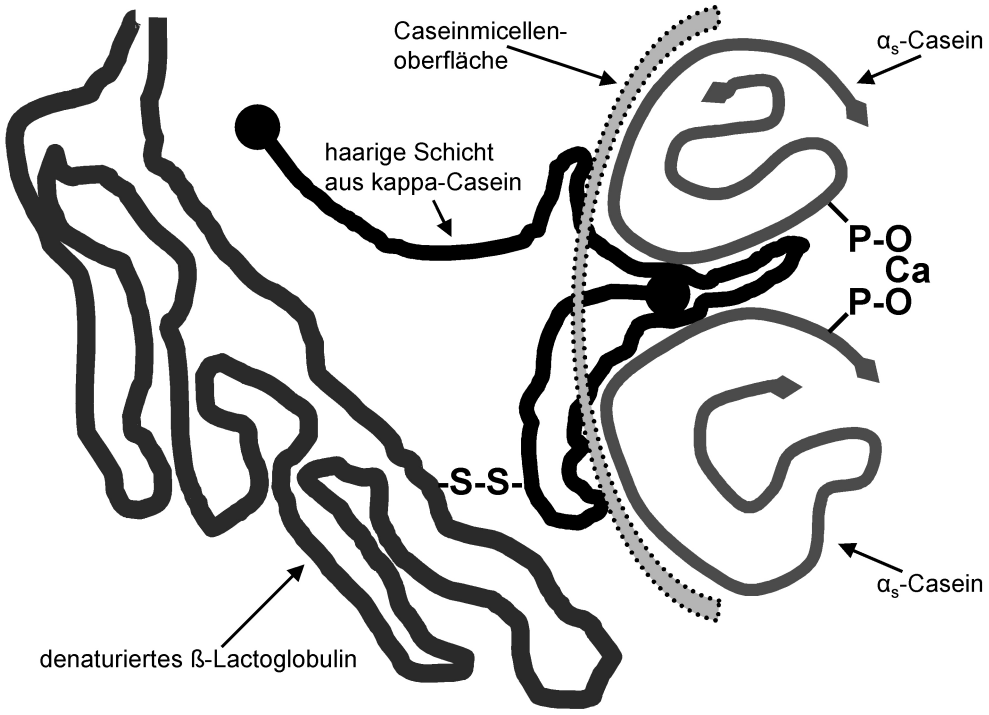

Abb. 2.24: Schematische Darstellung von Biopolymerkomplexen aus denaturierten Molkenproteinen an Caseinmicellenoberflächen (Kirchmeier, 1987).

2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Carrageenan

2.3.1 Aufbau und Typen

Der Begriff „Carrageenan“ wird als Gruppenbezeichnung für sulphatisierte Galactane aus Rhodophyceae verwendet. Diese anionischen Polysaccharide werden von der Rotalge je nach Wachstumsstadium und Art als verschiedene Carrageenantypen synthetisiert, um dem pflanzlichen Organismus in Abhängigkeit von den Milieubedingungen optimale Stoffwechselbedingungen und Stabilität zu verleihen. Mit der Verwendung griechischer Buchstaben als Bezeichnung für verschiedene idealisierte Disaccharideinheiten durch REES (1972) wurde eine weit verbreitete Nomenklatur zur Beschreibung der wichtigsten Carrageenantypen etabliert. Besonders erwähnenswert sind die Formen μ, ν und λ, aus denen unter alkalischen Bedingungen κ-, ι- und τ-Carrageenan entstehen (FALSHAW ET AL., 2001). Abbildung 2.25 zeigt diese Reaktion zwischen C6 und C3 anhand der jeweils entsprechenden Strukturformeln.

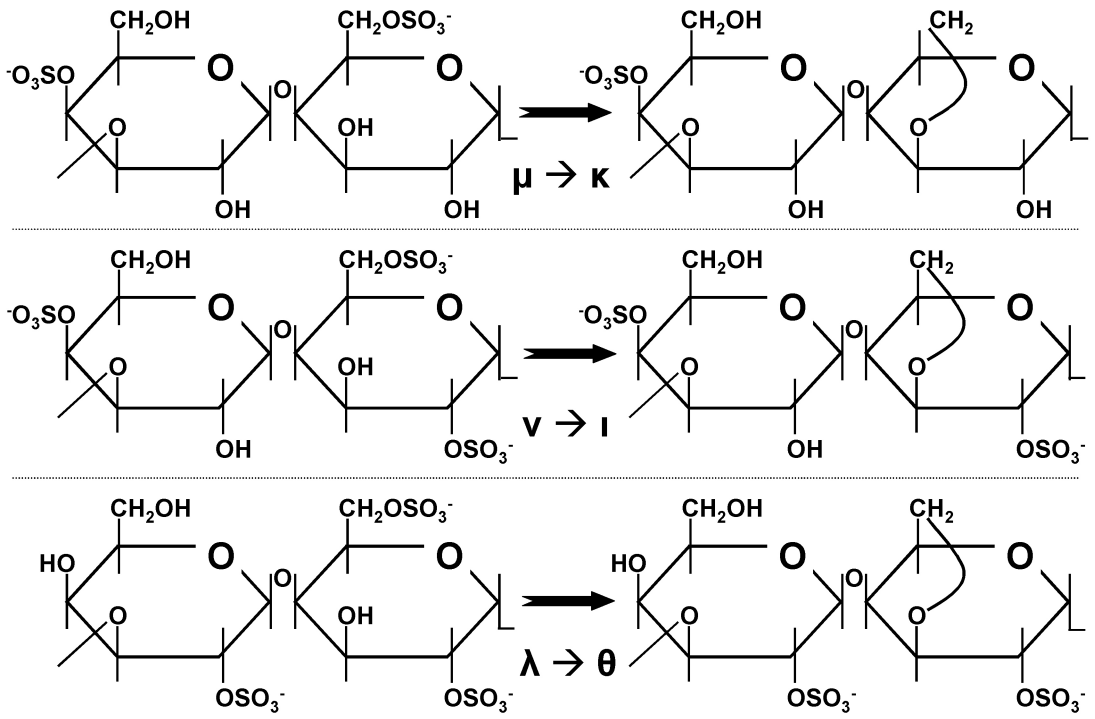

Abb. 2.25: Disaccharidgrundeinheiten von Carrageenantypen (FALSHAW ET AL., 2001).

Da die an Sulphatgruppen beteiligten Elemente eine hohe Elektronegativität aufweisen, bewirkt diese funktionelle Gruppe eine hohe Partialladungsdichte in den Bereichen, an denen sie im Makromolekül angeordnet ist. Aufgrund der elektrostatischen Abstossung von gleichgeladenen Kettenabschnitten vermindern sich die Anordnungsmöglichkeiten mit steigender Sulphatgruppenanzahl pro Disaccharidgrundeinheit.

Dies macht sich beispielsweise in der unterschiedlichen Fähigkeit der einzelnen Carrageenan-

typen zu einer Konformationsänderung von ungeordneten Knäueln hin zu geordneten Helixstrukturen (Coil-Helix-Übergang) bemerkbar. Der Coil-Helix-Übergang ist schematisch in Abbildung 2.26 gezeigt und kann bei Abkühlung von Carrageenanlösungen auftreten. Grundsätzlich bedeutet eine Ausbildung geordneter Helices eine Erhöhung der Ladungsdichte durch die engere Anordnung der Sulphatgruppen. Ob dieses Phänomen auftritt, hängt jedoch von der Ionenzusammensetzung des Serums und dem Carrageenantyp ab. Beispielsweise findet bei λ-Carrageenan bei Abkühlung kein Wechsel der Makromolekülform von ungeordneten Knäueln zu Helices statt. Der Grund hierfür liegt im Aufbau der λ-Carrageenangrundeinheit (Abb. 2.25). Mit einer Anzahl von drei Sulphatgruppen pro Grundeinheit liegt der mittlere Abstand zwischen den Sulphatgruppen bereits unter 0,4 nm; damit kann die bereits in der Knäuelform vorhandene hohe Ladungsdichte nicht mehr weiter erhöht werden (LANGENDORFF ET AL., 2000).

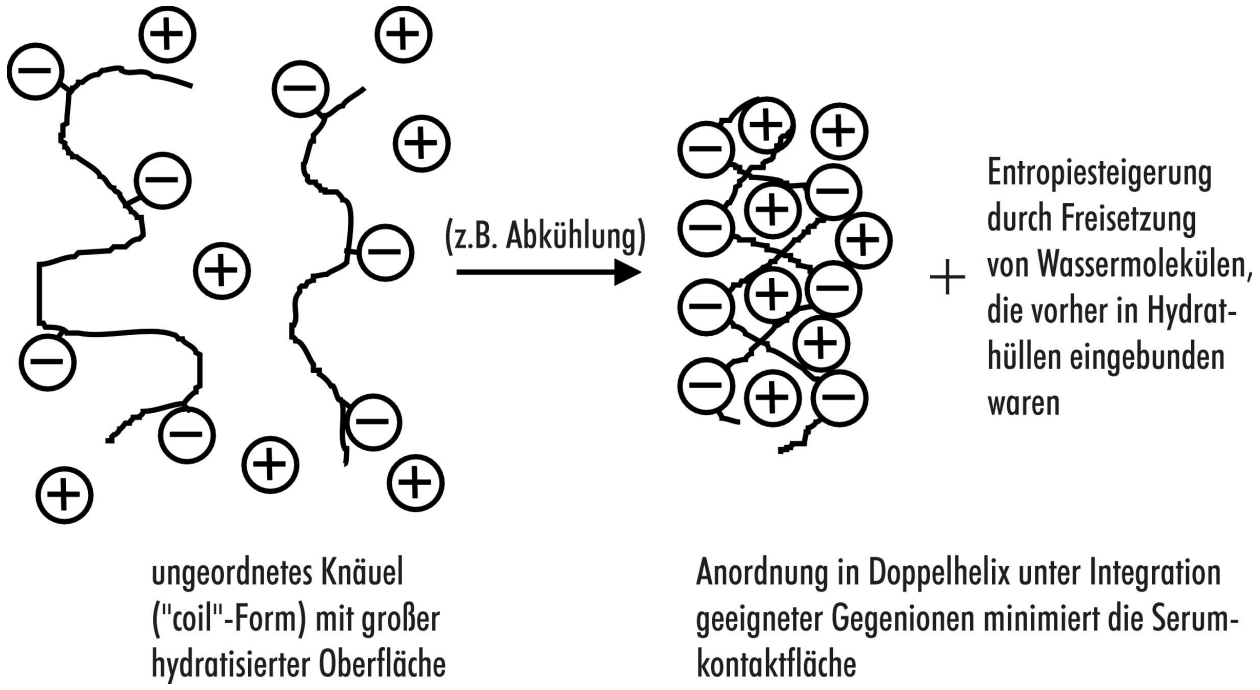

Abb. 2.26.: Schematische Darstellung des Coil-Helix-Übergangs bei Polysacchariden.

Bei κ-Carrageenan (eine Sulphatgruppe pro Grundeinheit) bzw. bei dem ι-Typ mit zwei Sulphatgruppen pro Grundeinheit wird diese geringe Distanz von 0,4 nm aufgrund der geringeren Sulphatfrequenz in der Knäuelform jedoch noch nicht erreicht (Abb. 2.25). Dadurch ist es diesen Carrageenantypen möglich, bei niedrigen Temperaturen (z.B. κ <40 °C; ι <50 °C) die thermodynamisch günstigere Helixform einzunehmen, da bei κ- und ι-Carrageenan die Sulphatanionen erst in der Helixanordnung einen mittleren Abstand unter 0,4 nm erreichen. κ- und ι-Carrageenan besitzen damit im Gegensatz zu λ-Carrageenan die Fähigkeit, durchgehende Netzwerkstrukturen aus Helixsträngen auszubilden.

Auch der Gelaufbau und seine Eigenschaften werden durch die unterschiedliche Ladungsdichte von κ- bzw. ι- Carrageenan geprägt. Die Ladungsdichte ergibt sich aus dem Partialladungsmuster im Makromolekül, welches das Zusammenspiel von Carrageenantyp und seinen Gegenionen bestimmt. Die Anordnung der Sulphatgruppen in den Doppelhelices aus ι-Carrageenan fördert eine Assoziation von Calciumionen, es bilden sich damit im Vergleich zu anderen

Carrageenantypen relativ weiche Gele aus. Bei κ-Carrageenan lagern sich die Doppelhelices zusätzlich unter Vermittlung von Kaliumionen zu Doppelhelixaggregaten aneinander (Domain-Modell nach MORRIS ET AL., 1980; Abb. 2.27). Kaliumionen sind für den Aufbau dieser Mikrostruktur mit hoher Gelstärke, aber sprödem Bruchverhalten besonders geeignet, da sie aufgrund ihrer gegenüber Natriumionen etwas geringeren Ladungsdichte (Hydratationsenergie von K^+: 356 kJ/mol statt 419 kJ/mol bei Na^+; SCHEFFER ET AL., 1992) auch einen etwas geringeren Hydrathüllendurchmesser aufbauen und damit der hydrodynamische Durchmesser klein genug ist, um innerhalb der κ-Carrageenanhelixaggregate den elektrostatischen Ausgleich der Polyanionen vorzunehmen.

Zur Feinabstimmung der Textur von Gelsystemen stehen damit zwei Carrageenantypen zur Verfügung, die den sensorischen Bereich zwischen hart-spröde bis weichschmelzend abdecken. Wirklich reines κ- bzw. ι-Carrageenan kann jedoch nur von ausgewählten Rotalgenarten mit definiertem Wachstumsstadium und bei gründlicher Aufreinigung gewonnen werden. Wirtschaftlich interessanter sind sogenannte κ-/ι-Hybridtypen („kappa-2" oder „weak gelling" Typen), da sie mehr Algenarten umfassen und die Vorteile von κ- und ι-Carrageeenan in sich vereinen. In diesem Zusammenhang ist unter anderem die hohe Gelfestigkeit des κ-Typs und die Fähigkeit von ι-Carrageenan, nach einem Bruch der Gelstruktur diese wieder zu einer geschlossenen Struktur aufzubauen, zu nennen.

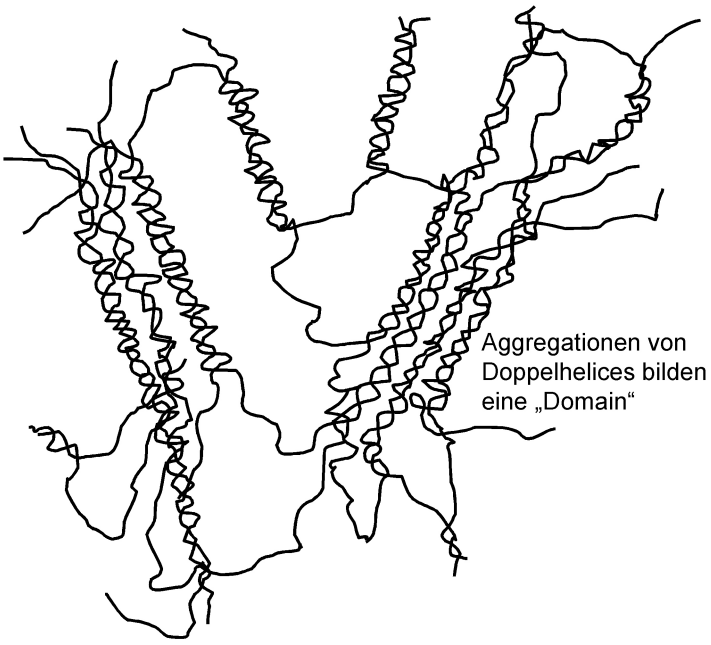

Abb. 2.27: Domain-Modell nach MORRIS (1980) für den Aufbau von κ-Carrageenangelstrukturen.

Zur Beschreibung, ob der Hybridtyp mehr κ- oder ι-ähnliches Verhalten besitzt, wird das Verhältnis von sulphatisierten 3,6-Anhydrogalactoseeinheiten zu Einheiten von nicht-sulphatisierter 3,6-Anhydrogalactose (AG) herangezogen (Abb. 2.28; BIXLER ET AL., 2001). In der vorliegenden Arbeit wird Carrageeenan von *Sarcothalia crispata* mit einem 3,6-AG-2OSO_3/3,6-AG-Verhältnis von 0,4 verwendet. Dies entspricht einem Anteil von ca. 38 % ι-Einheiten im Aufbau des gemeinsamen κ-ι-Makromoleküls. Das Gelierungsverhalten dieser Hybridmoleküle lässt sich deutlich von entsprechenden Mischungen mit dem gleichen Verhältnis von κ- und ι-Anteilen aus reinen κ- und ι-Carrageenanmakromolekülen unterscheiden (WANG ET AL., 2005). Dies liegt in den unterschiedlichen Gelierungstemperaturen von κ- und ι-Carrageenan begründet. Die Gelierung von Mischungen der zwei Carrageenantypen ist daher ein zweistufiger Prozess (PICULELL ET AL., 1992). Liegen die κ- bzw. ι-Einheiten jeweils als Reinstoffe vor, so können diese unabhängig voneinander ein Gelsystem aufbauen (PARKER ET AL., 1993; RIDOUT ET AL., 1996). Bei Hybridtypen sind jedoch die κ- und ι-Abschnitte auf dem gleichen Makromolekül. Dadurch wird die Gelierung der Abschnitte eines Typs durch die bereits erfolgte Gelierung der Abschnitte des anderen Typs beeinflusst. Neben diesem indirekten Nachweis über den Gelierungsverlauf lässt sich auch direkt mit-

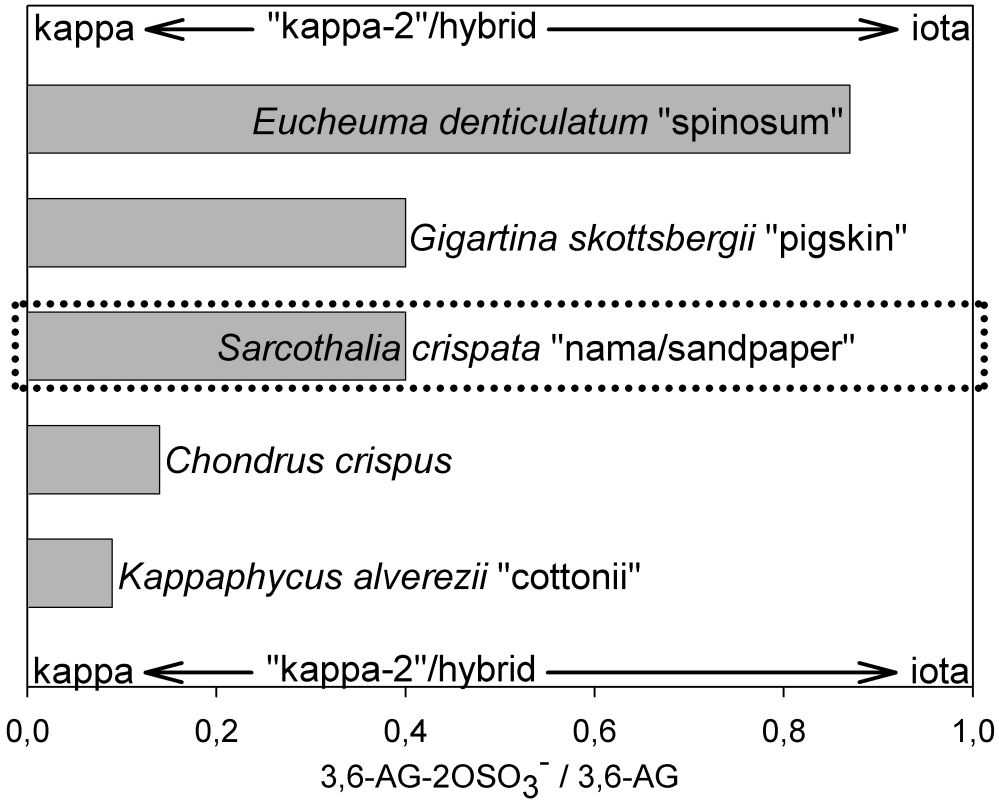

Abb. 2.28: "Stancioff Diagram" nach BIXLER ET AL. (2001) zur Einteilung des κ-/ι-Charakters von Hybridcarrageenanen. Der gepunktete Rahmen kennzeichnet das in dieser Untersuchung verwendete Carrageenan.

tels Elektrophorese nachweisen, ob Hybridmoleküle mit κ- und ι-Einheiten auf dem gleichen Makromolekül vorliegen (DEVRIES, 2002).

2.3.2 Faktoren für die Geleigenschaften

Wie in den Bezeichnungen "kappa-2" und "weak gelling"-Carrageenan deutlich wird, ermöglicht der Einsatz von Hybridcarrageenan eine feinere Abstufung der Geleigenschaften im Vergleich zu steifen, aber spröden κ-Carrageenangelen. Bei der Vorstellung der einzelnen Carrageenanreintypen wurde bereits die Rolle von Kalium- und Calciumionen zum Ladungsausgleich in Helixstrukturen angesprochen. Bei Hybridcarrageenan finden sich κ- und ι-Einheiten zusammen im gleichen Makromolekülstrang. Daher bestimmt das Verhältnis von geeigneten einwertigen Kationen (z.B. Kalium) zu entsprechenden zweiwertigen (wie Calcium) die Geleigenschaften (spröde bis weich) des Hybridcarrageenans, da entsprechend der Ionenzusammensetzung κ- oder ι-Abschnitte beim Aufbau der Gelhelices unterstützt werden (SYRBE ET AL., 1998; SEDLMEYER ET AL., 2003).

So bilden Abschnitte im Hybridcarrageenanmakromolekül, in denen der ι-Typ dominiert, nach vollständiger Hydratisierung bei Abkühlung unter 50 °C ein Netzwerk aus Doppelhelices aus. Der Ladungsausgleich innerhalb der Carrageenandoppelhelices erfolgt über zweiwertige im Serum enthaltene Ionen, bei milchbasierten Mischungen in der Regel durch Calciumionen. Verantwortlich

für die dreidimensionale Vernetzung sind Unregelmässigkeiten in der Verteilung der Sulphatgruppen, wodurch Knickstellen in den Helices entstehen. Ursache für diese Unregelmässigkeiten in der Sulphatgruppenverteilung sind beispielsweise kurze κ-Abschnitte oder nicht umgewandelte μ- oder ν-Einheiten (FALSHAW ET AL., 2003). Nach einem scherkraftinduzierten Bruch des Doppelhelixnetzwerksystems besitzen ι-Carrageenanhelixsysteme die Fähigkeit einer „Rückverfestigung" zu einem erneuten Netzwerkverbund. Die Ursache für diese Fähigkeit zur Selbstreparatur liegt in der Möglichkeit, Calciumionen bei dem Partialladungsmuster von ι-Carrageenan nicht nur innerhalb der Doppelhelices zum Ladungsausgleich einzubinden, sondern auch im Sinne von Calciumbrückenbindungen zur Stabilisierung von benachbarten Carrageensträngen heranzuziehen. Die Gelstärken von ι-Carrageenan liegen im Vergleich zu κ-Systemen niedriger, die Gele werden im Allgemeinen als „weich" bezeichnet. „Spröde" Gele, d.h. relativ hohe Gelstärken mit klar definierten, kantigen Bruchstellen, erhält man mit κ-Carrageenan. Hybridcarrageenan vereinigt je nach im Abschnitt dominantem Typ beide Arten im Netzwerkaufbau. Dadurch können relativ feste Gele erzielt werden, ohne auf die Fähigkeit einer Rückverfestigung nach Scherbelastung vollständig verzichten zu müssen.

Die Verteilung der einzelnen Carrageenantypen im Makromolekül ist jedoch nicht nur für die Wechselwirkungen mit minoren Komponenten wie beispielsweise Serumionen entscheidend. Sie bestimmt auch, inwieweit hydrophobe Abschnitte als Oberflächen in Erscheinung treten, sowie das Verhalten des Biopolymers in einem komplexen Mischsystem. Die Rolle der Partialladungsverteilung und -dichte wird in der unterschiedlichen Löslichkeit der Carrageenantypen deutlich. Während λ-Carrageenan mit einer Anzahl von 3 Sulphatgruppen pro Grundeinheit kaltlöslich ist, benötigt κ-Carrageenan (1 Sulphatgruppe pro Einheit) für eine vollständige Hydratisierung beispielsweise eine Erhitzung auf 70°C für 20 Minuten. Durch die gleichmäßige Verteilung und hohe Dichte der Sulphatgruppen erscheint bei λ-Carrageenan die Oberfläche des Polysaccharidstrangs hydrophil und assoziiert leicht Wassermoleküle zum Aufbau einer Hydrathülle. Bei κ-Carrageenan sind die Sulphatgruppen dagegen in geringerer Anzahl und damit in größeren Abständen auf dem Polysaccharidstrang angeordnet. Die Kontaktfläche dieses Makromoleküls ist daher nicht vollständig durch die starke Hydrophilität der anionischen Gruppen überlagert, sondern auch durch das Seruminteraktionsvermögen der Galaktose bzw. Anhydrogalaktosegrundbausteine bestimmt.

Zusammenfassend ergeben sich damit folgende Faktoren, welche die Gelbildungsfähigkeit und Textureigenschaften von carrageenanbasierten Systemen bestimmen:

1.) Die Art und Verteilung von mehreren oder auch nur einem Typ der Carrageenangrundeinheiten (μ, ν, κ, ι, ..) ergeben das Partialladungsmuster des daraus gebildeten Makromoleküls.
2.) Die Abstände zwischen Bereichen mit hoher Partialladung bestimmen die Auswahl bevorzugter Serumionen (Kalium, Calcium) zum Ladungsausgleich.
3.) Die Wechselwirkung mit spezifischen Serumionen führt zu verschiedenen Grundbausteinen, auf die bestimmte Eigenschaften des Helixnetzwerkes zurückzuführen sind (Beispiel: harte, aber spröde Doppelhelixaggregate aus κ-Einheiten mit Kaliumionen gegenüber weichen calciumvermittelten, einfachen ι-Doppelhelices mit der Fähigkeit zum Strukturwiederaufbau nach Bruch).

4.) Störstellen im Makromolekül, wie z.B. kurze Abschnitte mit nicht umgewandelten μ - und ν-Carrageenan, wirken als Knickstellen im Helixaufbau. Sie sind für eine dreidimensionale Vernetzung der Carrageenanhelices notwendig, da sich dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Assoziierungsstelle zwischen benachbarten Carrageenanhelices erhöht.
5.) In Bereichen mit einer geringen Anzahl an Sulphatgruppen pro Grundeinheit (z.B. längere Abschnitte mit κ-Typ) liegen auch hydrophobe Oberflächenabschnitte vor. Es besteht damit grundsätzlich auch die Möglichkeit hydrophober Wechselwirkungen mit anderen Biopolymeren in komplexen Mischungen, wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird.

2.3.3 Besonderheit: Reaktivität von Milch gegenüber Carrageenan

Ursprung der traditionellen Verwendung von Carrageenan ist der "goémon blanc", ein Milchpudding, bei dem die synergistische Wirkung der natürlichen Zusammensetzung von Kuhmilch auf die Gelbildungsfähigkeit von Carrageenan genutzt wird. Nicht umsonst wird daher von der "speziellen Milchreaktivität" dieses Polysaccharids gesprochen (DEVRIES, 2002). So ist Milch aufgrund ihrer Zusammensetzung mit Caseinmicellen, Kalium und Calciumionen eine optimale Mischung von Reaktionspartnern mit Hybridcarrageenan für die Ausbildung von starken Biopolymermischgelen. Milchserum enthält im Mittelwert 38 mmol/L Kalium- und 10 mmol/L Calciumionen (KIERMEIER ET AL., 1973). Damit sind sowohl für κ- wie auch ι-Carrageenanabschnitte im Polymerstrang optimale Gegenionen zum Ladungsausgleich während eines Coil-Helix-Übergangs gegeben. Neben der vorteilhaften Ionenzusammensetzung des Milchserums können dabei drei Mechanismen von Biopolymerinteraktionen mit Carrageenanhelices unterschieden werden:

1.) Hydrophobe Wechselwirkungen, wie beispielsweise zwischen α_S-Casein und κ-Carrageenan (SKURA ET AL., 1981; Abb. 2.29a).
2.) Ionenvermittelte elektrostatische Assoziationen, wie z.B. über Calciumbrückenbindungen zu negativ geladenen Abschnitten von ß-Casein (OZAWA ET AL., 1983; LYNCH ET AL., 1994; DICKINSON, 1998; Abb. 2.29b).
3.) Spezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen anionischen Bereichen der Carrageenanhelices mit Abschnitten positiver Partialladung von anderen Biopolymeren. Beispiel: Biopolymerkomplex mit κ-Casein (SNOEREN ET AL., 1975; Abb.: 2.29c).

Im Zusammenhang betrachtet, greifen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen ineinander ein. Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Sulphatgruppen des Polysaccharids mit den Abschnitten positiver Partialladung des κ-Caseins induziert eine Konformationsänderung in benachbarten Bereichen der Caseinmicelle. Beide Biopolymere erstreben eine optimale Anlagerung, bei der auch zu den Sulphatgruppen benachbarte hydrophobe Abschnitte im Polysaccharid mit entsprechenden Partnern der Caseinmakromoleküle wechselwirken können.
Dies zeigt in Messungen der Oberflächenhydrophobizität von Milchproteinsystemen einen

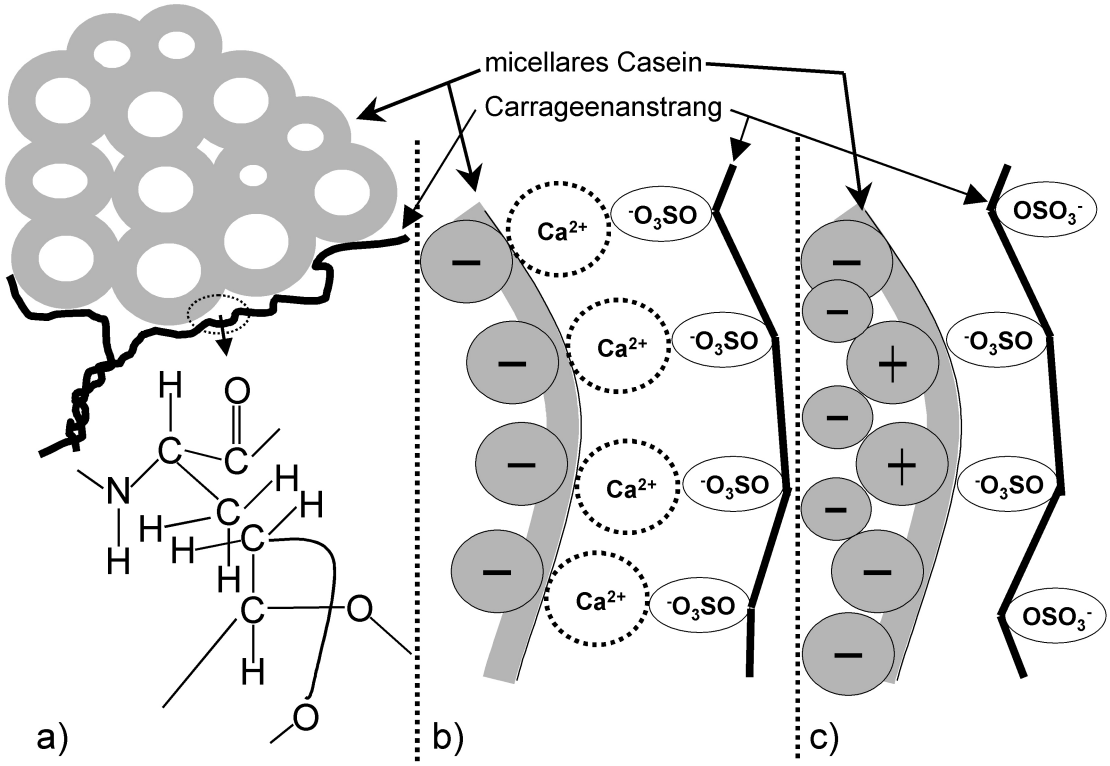

Abb. 2.29: Schematische Darstellung verschiedener beteiligter Wechselwirkungen am Biopolymerkomplex aus Carrageenan und Caseinmicellen: a) Hydrophobe Wechselwirkungen; b)Ionenvermittelte elektrostatische Assoziationen; c) Spezifische elektrostatische Wechselwirkungen.

Anstieg, der allein auf die Zugabe von Carrageenan bzw. die Reaktion mit diesem Polysaccharid zurückgeführt werden kann (Mlleko et al., 1997). Ein Ladungsausgleich von Bereichen hoher Partialladungsdifferenz im Polymer ermöglicht einen höheren Grad weiterer Kooperationen im Makromolekül, vor allem in den benachbarten Bereichen zu Abschnitten mit hoher Ladungsdichte (Caram-Lelham et al., 1997). Werden diese stark geladenen Stellen durch entsprechende Gegenionen neutralisiert, erhöht sich die Beweglichkeit der unmittelbar anschließenden Makromoleküleinheiten. Der Grund hierfür liegt in der fehlenden elektrostatischen Abstoßung ausgeglichener ionischer Gruppen, da, wie bereits bei der Beschreibung des Stern-Modells gezeigt, durch die Gegenionen der Potentialverlauf der elektrischen Doppelschicht nivelliert wird. Dies reduziert die Ausmaße der Doppelschicht, womit kürzere Abstände bei der Anordnung dieser ansonst gleichgeladenen Molekülteile möglich werden. Durch diese erweiterte Konformationsanzahl der Makromolekülteile eröffnen sich auch neue Möglichkeiten zu hydrophoben Wechselwirkungen. Bedenkt man, dass die Sulphatgruppen des κ-Carrageenans mit der positiven Partialladung mit Sequenzposition 97 bis 112 des κ-Caseinmakromoleküls wechselwirken, so kann damit beispielsweise die Wechselwirkung des hydrophoben κ-Caseinsequenzabschnitts von Position 55 (Phenylalanin) bis Position 62 (Alanin) mit dem hydrophoben Abschnitt bei α-Casein von Alanin an Position 158 (Alanin) bis 169 (Leucin) beeinflusst werden. Mit einer Neuausrichtung bzw. Ausweitung der hydrophoben Wechselwirkungen rücken zudem die hydrophoben Bereiche in der Nähe benachbarter Calciumbrückenbindungen im Caseinverbund als weitere Assoziationspunkte in den Fokus des Polysaccharids.

Über diese Kombination aus spezifischen elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen binden die Caseinfraktionen ihre zugehörigen Micellen an die carrageenanbasierte Helixstruktur. Der Einbau der relativ großen Caseinmicellen schafft zusätzliche Ansatzpunkte für Querverbin-

dungen zwischen den Carrageenansträngen. So ist im Vergleich zu reinen Carrageenansystemen bei milchbasierten Mischungen ca. ein Drittel der Polysaccharidmenge für eine makroskopisch sichtbare, vollständige Gelierung des Systemvolumens ausreichend. Zwar steigt grundsätzlich mit dem Coil-Helix-Übergang auch das Volumen an gebundenem Serum pro Carrageenanmenge und damit auch der hydrodynamische Durchmesser des Polysaccharids. Für Milchmischsysteme sind jedoch bei einer Abschätzung der Verteilung dieser Carrageenanmenge im Gesamtvolumen die Zwischenräume der Netzwerkstränge zu groß für eine Verbindung durch einzelne Caseinmicellen (HARDING, 1997). Verschiedene Arbeiten haben daher den Hintergrund zur Entstehung und zu weiteren Details von Carrageenan-Milchproteinmischgelen untersucht (LANGENDORFF ET AL., 1997; SCHORSCH ET AL, 2000; KOXHOLT, 2000; VEGA ET AL., 2004; SPAGNUOLO ET AL., 2005).

Im Folgenden soll nun der Stand des Wissens über die einzelnen Interaktionsschritte zwischen Milchproteinen und Carrageenan beim Aufbau eines gemeinsamen Biopolymerkomplexes dargelegt werden. Dieses aus Modellsystemen abgeleitete Schema zur Entstehung der eigenschaftenbestimmenden Mikrostruktur im Mischsystem bildet die Grundlage für die spätere Interpretation der Versuchsergebnisse in dieser Arbeit. Entsprechend werden verschiedene Aspekte im Detail betrachtet:

Ablauf der Entstehung gemeinsamer Biopolymerkomplexe zwischen Carrageenan und Milchprotein

Voraussetzung und Anfangspunkt im Entstehungsablauf gemeinsamer Biopolymerkomplexe aus Carrageenan und Milchproteinen ist die hitzeinduzierte Entfaltung und damit vollständige Hydratisierung des Polysaccharids. Durch die vollständige Hydratisierung des Carrageenanmakromoleküls zur ungeordneten Coil-Form wächst die Konkurrenzsituation mit anderen Biopolymeren um Raum und verfügbare Wassermoleküle zur Solvatisierung. In Abbildung 2.30 ist die Carrageenanhydratisierung schematisch als ein Auseinanderfalten des Knäuels dargestellt - in Realität werden eher eine Lockerung und ein Aufquellen des Knäuels vorliegen. In Milchsystemen tritt aus diesem Grund eine Phasentrennung auf, bei der die Aneinanderlagerung von Makromolekülen zu Assoziationen und Flockenbildung führt ("depletion flocculation"; Abb. 2.30; HEMAR ET AL, 2002; AUGUSTIN ET AL., 1999; LANGENDORFF ET AL., 2000; SCHORSCH ET AL., 2000).

In diesem Zusammenhang ist der Begriff der Mikrophasenseparation zu nennen, d.h. die Caseinmicellen werden dabei zu Proteinmikroclustern zusammengelagert, so dass das zwischen den kugelförmigen Micellen bereit stehende Wasser für das kettenförmige Polysaccharid verfügbar wird ("excluded volume"-Effekt; Abb. 2.31; DICKINSON, 1998; SCHORSCH ET AL., 2000; SPAGNUOLO

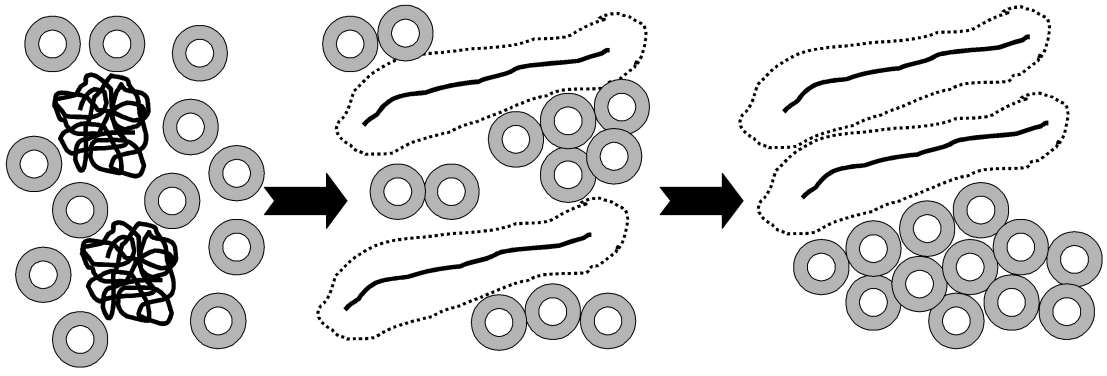

Abb. 2.30: Schematische Darstellung des "depletion flocculation"-Entmischungsphänomens.

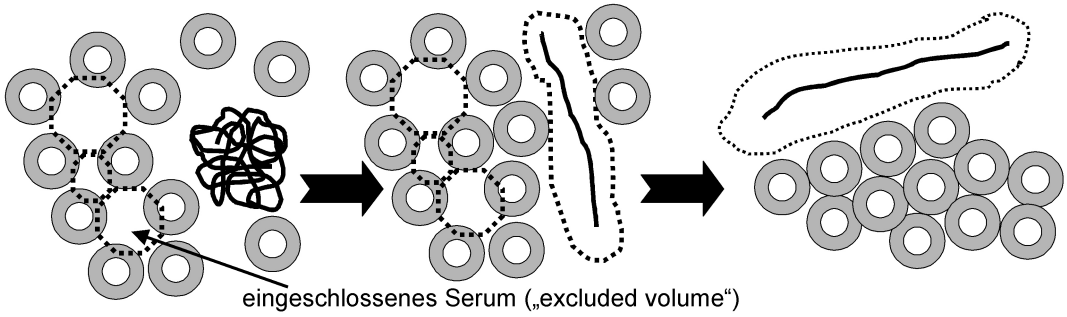

Abb. 2.31: Schematische Darstellung des “excluded volumen”-Effekts bei Biopolymermischungen

ET AL., 2005).

Damit entstehen allein aufgrund der thermodynamisch bedingten Phasentrennung caseindominierte Proteinaggregate, die bei neutralen pH-Werten zwar insgesamt negativ geladen sind, aufgrund des Caseinmicellenaufbaus an der Oberfläche aber auch positiv geladene Partialladungsbereiche und hydrophobe Schnittstellen aufweisen. Aus diesem Grund eignen sich die Proteincluster sowohl zur Neutralisation der Sulphatgruppen des Carrageenans als auch zur Bedeckung exponierter hydrophober Bereiche des Polysaccharidstrangs, wenn aufgrund des Coil-Helix-Übergangs von Carrageenan die Ladungsdichte im Makromolekül steigt. Die Steigerung der Ladungsdichte aufgrund des verringerten Abstands der Sulphatgruppen durch den Helixaufbau stellt einen der Schlüsselfaktoren für die Strukturbildung in Carrageenan-Milchproteinsystemen dar (NILSSON ET AL., 1991; LANGENDORFF ET AL., 2000). Die positiven Partialladungsbereiche an der Oberfläche der caseindominierten Proteincluster werden daher zum Ausgleich der hohen Ladungsdichte an die Carrageenanhelices assoziiert. Sie wirken als zusätzliche Verbindungen zwischen den Carrageenansträngen und erhöhen dadurch ähnlich wie die bereits genannten Knickstellen in den Carrageenansträngen die dreidimensionale Vernetzung. Sie sind damit in eine zusammengesetzte Mischgelstruktur integriert, wie in einem Modell nach SPAGNOLO ET AL. (2005) deutlich wird (Abb.2.32). Damit ist erklärt, warum in Milchsystemen eine gegenüber reinen Carrageenanlösun-

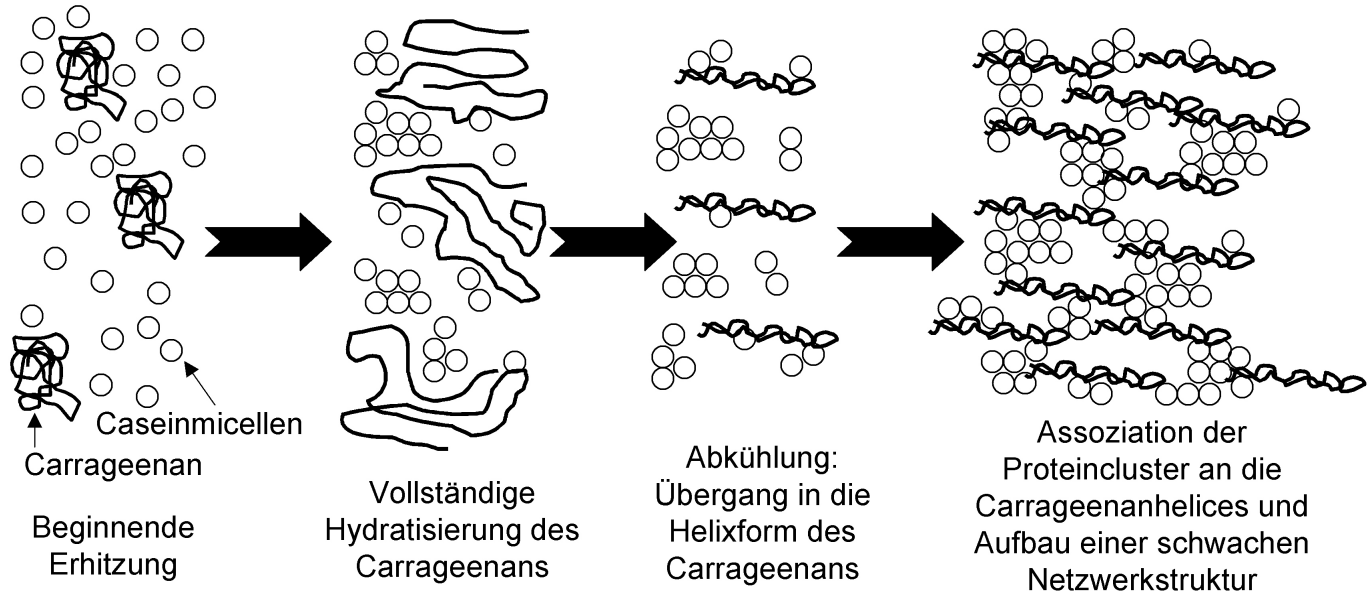

Abb. 2.32: Modellvorstellung zur Bildung einer Mikrostruktur in Carrageenan-Milchproteinsystemen nach SPAGNUOLO ET AL. (2005).

gen deutlich reduzierte Polysaccharidmenge zu einer geschlossenen Netzwerkstruktur führt. Denn diese reduzierte Polysaccharidmenge allein würde nicht für eine das vollständige Volumen ausfüllende Struktur ausreichen.

Rolle von Proteinclusteroberflächenmodifikationen als Assoziationspunkt für den Biopolymerkomplex

Das Muster aus hydrophoben Assoziationsstellen und Bereichen mit positiver Partialladung auf der Proteinclusteroberfläche bildet eine der Voraussetzungen für den Aufbau einer zusammenhängenden Netzwerkstruktur. Von besonderem Interesse ist daher auch einzuschätzen, inwieweit sich Oberflächenmodifikationen auf die Biopolymerkomplexbildung auswirken können.

Dabei ist zu bedenken, dass Milchprotein neben den micellbildenden Caseinen auch noch Molkenproteine enthält. In Kuhmilch machen diese globulären Proteine im Durchschnitt knapp 1/5 des Gesamtproteins aus. Ob spezifische Wechselwirkungen dieser Proteine zu Carrageenansträngen auftreten, wird in der Literatur widersprüchlich bewertet. So kann einerseits in einer Untersuchung mit verschiedenen kommerziellen Milchproteinprodukten den Molkenproteinen kein signifikanter Anteil an den Polysaccharid-Protein-Interaktionen zugeschrieben werden (Hemar et al., 2002). Andererseits zeigt κ-Carrageenan einen moderierenden Effekt auf die temperaturabhängige Auffaltung und Exposition von hydrophoben Abschnitten der globulären Proteine. So wurden abhängig vom pH auch für caseinfreie Molkenprotein-Carrageenansysteme synergistische Effekte v.a. aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen beschrieben (Mlleko et al., 1997).

Bei Mischungen von Casein, Molkenproteinen und Carrageenan stehen jedoch alle drei Biopolymere bei der Komplexbildung in einer Konkurrenzsituation. Verschiedene Arbeiten haben daher die Frage untersucht, welche Rolle Caseinen bzw. Molkenproteinen in Milchprotein-Carrageenansystemen zufällt. Dabei konnte an verschiedenen Beispielsystemen gezeigt werden, dass ein Austausch von Molkenprotein durch Casein bei konstantem Gesamtproteingehalt einen deutlichen Anstieg der Gelfestigkeit hervorruft (Mlleko et al., 1997; Sedlmeyer et al., 2003). Dies wird auf die unterschiedliche Art der Wechselwirkungen zwischen den Biopolymeren zurückgeführt. Während der Molkenproteinanteil eher die Rolle eines inaktiven Füllmaterials im Strukturaufbau übernimmt, partizipieren Caseinmicellen aktiv im Strukturaufbau des carrageenanbasierten Netzwerks, was auch durch eine rheologische Methode von Nielsen (1994) bestätigt wurde. Mlleko et al. (1997) führt dies auf die unterschiedliche Art der Protein-Polysaccharid-Wechselwirkungen zurück. Während diese bei Casein und Carrageenan elektrostatischer Natur sind, dominieren zwischen Molkenproteinen und Carrageenan schwächere hydrophobe Wechselwirkungen.

Offen ist in diesem Zusammenhang die Beurteilung, inwieweit disulfidbrückenbasierte Komplexe von denaturierten Molkenproteinen auf der Caseinmicellenoberfläche die elektrostatische Interaktion zwischen Carrageenan und den caseindominierten Proteinclustern beeinflussen. Dieser Aspekt ist daher auch Gegenstand von experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit, da - abhängig von den Prozessparametern - ein unterschiedlicher Anteil von denaturierten Molkenproteinkomplexen an der Micellenoberfläche vorliegt.

Im Folgenden wird noch der Hintergrund zu weiteren Faktoren bei der Entstehung und der dar-

aus resultierenden Eigenschaften von zusammengesetzten Milchprotein-Carrageenanstrukturen näher beleuchtet.

Verschiedene Aussagen finden sich in der Literatur zu dem Punkt, inwieweit Assoziationen zwischen Carrageenan und Milchproteinen auch schon bei höheren Temperaturen auftreten, also wenn das Polysaccharid noch in der Coil-Form vorliegt. Dies ist insbesondere in Bezug auf den gleichzeitig mit der Erhitzungszeit steigenden Molkenproteindenaturierungsgrad und die daraus resultierenden Micellenoberflächenmodifikationen interessant. Die Höhe der Partialladungsdichte spricht nur bei λ-Carrageenan für das Auftreten einer elektrostatischen Adsorption von Caseinmicellen an Carrageenan in der Coil-Form, sie ist in dem geringen Abstand der Sulphatgruppen beim λ-Typ begründet (LANGENDORFF ET AL., 2000). Die Ladungsdichte von κ- oder ι-Carrageenan in Knäuelform (Coil) wird dagegen als zu gering für die elektrostatische Fixierung von Proteinaggregaten eingeschätzt, eine These, die durch Partikelgrößenmessungen unterstützt wird.

Andererseits wird argumentiert, dass mit Partikelgrößenmessungen die Adsorption einzelner Caseinmicellen am Polysaccharid alleine nicht erfaßbar ist. Die Messungen können nur die Fälle aufzeigen, in denen eine Adsorption verschiedener Biopolymere auch eine Aneinanderlagerung ("bridging") weiterer Caseinmicellen zu Clustern gewisser Größe zur Folge hat (SCHORSCH ET AL., 2000). Eine Adsorption verschiedener Polymere kann jedoch erst ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis auch eine die Partikelgrößenverteilung beeinflussende Aneinanderlagerung ("depletion flocculation") eines Polymers bewirken (HUNTER, 1987). Auch Arbeiten von DALGLEISH ET AL. (1988) sehen keinen dominanten Effekt der Carrageenankonformation auf die Möglichkeit der Adsorption von Caseinmicellen. Bei Abwägung beider Seiten ist aufgrund der hohen Elektronegativität der Sulphatgruppen eine konformationsunabhängige Wechselwirkung mit entsprechenden Gegenspielern sehr wahrscheinlich. Allerdings spielt bestimmt auch die Höhe der elektrostatischen Ladungsdichte eine entscheidende Rolle dafür, ob die Wechselwirkung umgesetzt werden kann und auf welchen Bereich sie sich auswirkt.

Unabhängig von der Position zur Adsorption von Carrageenan an Caseinmicellen bei hohen Temperaturen wird ab dem Temperaturbereich, in dem der Coil-Helix-Übergang auftritt, von einer Adsorption des Polysaccharids an das Protein ausgegangen. Abbildung 2.32 hat bereits die Ergänzung der Carrageenannetzwerkfragmente durch Milchproteincluster zu einem schwachen, aber kontinuierlichen Mischgelsystem verdeutlicht (SPAGNUOLO ET AL., 2005).

Durch gezielte chemische Variation der Biopolymer- und der Serumzusammensetzung wurden bereits zwei Faktoren als essentiell für ein thermodynamisch stabiles Mischgel identifiziert: Erstens die Existenz von Bereichen mit hohen Partialladungsdifferenzen, wie in einem Vergleich mit sulphatgruppenfreien Agarosesystemen deutlich wird. Bei diesen Agarosesystemen findet kein Aufbau eines gemischten Netzwerks statt. Dies macht die tragende Rolle der Sulphatgruppen bei der Wechselwirkung des Polysaccharids mit den Proteinclustern deutlich (SPAGNUOLO ET AL., 2005). Zweitens wurde durch Variation der verfügbaren Gegenionen die Helixstruktur als tragendes Grundgerüst für die zusammengesetzte Netzwerkstruktur identifiziert. So unterscheiden sich die rheologischen Eigenschaften bei Unterdrückung des Aufbaus von Carrageeenanhelices durch Natriumiodidzugabe grundlegend. Abhängig vom Verhältnis zwischen Carrageenan und Milchprotein wird sonst im Normalfall ein mehr oder weniger stark verknüpftes gemischtes

Netzwerk aus Carrageenanhelices und Proteinclustern aufgebaut.

Übersteigt die Carrageenankonzentration bei Milchsystemen 0,05 %, so vermindert sich die aktive Beteiligung der Proteincluster am Aufbau eines das ganze Volumen umfassenden zusammengesetzten Netzwerksystems. Die Verteilung der Carrageenanhelices im Raum bietet nun genügend Möglichkeiten zu direkten Interaktionen benachbarter Helices, so dass das System, thermodynamisch gesehen, im Gelzustand fixiert wird (SCHORSCH ET AL., 2000). Dabei wird in einem carrageenandominierten Netzwerk der Proteinanteil im Mischsystem in einer weniger relevanten Rolle für den Strukturaufbau gesehen. Abbildung 2.33 zeigt das zugehörige Phasendiagramm zu diesem Übergang (SCHORSCH ET AL., 2000). In der praktischen Anwendung ist ein wichtiger Nachteil von Carrageenankonzentrationen im Bereich von carrageenandominierten Gelsystemen (in Abb. 2.33 oberhalb der Phasengrenze von "liquid unstable") jedoch eine gewisse Synäreseneigung, da weiteren Aneinanderlagerungen benachbarter Carrageenanhelices während der Lagerung keine fest im Netzwerk integrierten Proteincluster mehr entgegenstehen (SEDLMEYER ET AL., 2006).

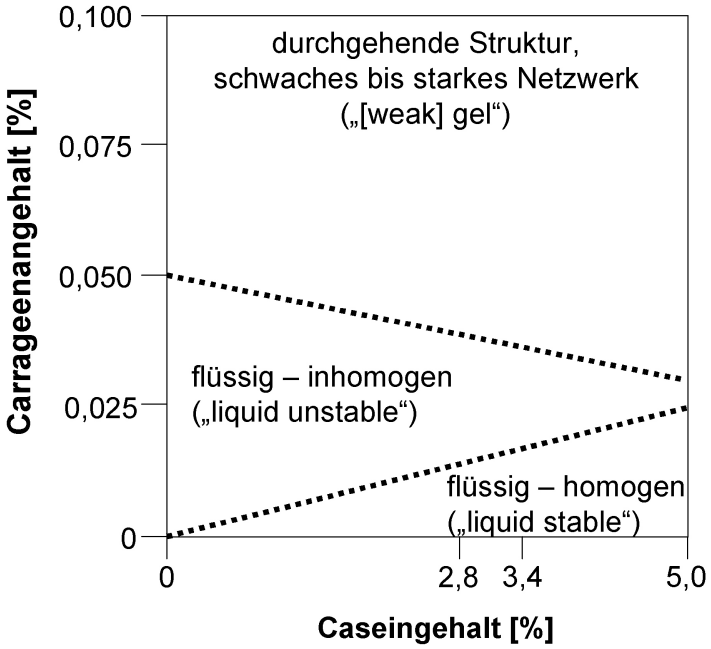

Abb. 2.33: Phasendiagramm von Casein-Carrageenan-Modellsystemen nach SCHORSCH ET AL. (2000).

Eine auf die Proteinmenge bezogene, relativ niedrige Carrageenandosage führt zwar ebenfalls aus dem „liquid unstable“-Bereich heraus, besitzt aber auch folgende Nachteile für praktische Anwendungen. So ist die vorhandene Gesamtbiopolymermenge zu gering, um ein durchgehendes zusammengesetzes Netzwerk aufzubauen. Unzusammenhängende Gelflocken von Polysaccharid-Proteinkomplexen neigen dann zur Sedimentation und bieten kein Netz, durch das weitere im System vorhandene Makromoleküle in Schwebe gehalten werden, wie beispielsweise suspendierte Kakaopartikel.

Das Optimum für industrielle Anwendungen liegt damit zwischen den zu Synärese neigenden carrageenandominierten Systemen und Mischungen mit unzusammenhängenden Mischgelflocken ohne Stabilisierungswirkung. Angestrebt wird daher ein möglichst breiter Bereich (“milk spread”)

unmittelbar unterhalb der Phasengrenze zu stärker gelierenden Systemen, in denen das Polysaccharid-Proteinsystem eine Partikelsuspension stabilisieren kann (BIXLER ET AL., 2001).

Physikalisch bedeutet dies die Ausbildung eines schwachen Netzwerks („weak gel"). Diese Struktur verhält sich nur bei längeren Betrachtungszeiträumen (z.B. 10 s und mehr) bzw. bei entsprechend niedrigen Messfrequenzen (z.B. 0,1 Hz) wie eine das ganze Systemvolumen durchziehende Netzwerkstruktur. Für die praktische Anwendung sind Biopolymermischungen mit diesem Strukturmerkmal besonders interessant, da ihr Stabilisierungsvermögen über längere Zeiträume konstant bleibt. Im Fokus sind damit Carrageenan-Milchproteinsysteme, welche ein durchgehendes, gemischtes, schwaches Gel aus Carrageenanhelices unter aktiver Beteiligung der Proteincluster aufbauen können (BIXLER ET AL., 2001). Sie stellen einen optimalen Mittelweg dar zwischen instabilen, unzusammenhängenden Gelfragmenten auf der einen Seite und festen, zu Synärese neigenden, carrageenandominierten Netzwerken auf der anderen Seite.

Die bisher genannten Aspekte umfassen die Hauptfaktoren, welche das thermodynamische Verhalten dieser Mischsysteme vorgeben. Es wird allerdings in der aktuellen Forschung darauf hingewiesen, dass die spezielle 'Milchreaktivität' von Carrageenan nicht allein durch die spezifische elektrostatische Wechselwirkung zwischen beiden Biopolymeren erklärt werden kann (DEVRIES, 2002). Vielmehr zeichnet sich ab, dass verschiedene Einzelfaktoren, wie beispielsweise die Verfügbarkeit verschiedener Ionen, hydrophobe Wechselwirkungen u.a., sich synergistisch zu diesem besonderen thermodynamischen Verhalten zusammenfügen.

Für ein vollständiges Bild und eine zuverlässige Vorhersage von stabilen Mischungskombinationen fehlt bisher die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Prozessbedingungen und prozessbedingter Modifikationen von einzelnen Inhaltsstoffen auf dieses Zusammenspiel aller Faktoren, welche die thermodynamischen Eigenschaften bestimmen. Diese Lücke soll diese Arbeit schließen, indem eine systematische Variation ausgewählter Prozessparameter bei der Herstellung von Mischgelen durchgeführt wird. Durch Vergleich verschiedener Produkteigenschaften mit unter Standardbedingungen hergestellten Systemen und unter Berücksichtigung bekannter Teilaspekte aus der aktuellen Literatur kann so auf die Auswirkungen im Zusammenspiel der einzelnen strukturbestimmenden Faktoren unter verschiedenen Herstellungsbedingungen geschlossen werden.

2.4 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Pektin

2.4.1 Aufbau und Typen

Pektine bestehen aus einer Hauptkette von α-1,4 glycosidisch verbundenen Galacturonsäureeinheiten. Neben Seitenketten aus neutralen Zuckern an Rhamnoseschnittstellen sind zudem in der Hauptkette methylierte Galacturonsäureabschnitte vorhanden (Abb. 2.34; WALTER, 1991).

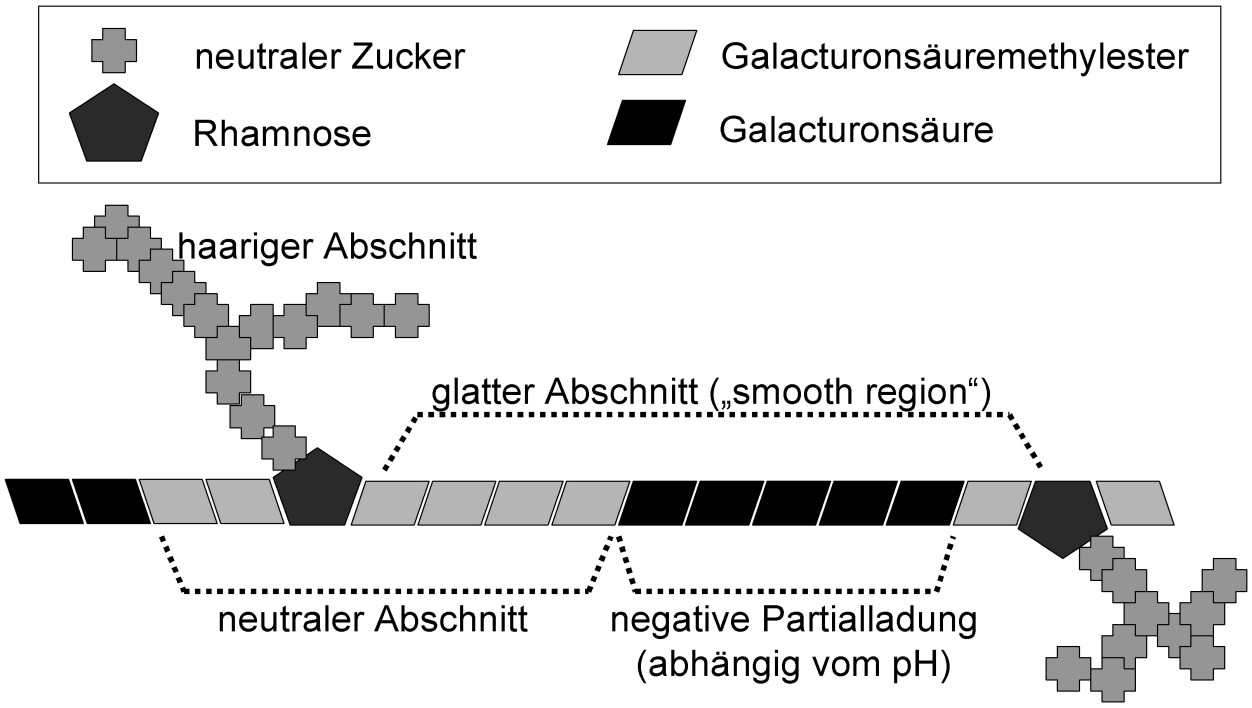

Abb. 2.34: Schematische Darstellung des Pektinmakromolekülaufbaus.

Bei pH-Werten im sauren Bereich ergeben sich dadurch bestimmte Partialladungsmuster von neutralen (methylierten) Abschnitten und negativ geladenen Galacturonsäureabschnitten. Anhand des Anteils methylierter Gruppen werden Pektine in niedrigveresterte (<50 % methyliert) und hochveresterte (>50 % methyliert) Pektintypen unterteilt. Der Anteil nicht-methylisierter Carboxylgruppen weist bei geeigneten pH-Werten hohe Partialladungsdifferenzen in einem vom Methylisierungsgrad abhängigen Muster im Biopolymermolekül auf. Für das Verständnis der in dieser Arbeit ausgewählten Biopolymersysteme ist in diesem Zusammenhang noch zu erwähnen, dass Carboxylgruppen in Bezug zu den im vorangegangen Abschnitt erörterten Sulphatgruppen eine geringere Elektronegativität aufweisen (SCHLOSSER, 1973). Im Vergleich zu Carrageenan ist daher die Kraft der elektrostatischen Wechselwirkungen, die vom Pektinmakromolekül ausgehen, als etwas schwächer einzuschätzen.

Wie bereits im Kapitel zu Milchproteinen vorgestellt, liegen Caseine als positiv geladene Proteinpartikel vor, da bei niedrigen pH-Werten der isoelektrische Punkt der Caseine unterschritten ist. Aufgrund der geänderten Ladungsverhältnisse stehen bei diesen Caseinpartikeln die κ-Caseinketten nicht mehr von der Micellenoberfläche ab und stabilisieren die Caseinpartikel damit nicht mehr über einen sterischen Mechanismus (Abb 2.35a; HAMMELEHLE, 1994). Damit besteht

die Möglichkeit einer Elektroadsorption der negativ geladenen Abschnitte im Pektinmakromolekül an positiven Oberflächenladungsabschnitten der Proteinpartikel. Wie Abbildung 2.35b zeigt, erhalten die Caseinpartikel bei dieser elektrostatischen Adsorption von

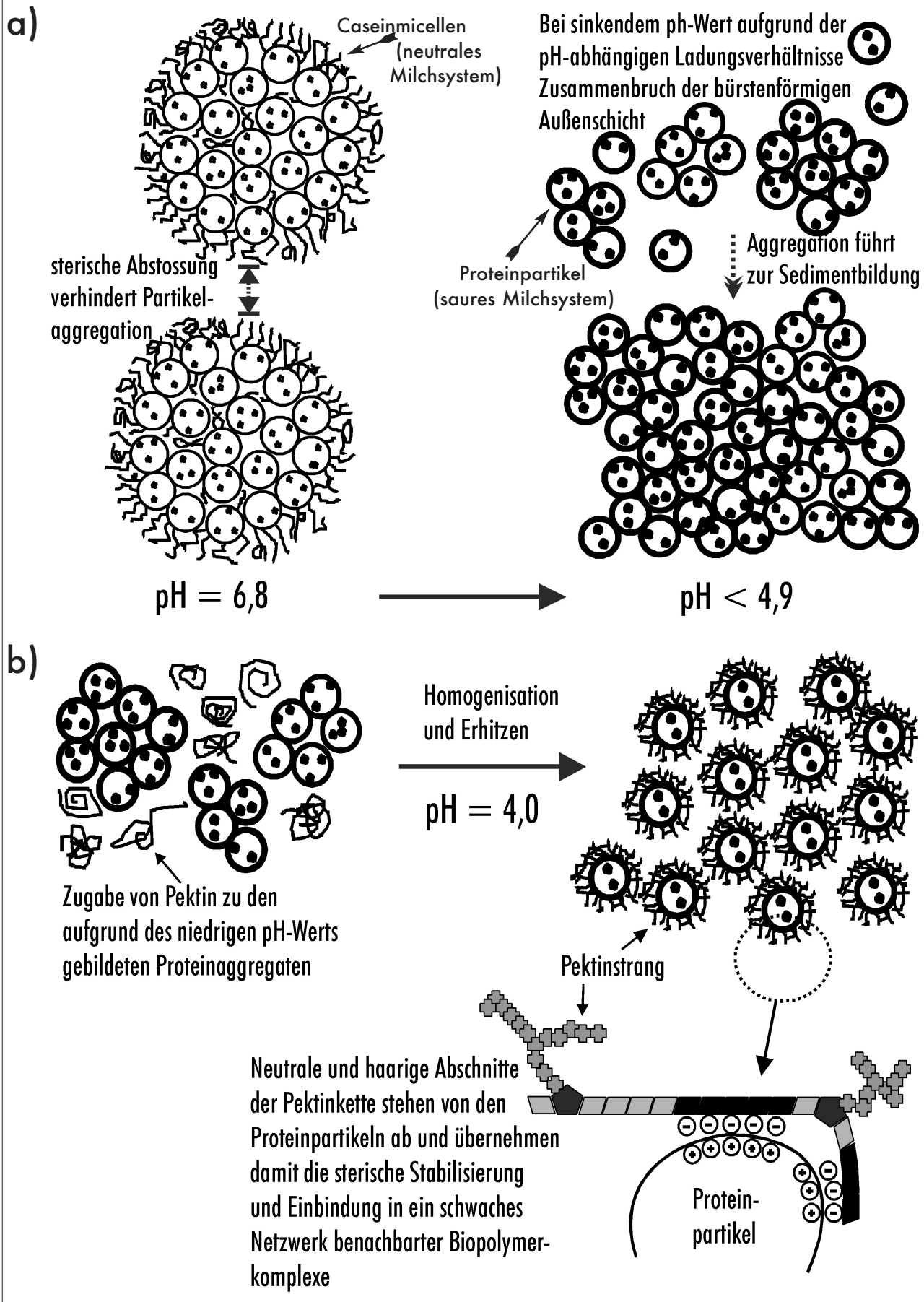

Abb. 2.35: Ersatz für den durch Säuerung wegfallenden sterischen Stabilisierungsmechanismus bei Caseinmicellen durch Elektroadsorption von Pektin.

Pektin einen Ersatz für ihre aufgrund des niedrigen pH-Werts verloren gegangene Schicht aus abstehenden κ-Caseinen („hairy layer"; BOULENGUER ET AL, 2003). Da das Aussehen des Milchproteinpartikel-Pektin-Biopolymerkomplexes an eine haarige Kugel erinnert, wird in diesem Zusammenhang bei dem Stabilisierungsmechanismus von Pektin bei gesäuerten Milchproteinsuspensionen auch von einem "fuzzy golfball"-Modell gesprochen (HOEFLER, 1991).

Die elektrostatische Adsorption von negativ geladenen Pektinabschnitten ist nicht an bestimmte Ladungsmuster des Proteinpartners gebunden, allein die positive Gesamtladung dieses Partners ist ausschlaggebend. Eine Biopolymerkomplexbildung findet daher auch in vorerhitzter Milch statt, bei der die Caseinpartikeloberfläche bereits partiell mit denaturierten Molkenproteinen bedeckt ist. Es ist vorstellbar, dass aufgrund des Zusammenhalts der Caseinpartikel durch die kovalent gebundenen Molkenproteinkomplexe sich eine Vorerhitzung positiv auf die Stabilisierung einer Pektin-Milchproteinmischung auswirkt.

Die elektrostatische Adsorption beruht auf einer Gleichgewichtsreaktion. Dies bedeutet, dass aufgrund bestimmter thermodynamischer Verhältnisse eine Energiebarriere gegenüber einem neuen Gleichgewichtszustand zu überwinden ist. Wie in Abb 2.36 erläutert, ist einer der Schlüsselfaktoren die Verteilung und das Verhältnis der Reaktionspartner im Mischsystemvolumen. So ist neben einer guten Durchmischung zur gleichmässigen Positionierung der Reaktionspartner im Raum auch eine temporäre Verschiebung der thermodynamischen Verhältnisse notwendig. Beispielsweise können in der Abkühlungsphase nach einer Erhitzung neue Wasserstoffbrückenbindungen geknüpft werden. Dies führt in Folge zur Einstellung eines neuen Gleichgewichtszustands, wie die Adsorption zu einem Biopolymerkomplex. In der praktischen Anwendung ist daher für die Stabilisierung einer gesäuerten Milchproteinsuspension mit Pektin eine Homogenisation mit anschließender Erwärmung von Vorteil (PARKER ET AL., 1997). Dabei bestimmt der Homogenisationsschritt aufgrund seiner Auswirkungen auf die Partikelgesamtoberfläche das Verhältnis von Pektin zu reaktiver Oberfläche (GLAHN, 1982; SEDLMEYER ET AL., 2004). Ein optimales Verhältnis beider Interaktionspartner stellt die Grundlage für ein thermodynamisch stabiles Biopolymermischsystem dar, da eine unvollständige Oberflächenbedeckung durch

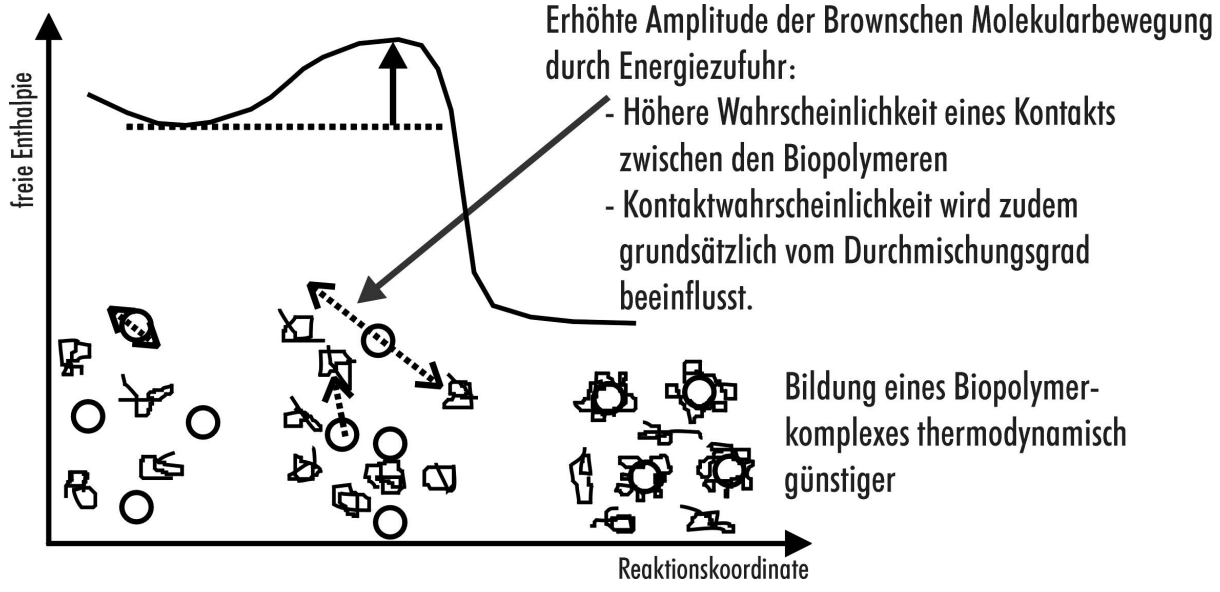

Abb. 2.36: Schematische Darstellung der Verschiebung einer Gleichgewichtsreaktion durch Energiezufuhr.

Pektinstränge eine Brückenbildung zwischen benachbarten Proteinpartikeln ermöglichen würde. Diese Brückenbildung würde schließlich zu Partikelclusterbildung mit entsprechenden Entmischungserscheinungen führen (DEKRUIF ET AL., 2001; TUINIER ET AL., 2002). Liegen beide Reaktionspartner dagegen optimal im Raum verteilt vor, so wird durch eine Erwärmung die Adsorption des Polysaccharids an die Proteinpartikel induziert (PARKER ET AL., 1997). Aufgrund der Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen ist bei ionischen Biopolymeren zudem die Serumzusammensetzung aufgrund des kinetischen Salzeffektes zu berücksichtigen (ATKINS, 1990). Durch Differenzierung zwischen adsorbiertem und freiem Pektin wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass für die Bildung des elektrostatischen Biopolymerkomplexes ein Pektinüberschuss notwendig ist, um das Reaktionsgleichgewicht entsprechend zu verschieben und eine Stabilisierung durch die zusätzliche Ausformung von Wasserstoffbrückenbindungen zu fördern (TROMP ET AL., 2004).

Der Aufbau eines sterischen Abstandshalters an den Proteinpartikeln durch die Adsorption des Pektins allein führt jedoch noch nicht zu einer vollständigen Stabilisierung des Mischsystems. Es wird der erfolgreiche Abschluss eines zweiten Schrittes im Stabilisationsmechanismus als zwingend notwendig angesehen, nämlich der Aufbau eines schwachen Gelnetzwerks zwischen den Pektin-Proteinkomplexen (BOULENGUER ET AL., 2003; SEDLMEYER ET AL., 2004). Dazu dienen hydrophobe Abschnitte in nicht adsorbierten Abschnitten der Pektinmakromoleküle. Sie können untereinander bzw. mit anderen im System vorhandenen Inhaltsstoffen mit hydrophoben Oberflächen in Wechselwirkung treten. Mit sinkender Temperatur können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen OH-Gruppen von Kohlenhydratmolekülen ausgebildet werden, über die schließlich ein zusammenhängendes, das gesamte Systemvolumen umfassendes Netzwerk entsteht (WALSTRA, 2003).

Das thermodynamische Verhalten von gesäuerten Pektin-Milchprotein-Suspensionen stellt sich damit als Folge des Zusammenspiels von Prozessführung, Mischsystemzusammensetzung und physikalisch-chemischen Eigenschaften der beteiligten Biopolymere dar. Da jedoch in Modellversuchen die Prozessführung nur mit Einschränkungen simuliert werden kann, ist der gegenseitige Einfluss der an der Bildung von stabilen Pektin-Milchproteinmischungen beteiligten Prozessparameter nicht vollständig erfasst. Verschiedene, selbst an Modellsystemen noch ungeklärte Punkte, wie z.B. der Einfluss neuerer technischer Entwicklungen (z.B. die Hochdruckhomogenisation) zeigen daher den Bedarf an systematischen Untersuchungen an komplexen Realsystemen im Pilotmaßstab, wie sie diese Arbeit hier leistet.

2.5 Auswirkungen thermischer und mechanischer Verfahrensschritte auf Biopolymere

Thermische Verfahrensschritte bilden die Grundlage der meisten Herstellungsprozesse von Biopolymermischungen. Bei hohen Temperaturen besitzen die aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung unvermeidbaren Schwingungen in Kettenmolekülen eine größere Amplitude. Dies hat die Auflockerung größerer Molekülknäuel im Mischsystem vorhandener Biopolymere zur Folge. Durch große Schwingungsamplituden werden auch intramolekulare Assoziationen (i.S.v. hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) im Knäuelinneren aufgebrochen, so dass eine vollständige Hydratisierung der gesamten Polymeroberfläche erfolgen kann. Sie bildet die Voraussetzung für Reaktionen zwischen verschiedenen und gleichen Biopolymeren.

Bevor auf kompliziertere Mischsysteme mit verschiedenen Biopolymeren eingegangen wird, sollen zunächst prozessinduzierte Reaktionen zwischen gleichartigen Biopolymeren betrachtet werden. Wie bereits angekündigt, wird dieser Fall an Beispielen aus der Gruppe der Milchproteine behandelt. Diese Biopolymere besitzen aufgrund der großen Variation der Seitengruppen ein hohes Reaktionspotential inner- wie auch außerhalb der eigenen Polymerkette.

Von besonderer Bedeutung sind hier vor allem Reaktionen, die zu neuen kovalenten Bindungen führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Verknüpfung zweier schwefelhaltiger Aminogruppen zu einer Disulfidbindung (Kirchmeier et al., 1985). Der große Unterschied kovalenter Bindungen zu den meisten übrigen Bindungen, welche die sekundäre bzw. tertiäre Konformation des Proteins bestimmen, liegt in der Temperaturunabhängigkeit. Die Stärke und Ausprägung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen verändert sich dagegen mit der jeweils aktuellen Temperatur (Walstra, 2003). Für globuläre Proteine, wie z.B. Molkenproteine, bedeutet dies als Konsequenz, dass die strukturbestimmenden, intramolekularen Bindungskräfte bei bestimmten Temperaturen zu schwach werden und sich die Biopolymerkette aus ihrer globulären Struktur entfaltet. Mit der Auffaltung werden nun aber auch reaktive Gruppen in eine exponierte Lage gebracht, so dass z.B. Reaktionen zur o.g. Disulfidbindung stattfinden. Während eine Auffaltung alleine meistens noch reversibel ist, stellt die Knüpfung neuer kovalenter Bindungen eine irreversible Denaturierung des Proteins dar.

Bei Milchproteinen betrifft dies vor allem die Fraktion der Molkenproteine. Diese umfasst v.a. ß-Lactoglobulin und α-Lactalbumin, beide weisen im nativen Zustand eine globuläre Struktur auf. Mit dem Vorkommen von SH-Seitengruppen im Makromolekül sind die Voraussetzungen für irreversible Veränderungen durch den Aufbau von neuen Disulfidbrücken gegeben. Bei Prozessbedingungen über 60 °C werden daher verschiedene Denaturierungsreaktionen wie Auffaltung und Komplexbildung beobachtet (Kirchmeier et al., 1984; Dannenberg et al., 1988). In ihrer Folge entstehen Komplexe aus Molkenproteinen untereinander wie auch mit der Oberfläche der Caseinmicellen. Letztere können deutlich die strukturellen Eigenschaften der Proteinsysteme beeinflussen.

So wirkt sich eine Belegung der Caseinmicellenoberfläche mit denaturierten Molkenproteinkomplexen deutlich auf die Gelstärke des durch Säuerung der Proteinlösung entstehenden Partikelgels aus (Schkoda, 1999). Der Hintergrund und die Auswirkung der Prozessbedingungen auf diese

Molkenprotein-Caseinkomplexe wurden in verschiedenen Arbeiten im Detail untersucht (El-Shobery, 1983; Dannenberg, 1986; Lauber, 2002; Keim, 2005). So wurden durch systematische Variation von Heißhaltezeit und Temperatur bei der Erhitzung von Casein-Molkenproteingemischen mit Hilfe der Arrheniusgleichung die Reaktionsordnung und die Aktivierungsenergie bestimmt (Kessler, 1996). Damit ist eine Berechnung des zu erwartenden Denaturierungsgrades bei verschiedensten Prozessparameterkombinationen möglich. Verschiedene Arbeiten zum chemischen Hintergrund der Komplexbildung unterstreichen die Rolle der Calciumphosphatsalze im System bezüglich der Reaktivität der SH-Gruppen (Hege, 1984; Kirchmeier, 1982; Schraml, 1993). Abhängig von den Milieubedingungen und der Ionenzusammensetzung des Serums zeigt sich, dass neben den Casein-Molkenproteinkomplexen bei intensiveren Prozessbedingungen selbst in Milch auch Partikel aus reinen Molkenproteinkomplexen in signifikanten Mengen entstehen können (Singh et al., 1993).

Im Vergleich zu Molkenproteinen erweisen sich die Caseinmicellen selbst als relativ hitzestabil (Guthy et al., 1980; Dalgleish, 1983). So treten beginnende prozessinduzierte Veränderungen erst bei Hocherhitzungsbedingungen (z.B. >100 °C) auf (Aoki, 1974; Kudo, 1980; Singh et al., 1992; O'Connell et al, 1999). Neben dem Austritt von Caseinmonomeren wird eine Verschiebung im Calciumphosphatgleichgewicht beschrieben (Schreiber, 2001; Bulca et al., 2004). Calciumphosphatcluster spielen sowohl im Submicellenmodell nach Schmidt bzw. Walstra (1990) wie auch im Caseinmodell nach Horne (1998) eine tragende Rolle für den Zusammenhalt der micellaren Struktur. Beiden gemeinsam ist auch eine ungleichmäßige Verteilung der verschiedenen Caseinmonomere in der Micelle. Hydrophobe Caseine, wie α_{S1}- und ß-Casein, sind mehr im Inneren der Struktur angereichert. Eine Verschiebung im Calciumphosphatgleichgwicht deutet damit grundsätzlich auch auf eine Umorganisation des Micellenverbands bzw. des inneren Aufbaus der Caseinmicellen hin. Beispielsweise zeigen Untersuchungen von Bulca et al. (2004) eine der Konsequenzen dieser Umstrukturierungen, nämlich die Veränderung der Hydrophobizität der Gesamtoberfläche.

Die meisten Verfahrensschritte bei der Verarbeitung von Biopolymermischungen bedeuten jedoch nicht nur einen Temperatureinfluss auf die Biopolymerlösung, sondern auch eine Belastung durch einen mehr oder weniger starken Schergradienten, welcher auf die Makromoleküle einwirkt. So können Pumpenart und -druckhöhe, aber auch Rohrdurchmesser und statische Mischer für Scherkräfte verantwortlich sein, welche die Eigenschaften der einzelnen Biopolymere und ihr Mischungsverhalten unvorhergesehen verändern (Windhab, 1990).

Homogenisatoren erzeugen in Sekundenbruchteilen besonders hohe, aber über die Höhe des Homogenisationsdrucks gut definierbare Scherkräfte. Sie werden daher in vielen Prozessen für eine standardisierte Vermischung der Inhaltsstoffe herangezogen. Die aufgrund des Bernoulli-Gesetzes auftretenden Implosionen im weiteren Verlauf des Strömungskanals des Homogenisators besitzen mit ihren starken Scherkräften als Kavitation einen deutlichen Effekt auf die Partikelgrößenverteilung. Instabilitäten, wie z.B. die Sedimentbildung, werden oft von den größten Partikeln einer Verteilung initiiert, da der Partikeldurchmesser im Quadrat in die Sinkgeschwindigkeit eingeht, welche aus dem Kräfteungleichgewicht zwischen Auftriebs- und Schwerkraft resultiert (Archimedisches Prinzip und Stoke'sches Gesetz zur Beschreibung der inneren Reibung des Fluids).

Im Hinblick auf die Molekulargewichtsverteilung von Polysacchariden kann dies jedoch auch bedeuten, dass der für einen schnellen Gelaufbau verantwortliche Anteil an Makromolekülen mit langer Kettenlänge bzw. hohem Molekulargewicht bei zu intensiver Homogenisierung verloren gehen kann. Dies hängt aber nicht allein von der Kettenlänge ab, sondern auch vom Formfaktor und der Kettenflexibilität des Makromoleküls. Makromoleküle vergleichbaren Aufbaus können beispielsweise als starre, stäbchenförmige Aggregate stärker durch Scherkräfte beeinflusst werden, als wenn sie unter anderen Voraussetzungen als flexible, ungeordnete Knäuelstrukturen vorliegen. Abhängig von den Prozessbedingungen können Scherkräfte daher auch zunächst verdeckte Auswirkungen auf die spätere Verarbeitung von Biopolymermischungen haben. Wird beispielsweise durch die Homogenisation zunächst nur die Anzahl der bereits erwähnten Knickstellen in Carrageenanmakromolekülen vermindert, so kann sich dies erst später makroskopisch in einem unvollständigen Gelaufbau äußern.

Anhand dieser genannten Beispiele wird die vielfältige Rolle der Prozessbedingungen bei der Herstellung von Biopolymermischungen deutlich. Durch die Auswahl verschiedener Prozessparameterkombinationen können daher die Eigenschaften, die sich aus der Zusammensetzung einer Biopolymermischung ergeben, in einzelnen Teilaspekten modifiziert werden. Aufklärungsbedürftig ist jedoch das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren. Dieser Aspekt stellt damit die Basis für die Fragestellung dieser Untersuchung dar.

3. Abgrenzung der Problemstellung & Lösungsansatz

3.1 Motivation und Ziele

Die komplexen theoretischen Zusammenhänge, welche das breite Spektrum verschiedener Einflüsse auf das Verhalten von Biopolymerlösungen aufzeigen, fordern sehr differenzierte Überlegungen zur Problemstellung.

Grundsätzlich stehen mit der Flory-Huggins Theorie bzw. der Relation der zweiten Virialkoeffizienten zwei theoretisch fundierte Werkzeuge zur Voraussage des thermodynamischen Verhaltens von Polymermischsystemen zur Verfügung. Ihre Anwendung auf Biopolymermodellsysteme ermöglicht eine sehr gute Basis für die engere Auswahl von Faktoren bzw. Variablen, die für das Verständnis makroskopischer Phänomene in Mischungen von lebensmittelrelevanten Makromolekülen eine Rolle spielen. Insbesondere bei Synergismen zwischen zwei Lebensmittelinhaltsstoffen kann auf diese Weise ein rein deskriptiver Ansatz um eine fundierte wissenschaftliche Basis ergänzt werden. So bilden die aus Modellsystemen abgeleiteten thermodynamischen Gesetzmässigkeiten die Grundlage für eine Voraussage der Kompatibilität verschiedener Biopolymere in realen Lebensmitteln. Für einen systematischen Einsatz von Biopolymeren gemäß ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften in komplexen Systemen müssen jedoch auch sekundäre Einflussfaktoren, welche mit zunehmender Komplexität der Lebensmittel auftreten, erfasst werden, was aber in etablierten Modellversuchen kaum erfolgte. Neben Wechselwirkungen mit minoren Komponenten umfasst dies zunehmend auch prozessinduzierte Modifikationen von Inhaltsstoffen. Aufgrund der Einschränkungen, die bei der Beschreibung der theoretischen Grundlagen deutlich wurden, wird daher bei der Realisierung von realen komplexen Lebensmittelsystemen nach wie vor stark auf empirische Erfahrungswerte zurückgegriffen.

Die vorliegende Arbeit hat also zum Ziel, den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Kompatibilität von Biopolymermischsystemen anhand praxisrelevanter Beispiele aufzuzeigen und auf der Basis relevanter wissenschaftlicher Grundlagen zu diskutieren. Dazu werden die Auswirkungen ausgewählter Prozessvariablen auf die physikalischen Eigenschaften von Mischsystemen systematisch erfasst. Etablierte Modellsysteme dienen als Grundlage für die Diskussion der Auswirkungen der Prozessführung. Diese Synthese von aus Grundlagenforschung abgeleiteten Aussagen mit der wissenschaftlich-systematischen Erfassung prozessabhängiger Phänomene an realen Lebensmittelsystemen führt zu einem besseren Verständnis für das Zusammenspiel von Biopolymeren in komplexen Systemen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der wissenschaftlichen Erfassung prozessabhängiger Phänomene an komplexen Biopolymermischungen, welche in ihrer Zusammensetzung möglichst nahe realen Lebensmitteln nachempfunden sind. Dies bedeutet jedoch aufgrund des natürlichen Ursprungs der Inhaltsstoffe, dass im Vergleich zu synthetischen Polymeren die beteiligten Biopolymere einen deutlich höheren Polydispersitätsgrad aufweisen. Damit ist eine gewisse Streuung der Systemeigenschaften unvermeidbar. In diesem Zusammenhang müssen zudem auch

die Einschränkungen der theoretischen Grundlagen bei der Erfassung von absoluten Wechselwirkungsparametern, Grenzwerten u.ä. bei Mischungen mit polyionischen Makromolekülen bedacht werden. Es wird daher das Ziel gesetzt, die Möglichkeiten zur Beschreibung von Mischungseigenschaften mit alternativen Erfassungsmethoden auszuloten und im Rahmen der naturwissenschaftlichen und labortechnischen Gegebenheiten zu messen.

Die offene Frage nach dem Einfluss der Herstellungsbedingungen auf das thermodynamische Verhalten von Biopolymermischungen kann dann anhand der Untersuchung und Gegenüberstellung von ausgewählten Mischgeleigenschaften praxisrelevanter Beispiele beantwortet werden.

Die Arbeit stellt damit eine unbedingt notwendige wissenschaftliche Ergänzung zu den aktuellen Ergebnissen von rein grundlagenorientierten Arbeiten an einfachen, prozesstechnisch unbeeinflussten Biopolymermischsystemen dar, indem sie eine systematische Erfassung und Diskussion von statistisch signifikant erfassbaren, prozessabhängigen Mischsystemmodifikationen bereitstellt. Sie erweitert damit den grundlagenorientierten Kenntnisstand um einen wichtigen Bezug, der notwendig ist, um wissenschaftliche Erkenntnisse auf anwendungsorientierte Biopolymerapplikationen zu übertragen.

3.2 Lösungsansatz

Als Lösungsansatz wird eine systematische Variation nachfolgend genannter Prozessparameter und Prozessabläufe bei der Herstellung verschiedener definierter komplexer Biopolymermischungen gewählt. Der Bezug auf eine Standardmischung und der Vergleich gezielt modifizierter Prozessvarianten erlauben im Zusammenspiel mit Ergebnissen aus reinen Grundlagenarbeiten, die Rolle einzelner Biopolymere nachzuvollziehen. Erkenntnisse aus dieser indirekten Methodik werden unter Verwendung der physikalisch-chemischen Grundlagen diskutiert.

Als Untersuchungsgegenstand werden zwei praxisrelevante Biopolymermischungen auf Milchbasis gewählt. Die Auswahl orientiert sich am pH-Wert, an dem die Milchproteine vorliegen, und an der Elektronegativität der funktionellen Gruppen des Polysaccharids. Als Beispiel für ein neutrales Milchmischsystem mit einem Polysaccharid mit starker Wechselwirkungskapazität wird daher ein Milchprotein-Carrageenansystem gewählt. Das Beispielsystem für saure Milchsysteme und Polysacchariden mit schwächeren elektrostatischen Wechselwirkungen kommt in einer Mischung von Milchproteinen mit Pektin bei pH 4 zur Anwendung.

Die Auswahl der untersuchten Prozessparameter orientiert sich an grundsätzlich wichtigen Herstellungsmethoden bzw. Variablen in etablierten Verfahren:

- Vorherhitzungsbedingungen (Temperatur, Dauer, einzelne Biopolymere)
- Mischungszeitpunkt der Biopolymere
- Haupterhitzungsschritt / UHT-Behandlung
- Kühlrate
- Scherkräfte / Homogenisation

Der Problematik der Streuung der Bedingungen für einen Phasenübergang aufgrund der Biopolymerpolydispersität wird dadurch begegnet, dass reproduzierbare Mischsystemeigenschaften zur Beschreibung des thermodynamischen Verhaltens herangezogen werden. Die Erfassung dieser reproduzierbaren Eigenschaften ermöglichen verschiedene rheologische Messungen der Gesamtmikrostruktur:

1.) Messung der maximalen Schubspannungsbelastung der Mischsystemstruktur durch Applikation einer Fließkurvenprozedur.
2.) Zerstörungsfreie oszillatorische Messung des elastischen und viskosen Anteils zur Beurteilung, ob ein Phasenübergang zu einer durchgehenden Netzwerkstruktur vorliegt.

Ergänzt wird dies durch die Erfassung der Partikelgrößenverteilung und ihrer Relation zu verschiedenen Prozessbedingungen und Mischsystemzusammensetzungen. Im Zusammenspiel mit Ergebnissen aus der aktuellen Fachliteratur, wie z.B. dem im Grundlagenteil bereits vorgestellten Phasendiagramm von SCHORSCH ET AL. (2000), kann auf die jeweiligen durch das Prozessverfahren bedingten Modifikationen in der Mikrostruktur der Biopolymersysteme geschlossen werden.
Mit Hilfe derart ausgewählter Stoffsysteme und unter Einsatz der zur Verfügung stehenden Messmethoden zur Erfassung von Inkompatibilitätsphänomenen sollen nach Variation von markanten Prozessfaktoren nach Möglichkeit molekulare oder mikrostrukturelle Effekte aufgezeigt und mit ihren auslösenden Faktoren korreliert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Milch

Als Basis für die Biopolymermischungen wurde entrahmte Rohmilch (Staatliche Molkerei Weihenstephan, Freising, Deutschland) verwendet. Die Magermilch wurde unmittelbar nach der Trennung der Rahmphase nach dem Separator aus dem laufenden Produktionsprozess entnommen und vor der Weiterverarbeitung auf 4 °C gekühlt. Der Proteingehalt betrug 3,4 %, der Restfettgehalt weniger als 0,05 %. Die Magermilch hatte bis zu diesem Zeitpunkt eine Erwärmung auf maximal 60 °C erfahren, dementsprechend wies die Molkenproteinfraktion noch keinen denaturierten Anteil auf.

Milchpulver

Bei Biopolymermischungen mit Milchproteingehalt über 3,4 % fand Magermilchpulver (BMI, Landshut, Deutschland) Verwendung. Als "low heat"-Typ enthält es einen Anteil von denaturierten Molkenproteinen von 5 % bezogen auf den Gesamtmolkenproteingehalt.

Milchserum

Milchserum diente zur Variation des Milchproteingehaltes bei konstanter Ionenstärke bzw. Serumionenzusammensetzung. Als Ausgangsbasis dient Magermilch. Sie wurde auf 50 °C erwärmt und bei einer Trenngrenze von 5 kDa ultrafiltriert (Filtron Technology Corporation, Northborough, USA). Der Filtrationsvorgang wurde an dem Zeitpunkt beendet, an dem das halbe Ausgangsvolumen als Milchserum auf der Permeatseite der Membran abgeschieden war.

Carrageenan

Bei dem verwendeten Carrageenan handelte es sich um einen κ-/ι-Hybridtyp (kappa-2-Carrageenan) aus *Sarcothalia crispata* (Danisco Cultor, Braband, Dänemark) aus nur einer Charge. Das mittlere Molekulargewicht dieser Charge wurde mit 186.280 g/mol angegeben. Das Verhältnis von κ- zu ι-Einheiten betrug 0,6 und wurde mittels FT-IR-Analyse bestimmt (Hansen et al., 1999). Als Kalibrierungsreferenz diente hierbei κ- bzw. ι-Carrageenan von Sigma (St. Louis, USA). Auf eine bestimmte Gelstärke standardisiertes Carrageenan unterscheidet sich von unstandardisierten (reinen) Carrageenan durch einen Dextrosezusatz, der hinsichtlich der Strukturbildung eines Carrageenan-Milchproteinnetzwerks als inertes Material gilt.

Pektin

Als Pektin kam hochverestertes Pektin (Danisco Cultor, Braband, Dänemark) mit einem Veresterungsgrad von 82 % zum Einsatz.

Weitere Mischsystemkomponenten

Zur Verminderung der hydrophoben Gesamtoberfläche wurde als Zusatz bei Carrageenan-Milchproteinsystemen das noch nicht verfügbare, in Entwicklung befindliche Handelsprodukt RheoRanger eingesetzt (Noveon, Cleveland, USA). Dieses enthält das aus dem Endosperm von *Cassia tora* bzw. *Cassia obtusifolia* gewonnene Polysaccharid Cassia, dessen Molekülaufbau ein

Verhältnis von 5 bis 6 Mannoseeinheiten pro Galactosemolekül aufweist. Die Kontaktfläche für hydrophobe Anlagerungen an Carrageenanstränge ist daher größer als bei anderen Galactomannanen, wie z.B. bei Johannisbrotkernmehl (4 Mannoseeinheiten pro Galactoseeinheit).

Gesäuerte Milchprotein-Pektinmischungen beinhalteten Zucker (Südzucker, Nürnberg, Deutschland) und wurden mit Citronensäure (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) bzw. Joghurtkultur gesäuert (culture 709, Danisco Cultor, Braband, Dänemark). Der Säuerungsverlauf ist bei den jeweiligen Versuchen im Prozessschema beschrieben.

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung der Biopolymermischungen

Die Herstellung der Biopolymermischungen erfolgte in kontinuierlichem Prozessablauf an einer Technikumsanlage im Pilotmaßstab. Die Anlage gliedert sich in folgende frei kombinierbare und anordnungsbare Prozessschritte: Vorerhitzung mit Heißhaltestrecke variabler Länge, UHT-Erhitzung bis 140 °C mit Heißhaltestrecke variabler Länge, aufteilbarer Kühlschritt, Hochdruckhomogenisation bis 100 MPa (APV Type R16,56, Albertslund, Dänemark). Details zur Pilotanlage und insbesondere zum UHT-Erhitzungsabschnitt sind bei HORAK (1980) dokumentiert (Abb. 4.1).

Die in dieser Arbeit verwendeten Prozessvariablen und die Anordnung der Prozessschritte bei Herstellung der verschiedenen Biopolymermischungen sind jeweils im entsprechenden Ergebnisteil in einer Abbildung dargestellt. Von jeder Mischungszusammensetzung wurden mindestens 2 unabhängig zubereitete Chargen zu je 40 L hergestellt. Diese Chargen dienten jeweils

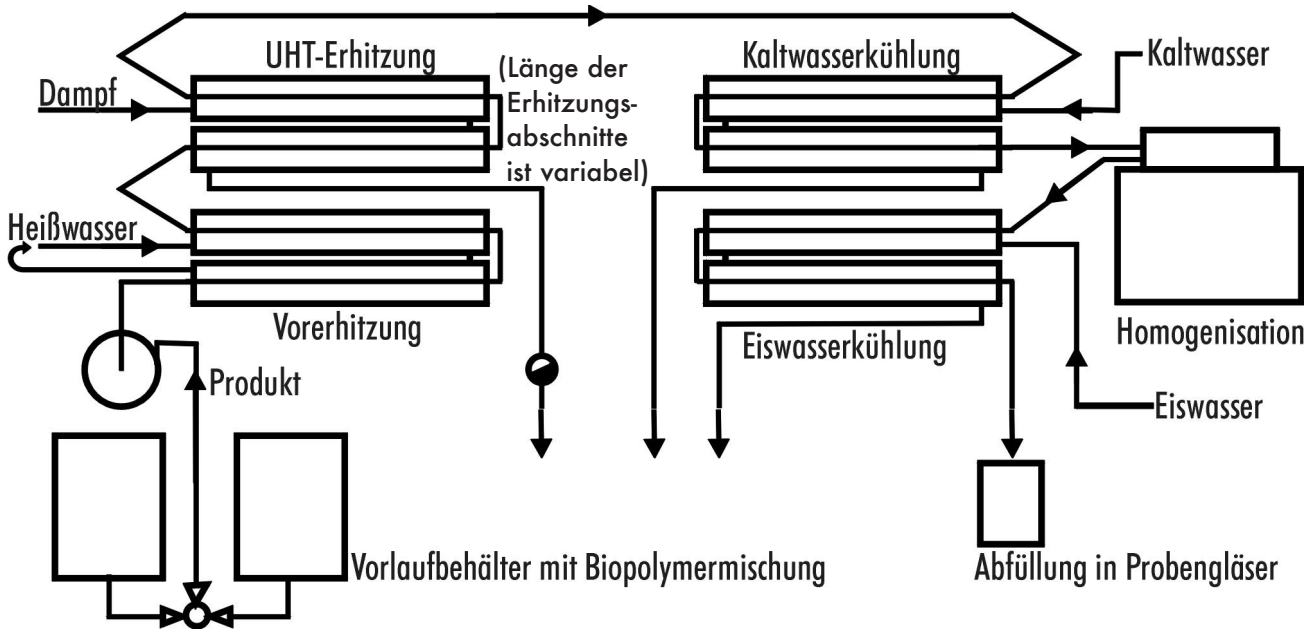

Abb. 4.1: Prozessschema der verwendeten UHT-Pilotanlage.

bei der Untersuchung der Prozessgrößenvariation als Ausgangsbasis, d.h. die ausgewählte Prozessvariable wurde während der Verarbeitung jeder einzelnen Charge schrittweise verändert. Nach jeder Veränderung der Prozessvariablen wurde mit enthärtetem Wasser zwischengespült und konstante Herstellungsbedingungen abgewartet.

Tabelle 4.1 zeigt vorab eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Mischsystemvarianten von Milchsystemen mit Carrageenanzusatz. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die in den einzelnen Experimenten durchgeführten Prozessvariationen an Carrageenan-Milchproteinsystemen. Im Ergebnisteil werden die Experimentnummern jeweils in der Bildunterschrift der Abbildung des Prozessschemas genannt.

Abweichend von dem in Abb. 4.1 gezeigten Prozessschema wurde der Homogenisationsschritt bei gesäuerten Milchsystemen mit Pektinzusatz bereits vor den Erhitzungsschritten durchgeführt. Ein detailliertes Schema wird im Ergebnisteil jeweils zu den einzelnen Versuchen angeführt. Tabelle 4.3 zeigt vorab eine Übersicht über die Mischungsvarianten der gesäuerten Pektin-Milchsysteme, während Tabelle 4.4 die Prozessvariationen der einzelnen Experimente mit gesäuerten Mischsystemen auflistet.

Tab. 4.1: Übersicht der Variationen von untersuchten Milchsystemen mit Carrageenanzusatz.

Carrageenangehalt [%] / sonstiges	Milchprotein-gehalt [%]	Vorerhitzungsdauer bei 95 °C / sonstiges	Bezeichnung zum Vergleich (=System)	siehe Experiment Nr.
0,02; 0,04; 0,06 mit Dextrose standardisiert	3,4	2,4 s; Kühlendtemperatur 4 oder 14 °C	mit 0,04 % standard. Carrageenan: System a	1; (2)
0,020; 0,025; 0,030; 0,040 unstandardisiert (=reines Carrageenan ohne Dextrosezusatz)	3,4	2,4 s	mit 0,025 % reinem Carrageenan: System A	(1); 2; 3; 4
0,020; 0,025; 0,030; 0,040 unstandardisiert (= reines Carrageenan ohne Dextrosezusatz); in Exp.Nr. 9 z.T. mit Cassiazusatz	2,8; 3,4; 4,0	187 s; in Experiment 5 modifizierte UHT-Erhitzung	mit 3,4 % Protein und 0,025 % Carrageenan: System B	3; 4; 5; 6; 7; 9
0,025 unstandardisiert (=reines Carrageenan ohne Dextrosezusatz)	3,4	187 s Milchproteine getrennt + 187 s alles gemeinsam = 374 s gesamt	System C	4
0,025 unstandardisiert	3,4	357 s	System D	4
0,025 unstandardisiert	3,4	187 s; Homogenisation bei 10 °C	System E	7
0,040 unstandardisiert	3,4	187 s; Homogenisation bei 10 oder 62 °C	System F	8

Tab. 4.2: Übersicht der Prozessvariationen in Experimenten mit Carrageenan-Milchproteinsystemen.

Experiment Nr. (Kapitel)	Ziel der Versuchsreihe	Prozessvariation	untersuchte Systeme und weitere Variationen der Mischungen
1 (5.1.2)	Nachweis von prozessinduzierten Veränderungen des Mischsystems	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Kühlendtemperatur: 4; 14 °C	a; z.T. A
2 (5.1.3 und 5.1.7)	Einfluss des UHT-Schritts und der Mischungszusammensetzung	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C	A; z.T. a Biopolymerkonzentration
3 (5.1.4)	Einfluss der Vorerhitzung	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Vorerhitzungszeit: 2,4; 187 s	A; B
4 (5.1.4)	Einfluss des Mischungszeitpunkts (Rolle der Molkenproteine)	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Gemeinsame Vorerhitzungszeit: 2,4; 187; 357 s Getrennte Vorerhitzung der Proteine: 187 s	A; B; C; D
5 (5.1.5)	Einfluss der UHT-Heißhaltezeit (Arrheniusplot)	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C UHT-Aufheizrampe verkürzt UHT-Heißhaltezeit: 2,5; 11,0; 24,0 s	B
6 (5.1.6)	Einfluss von Scherkräften (Homogenisationsdruck)	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Homogenisation: 20; 30; 40; 50; 80 MPa bei 62 °C	B
7 (5.1.6)	Einfluss der Homogenisationstemperatur	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Homogenisationsdruck: 20; 30; 40; 50; 80 MPa Homogenisationstemperatur: 10; 62 °C	B; E
8 (5.1.6)	Einfluss von Scherkräften auf Mischungen mit hoher Packungsdichte	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C Homogenisationsdruck: 20; 80 MPa Homogenisationstemperatur: 10; 62 °C	F
9 (5.1.6)	Einfluss der Wechselwirkungskapazität von Carrageenan	UHT-Temperatur: 120; 125; 132; 135; 139 °C	B Biopolymerkonzentration (Gesamtmenge; Cassiazusatz)

Tab. 4.3: Übersicht der Variationen von untersuchten gesäuerten Milchsystemen mit Pektinzusatz.

Milchproteingehalt [%]	Pektingehalt [%]	Biopolymer-verhältnis	Serumzusammensetzung	Bezeichnung zum Vergleich (=System)	siehe Experiment Nr.
3,2	0,16	20:1	Milchserum + Wasser im Verhältnis 1:1	System X	10
3,2	0,32	10:1	Milchserum + Wasser im Verhältnis 1:1	System Y	11
3,2	0,32	10:1	Milchserum	modifiziertes System Y	12
1,2	0,32	3,75:1	Milchserum + Wasser im Verhältnis 1:1	System Z	13

Tab. 4.4: Übersicht der Prozessvariationen in Experimenten mit gesäuerten Pektin-Milchproteinsystemen.

Experiment Nr. (Kapitel)	Ziel der Versuchsreihe	Prozessvariation	untersuchte Systeme und weitere Variationen der Mischungen
10 (5.2.2)	Einfluss von Scherkräften (Partikelgrößenverteilung) und der Mischungszusammensetzung	Homogenisationsdruck: 20; 30; 45; 60; 70 MPa	X; Y; Z
11 (5.2.3)	Einfluss von minoren Komponenten auf Systeme an der Grenze zur Instabilität	Homogenisationsdruck: 20; 30; 45; 60; 70 MPa	Y; modifiziertes Y Serumzusammensetzung bzw. Ionenstärke
12 (5.2.4)	Einfluss der Vorerhitzung	Homogenisationsdruck: 20; 30; 45; 60; 70 MPa Vorerhitzungszeit: 0; 360 s	Y; Z
13 (5.2.5 und 5.2.6)	Einfluss des finalen Erhitzungsschritts	Homogenisationsdruck: 20; 30; 45; 60; 80 MPa nachfolgende Erhitzung: 73; 85; 95; 120; 140 °C	Z

4.2.2 Charakterisierung der Biopolymermischungen

Rheologische Messungen mit großer Auslenkung

Die Messungen wurden an einem spannungsgesteuerten Rheometer (AR1000N, TA Instruments, New Castle, USA) unter Verwendung einer Platte-Platte-Geometrie (Acryl, Radius 3 cm) bei 7 °C durchgeführt. Der Aufbau der Messprozedur orientiert sich an einer Fließkurvenmethode von Rodd et al. (2000) und gliedert sich in drei Schritte:

1.) Zur Eliminierung von undefinierten Schereffekten beim Einfüllen des Probenaliquots in das Messgerät erfolgt zuerst eine definierte Vorscherung mit einer Schubspannung von 6 Pa für eine Dauer von 3 Minuten.
2.) Danach folgt eine Ruhephase von 15 min im Rheometer. Die Probe kann während dieser Pause ihre Struktur wieder aufbauen bzw. stabilisieren.
3.) Darauffolgend wird diese Ruhestruktur gemessen und zur Charakterisierung herangezogen. Die Mischsystemcharakterisierung beruht auf der Erfassung der Viskosität in Abhängigkeit von der Schubspannung im Bereich von $5 \cdot 10^{-3}$ Pa bis 20 Pa. Die Gesamtdauer von Aufwärts- und Abwärtsrampe der Schubspannungsbelastung beträgt 30 Minuten.

Aus dieser Messmethode mit großer Auslenkung ergeben sich folgende rheologische Kennzahlen:

a) Hystereseﬂäche

Zur Abschätzung der Qualität des Strukturaufbaus wurde die eingeschlossene Fläche zwischen Aufwärts- und Abwärtsrampe gewertet (Hystereseﬂäche). Um möglichen Artefakten in den Grenzbereichen der Messmethode vorzubeugen, wurde die Vergleichsfläche auf den Bereich zwischen 0,2 bis 4 Pa beschränkt (Abb. 4.2). Die Differenz zwischen der Aufwärtsrampe, also dem Zustand vor hoher Scherbelastung, und der Abwärtsrampe (Zustand nach Scherbelastung) kann mit der Arbeit gleichgesetzt werden, die nötig ist, um die Ruhestruktur zu zerstören. Nach Gehm (1998) ergibt sich ein Wert für diese Arbeit aus einer Multiplikation von Hystereseﬂäche und Probenvolumen.

b) Strukturpunktanalyse

Für eine differenziertere Betrachtung der Mikrostruktureigenschaften wurde die Bestimmung des Strukturpunkts nach Schenz (1997) herangezogen (Abb. 4.2). Dieser Strukturpunkt wird durch ein lokales Maximum in der Viskositätskurve während der Aufwärtsrampe der Schubspannungsbelastung definiert. Der verzögerte Viskositätsabfall bei diesem Schubspannungswert deutet auf eine Überdehnung mit anschließendem plötzlichen Auseinanderreißen eines Großteils der in der Ruhestruktur enthaltenen Assoziationen zwischen den einzelnen Inhaltsstoffen hin (Schenz, 1997).

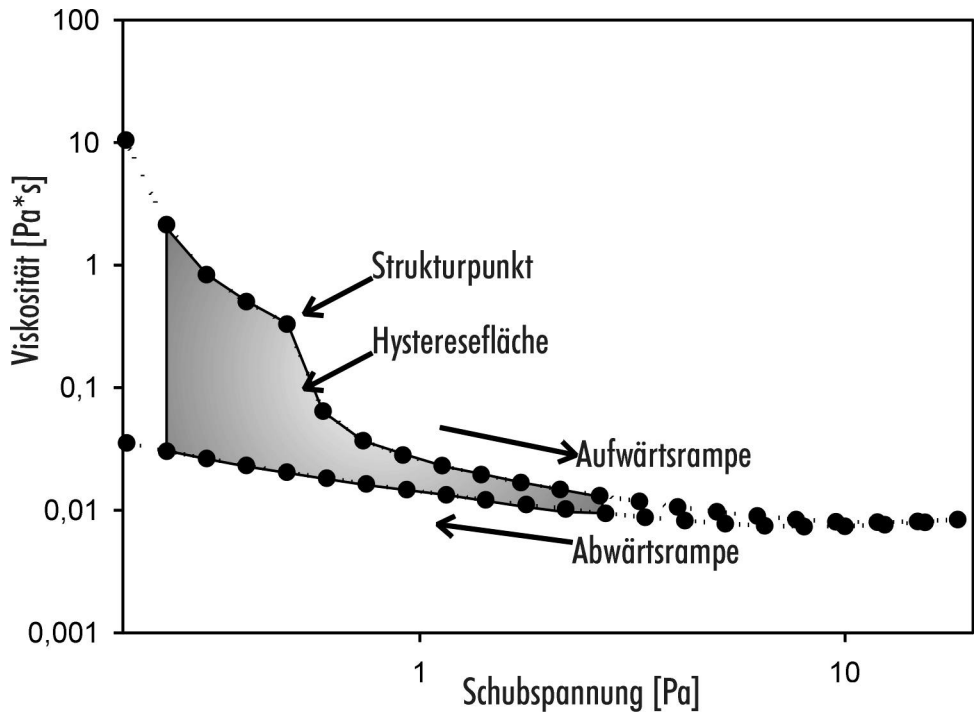

Abb. 4.2: Bestimmung des Strukturpunkts nach Schenz (1997).

c) Spannungsstabilität (Strukturzusammenbruch bei Überbelastung am Strukturpunkt)

Zur Beurteilung der Stabilitätskräfte, welche die Mischsystemstruktur gegenüber applizierten Schubspannungen aufbringen kann, wird der Betrag der Schubspannungsbelastung herangezogen, an dem ein lokales Maximum gegenüber einer Standardausgleichsfunktion in der Viskositätskurve zu verzeichnen ist (Abb. 4.3). Zur objektiven Erfassung des lokalen Maximums wurden die Messdaten mit Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) mathematisch analysiert (SCHRÜFER, 1992). Die Spannungsstabilität ergibt sich damit aus der Widerstandskraft der Struktur gegenüber einer angelegten Schubspannung. Sie wird daher auch gleichbedeutend als Strukturstabilität, Schubspannungsstabilität oder Widerstandsvermögen bezeichnet.

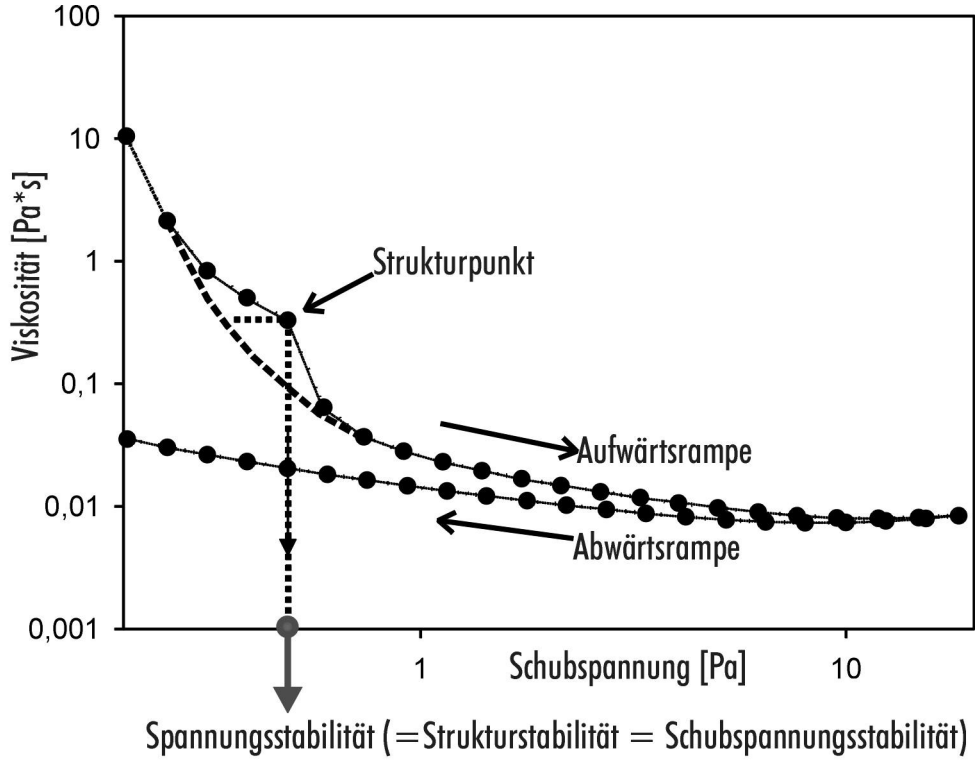

Abb. 4.3: Beispiel zur Bestimmung der Spannungsstabilität.

d) Viskositätsabfall am Strukturpunkt

Die Höhe des Viskositätsabfalls am Strukturpunkt erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl und Art der Bindungen, die bei Überscherung in der Struktur gelöst werden. Der Wert ergibt sich aus der Differenz der unmittelbar am und nach dem lokalen Maximum des Strukturpunkts gemessenen Viskositätswerte (Abb. 4.4). Ein geringer Viskositätsabfall in einer flach fallenden Kurve deutet dabei auf ein allmähliches Auseinanderbrechen der Struktur bei steigender Schubspannungsbelastung hin. Ein vergleichbares Verhalten findet sich beispielsweise im Aufbrechen von Aggregaten in Partikelgelen. Findet sich dagegen ein deutlicher Viskositätsunterschied in einem steilen Kurvenverlauf, so kann dies einem schlagartigen Abriß einer größeren Anzahl von Assoziationsstellen zugeschrieben werden.

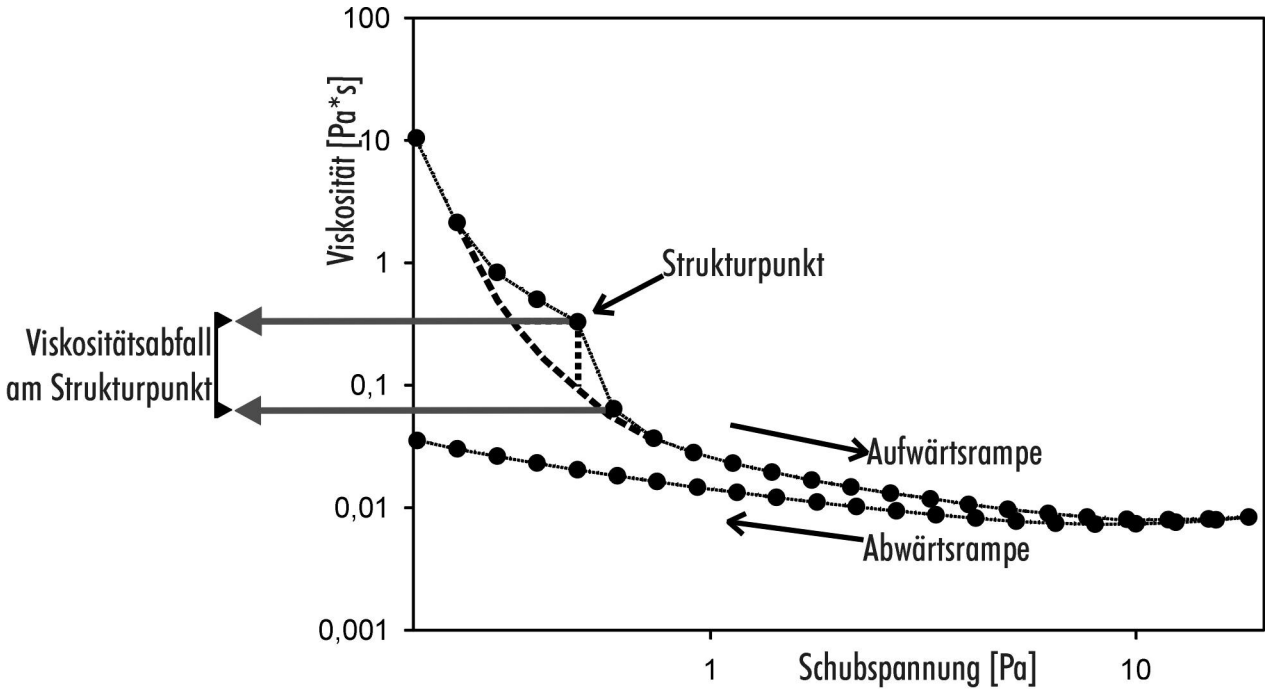

Abb. 4.4: Beispiel zur Bestimmung des Viskositätsabfalls am Strukturpunkt.

Zerstörungsfreie, oszillierende rheologische Messungen

Um ein vollständiges Bild der Mischsystemeigenschaften zu erhalten, wurde ein Aliquot aus der gleichen Probe parallel zu der oben genannten rheologischen Messung mit großer Auslenkung auch einer zerstörungsfreien, oszillierenden Messmethode unterworfen. Die Messungen wurden an einem baugleichen Rheometer (AR1000N, TA Instruments, New Castle, USA) mit einer Rührbechergeometrie (SEDLMEYER ET AL., 2003B) durchgeführt. Der Ablauf dieser Messmethode gliedert sich in drei Schritte:

1.) Definierte Vorscherung mit einer Schubspannung von 6 Pa für 3 Minuten. Dies entspricht der definierten Vorscherung der bereits vorgestellten rheologischen Messmethode mit großer Auslenkung.
2.) Scherbelastungsfreie Ruhephase der Probe im Rheometer für 15 Minuten. Dies entspricht ebenfalls der o.g. rheologischen Methode mit großer Auslenkung. Dabei wird bereits eine zerstörungsfreie Messung der Entwicklung des elastischen Anteils (G') und des viskosen Anteils (G'') mit einer Schubspannung von 0,005 Pa (entspricht einer Auslenkung <0,01 rad) bei einer Oszillationsfrequenz von 0,1 Hz durchgeführt.
3.) Danach erfolgt die eigentliche Messung des in der Ruhephase aufgebauten elastischen Anteils (G') und des viskosen Anteils (G'') mit einer Schubspannung von 0,005 Pa über ein Frequenzspektrum von 0,01 Hz bis 3 Hz.

Aus dieser zerstörungsfreien, oszillierenden Messmethode ergeben sich folgende rheologische Kennzahlen:

a) Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit

Grundsätzlich bedeutet der erste Schritt dieser Messprozedur eine definierte partielle Zerstörung der in das Rheometer eingebrachten Mischsystemstruktur. Diese Nivellierung der Strukturelemente ist notwendig, um Verfälschungen der rheologischen Messungen durch Artefakte und damit die Variabilität aufgrund des Befüllungsvorgangs auszuschließen. Im anschließenden zweiten Schritt fügen sich die Strukturelemente innerhalb einer vorgegebenen Zeit t_R wieder zu einer Ruhestruktur zusammen. Dieser Vorgang wird aber nicht durch die oszillierenden Messschwingungen mit kleiner Auslenkung gestört. Die zerstörungsfreie Erfassung von G' und G" während Schritt 2 der Messmethode ermöglicht damit die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der sich die Struktur nach der definierten Scherbelastung in Schritt 1 wieder rekonstituiert. Das Verhältnis von G' zu G" spiegelt sich in der Phasenverschiebung wider und wird als Phasenwinkel δ ausgedrückt. An die Messdaten (Abb. 4.5) lässt sich sehr gut (Bestimmtheitsmaß R^2=0,95 bis 0,99) folgende nicht-lineare Kurvengleichung anpassen, wobei d_R einer experimentell zu ermittelnden Konstante und v_w der Steigung der Kurvenanpassung der Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit während der Ruhezeit t_R entspricht:

$$\delta = d_R + v_w \cdot \ln(t_R) \qquad \text{(Gl. 4.1)}$$

Die Steigung gibt damit die zeitabhängige Veränderung des elastischen Anteils im Verhältnis zum viskosen Anteil in Grad Phasenwinkel δ pro Zeit wieder. Da der Betrag von δ im direkten

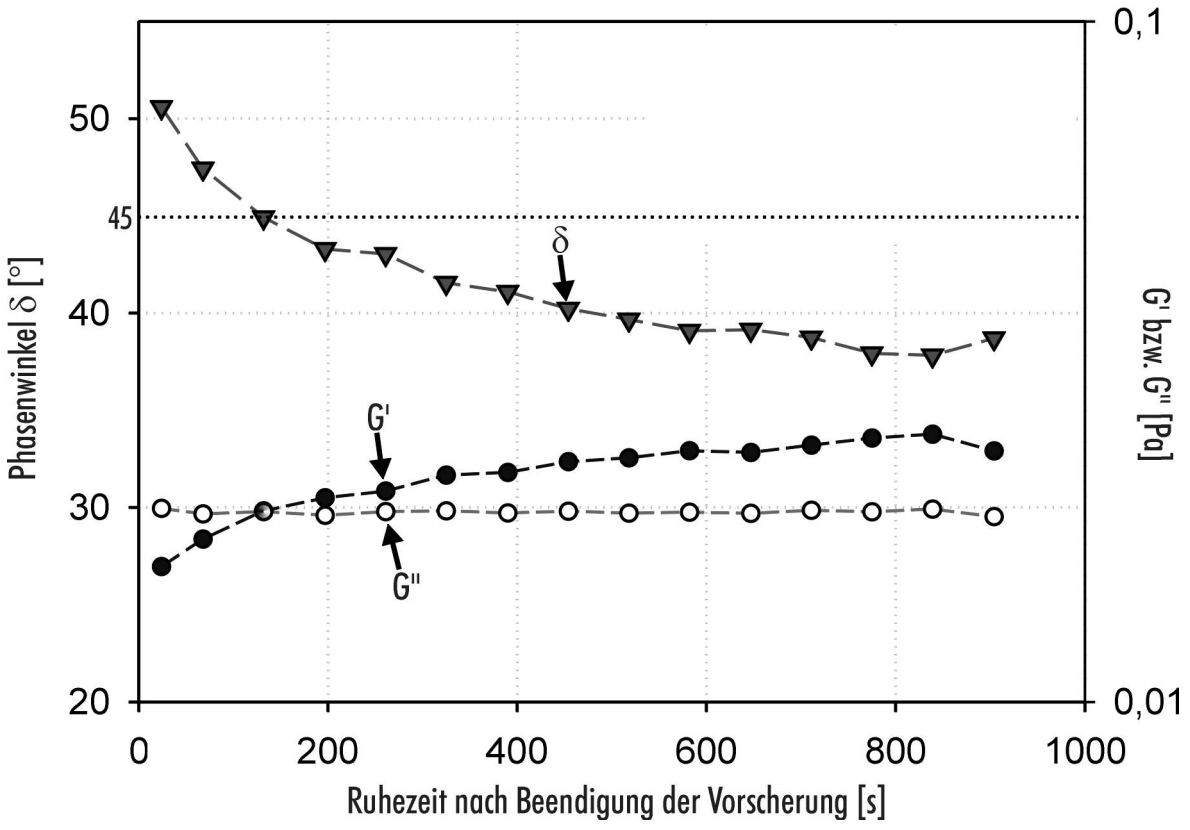

Abb. 4.5: Beispiel für eine Messung der Rekonstitutionsgeschwindigkeit in Schritt 2 der oszillatorischen Messprozedur. Die Vorscherung erfolgte bei einer Schubspannung von 6 Pa über eine Dauer von 3 Minuten.

Zusammenhang mit dem prozentualen Anteil an elastischer Struktur im Volumen steht, wird von einer Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit gesprochen.

b) Phasenwinkel δ

Die Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Antwortschwingung bei einer oszillierenden rheologischen Messung wird im Wert des Phasenwinkels δ festgehalten. Der Wertebereich von δ liegt damit zwischen 0° und 90°. Im Wert von δ spiegelt sich das Verhältnis von elastischem zu viskosem Anteil wider. Abhängig von δ werden zwei Fälle unterschieden:

1.) Bei Werten des Phasenwinkels über 45° dominiert der viskose Anteil. In diesem Fall repräsentiert der (geringere) elastische Anteil unzusammenhängende Gelflocken im System (Abb 4.6 links).

2.) Bei einem Phasenwinkel mit einem Betrag unter 45° überwiegt dagegen der elastische Anteil im System. Dies bedeutet die Existenz einer durchgehenden, zusammenhängenden Netzwerkstruktur, die für die elastische Antwort auf die Schubspannungsbelastung verantwortlich ist (Abb 4.6 rechts). Der viskose Anteil beruht dagegen auf eingeschlossenen Bereichen, in denen ungebundenes, frei bewegliches Serum eingeschlossen ist.

Als Kriterium für die Phasengrenze zwischen durchgehender Netzwerkstruktur und unzusammenhängenden, zur Entmischung neigenden Gelflocken wird daher ein Phasenwinkel von 45° herangezogen (Abb. 4.6).

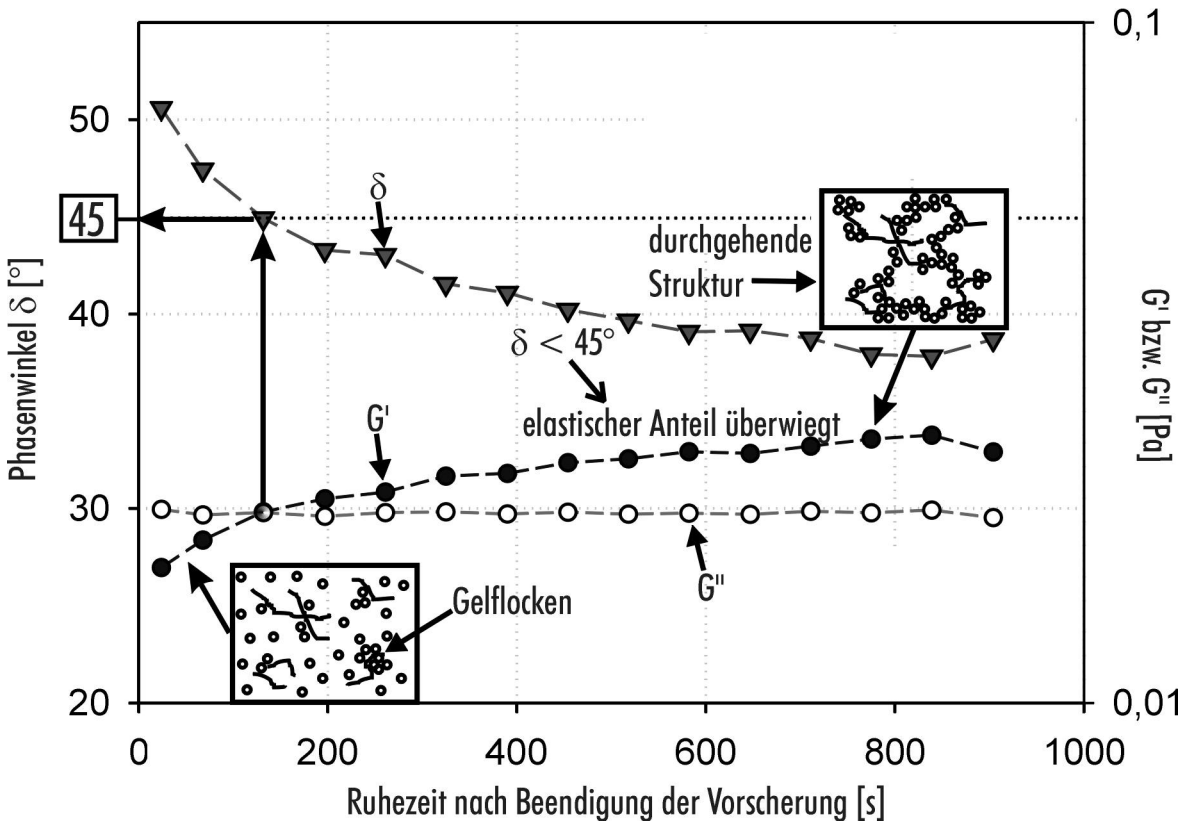

Abb. 4.6: Schematische Darstellung des mikrostrukturellen Hintergrunds bei der Messung des Phasenwinkels δ.

c) Vernetzungsgrad (Frequenzspektrumsanalyse)

Als Kennzahl für den Vernetzungsgrad der Mischsystemstruktur wurde die Steigung von G' über der Frequenz bei doppellogarithmischer Auftragung verwendet. Die Abhängigkeit des elastischen Anteils von der Anregungsfrequenz basiert auf den Resonanzfrequenzen der im System vorhandenen Einheiten assoziierter Inhaltsstoffe.

Die Abhängigkeit des elastischen Anteils vom jeweiligen Frequenzwert wird im dritten Abschnitt der Messprozedur in einem Frequenzspektrum von 0,01 Hz bis 3 Hz aufgenommen. Der Vernetzungsgrad ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden zwischen G' und dem Frequenzwert.

Partikelgrößenmessungen

a) Dynamische Lichtstreuung

Parallel zu beiden o.g. rheologischen Methoden wurde die Partikelgrößenverteilung eines Aliquots aus der gleichen Probenabfüllung mittels Photonenkorrelation mit einer Anregung bei 632,8 nm bestimmt (N4+, Coulter, Pasadena, USA). Die Probe wurde dazu in einem Verhältnis von 5:200 mit Milchserum verdünnt. Die Messung einer Verdünnung wurde bei einem Detektorwinkel von 90° sechsmal wiederholt, ihre Resultate bilden die Hauptgrundlage für die Bestimmung der mittleren Partikelgröße von Proteinclustern in Carrageenan-Milchproteinmischungen. Die Messungen wurden unimodal ausgewertet, d.h. es wurde eine eingipflige Verteilung angenommen, um den Schwerpunkt auf das Dichtemittel zu legen (PRECHT ET AL., 1992). Aufgrund des Messbereichs von 3 bis 3000 nm kann der unimodale Mittelwert den Proteinclustern zugeschrieben werden, da sie das Hauptsignal für die dynamische Lichtstreuung in diesem Detektionsbereich verursachen. Um ein genaueres Bild des inneren Aufbaus bzw. zur Bestimmung der fraktalen Dimension dieser Partikelaggregate zu gewinnen, wurden bei ausgewählten Systemen ergänzende Messungen bei einem Detektorwinkel von 62,5° mit drei Wiederholungen durchgeführt.

b) Statische Lichtstreuung

Bei den Untersuchungen gesäuerter Milchmischsysteme mit Pektin wurde die Partikelgrößenverteilung zudem in einer Verdünnung mit enthärtetem Wasser mittels statischer Lichtstreuung bei 750 nm bestimmt (LS230, Coulter, Pasadena, USA). Die Proben wurden vor der Verdünnung direkt im Messgerät mit einem Magnetrührer konditioniert. Zur Auswertung wurde bei Partikeln mit einer Größe von 1 bis 1000 µm die Fraunhofer Theorie angewendet, bei kleineren Partikeln (0,1 bis 1 µm) die Mie Theorie unter Verwendung eines Refraktionsindex von 1,41 (KENNEL, 1994). Von der auf diese Weise erhaltenen volumetrischen Partikelgrößenverteilung wurde der $d_{90,3}$ zur Beschreibung von Partikelclustern in den gesäuerten Mischsystemen gewählt (SEDLMEYER ET AL., 2004). Dies ist nicht mit der über dynamische Lichtstreuung gemessenen "mittleren Proteinclustergröße" der Carrageenan-Milchproteinsysteme zu verwechseln.

Sedimentationsanalysen

a) Zentrifugationsmethode

Der Anteil an abzentrifugierbarem Sediment wurde in Anlehnung an eine Methode von HAMMELEHLE (1994) und SCHKODA (1999) bestimmt. Als Zentrifugationsbedingung wurde eine Belastung von 3000 g für 20 min gewählt (Omnifuge, Heraeus Sepatech, USA). Nach einem Überkopfstellen für 5 min wurde das Sedimentsgewicht bestimmt und auf die Gesamtmasse der Probe bezogen.

b) Streulichtmethode

Die Sedimentationsgeschwindigkeit gesäuerter Mischsysteme wurde durch Lichtreflektion in Abhängigkeit von der Höhe des Probenröhrchens und der Lagerzeit gemessen (Turbiscan MA2000 classic, Formulaction, L'Union, Frankreich). Zur Beschleunigung von Entmischungsphänomenen wurde die Messung in einer Klimakammer bei 30 °C vorgenommen (BK 5060E, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland).

Weitere Analysen

a) Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden mit der Methode nach Dumas durchgeführt (FP-528, Leco, St.Joseph, USA).

b) Dichte

Die Dichtebestimmung erfolgte mit einem Biegeschwinger (chempro/Paar DMA 45, Anton Paar KG, Graz, Austria).

c) Oberflächenhydrophobizität

Zur Messung des Anteils hydrophober Oberflächen in der Mikrostruktur wurde eine Fluoreszenzmethode mit ANS nach ALIZADEH-PASDAR ET AL. (2000) angewendet. Das Verfahren nutzt die Anlagerung einer organischen Verbindung (Anthrone) an hydrophobe Abschnitte von Biopolymeren. Das Ausmaß an erfolgreichen hydrophoben Assoziationen lässt sich über photometrische Messung des emittierten Fluoreszenzsignals bestimmen.

d) zeta-Potential

Zur Bewertung der Oberflächenladung der Biopolymermischpartikel wurde das zeta-Potential mit einem Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) bestimmt. Drei Verdünnungsansätze (5:200) jeweils einer Probe wurden mit U-förmigen Einwegkapillarzellen (DTS 1060, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) bei 30 °C untersucht. Die elektrophoretische Mobilität in diesen Zellen wurde über die von Malvern Instruments patentierte M3-PALS Technik

bestimmt. M3 steht hierbei für eine Kombination von langsamen und schnellen Feldumkehrmessungen und PALS für eine Analyse von Lichtstreuung und -phase (Malvern Instruments Ltd., 2003). Ein Schema zur Messmethode ist in Abbildung 4.7 aufgetragen.

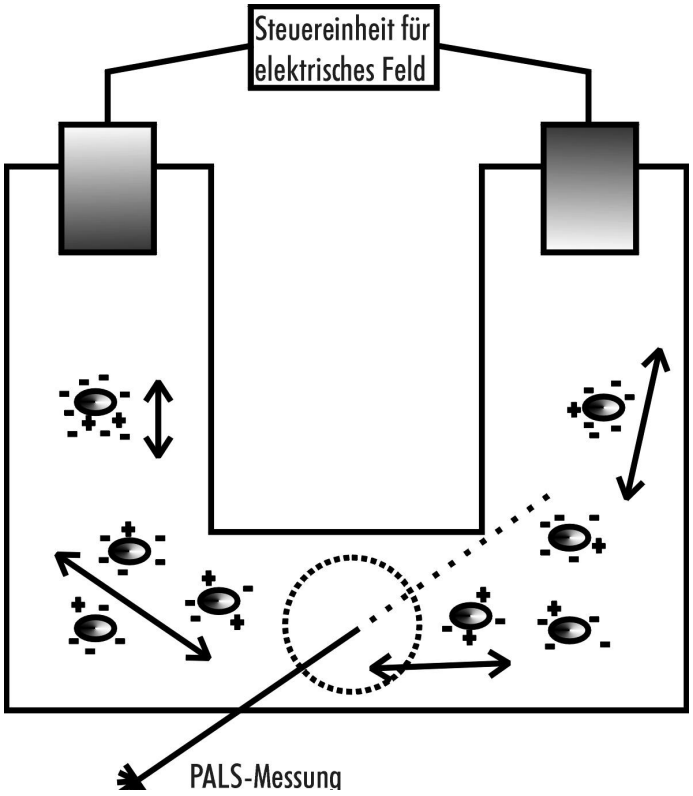

Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Messung des zeta-Potentials.

e) Abschätzung des Molekulargewichts

Prozessbedingte Veränderungen im Molekulargewicht der Biopolymere wurden durch Vergleichsmessungen der inneren Viskosität [η] erfasst. Damit der Wert der inneren Viskosität [η] zweifelsfrei einem Mischungsteilnehmer zugeordnet werden kann, wurde eine Biopolymerlösung ohne den zweiten Mischungsteilnehmer mit den entsprechenden Prozessvariationen behandelt. Als Datengrundlage zur Berechnung der inneren Viskosität [η] wurden Viskositätsmessungen mit einem spannungsgesteuerten Rheometer (AR1000N, TA Instruments, New Castle, USA) unter Verwendung einer Kegel-Platte-Geometrie (60 mm Durchmesser, Winkel 0° 59' 55", Messspalt 27 nm) bei 7 °C durchgeführt. Als Messwert diente die Viskosität bei einer Scherrate von 100 s^{-1} nach einer Scherung über 30 s. Die Viskositätsmessungen der Biopolymerlösungen und des biopolymerfreien Serums wurden mindestens achtmal wiederholt. Die Weiterverarbeitung der Messergebnisse und die Kurvenanpassungen erfolgten mit Statgraphics Plus 5.0 (StatPoint Inc., Herndon, Virginia, USA). Einsteins Gleichungen zur Berechnung des Formfaktors bilden die Grundlage zur Bestimmung der inneren Viskosität [η] als Korrelationskoeffizient zwischen der Konzentration des Biopolymers und der spezifischen Viskosität η_{sp} dieser verdünnten Lösung (EINSTEIN, 1906 & 1911). Dabei werden folgende Gleichungen herangezogen:

Die innere Viskosität [η] ergibt sich aus dem Produkt des molekularen Formfaktors υ und dem geschwollenen spezifischen Volumen v_s:

$$[\eta] = \upsilon \cdot v_S \qquad \text{(Gl. 4.2)}$$

Das Produkt aus dem molekularen Formfaktor υ und dem geschwollenen spezifischen Volumen v_S entspricht auch dem Quotienten aus spezifischer Viskosität η_{sp} und der Stoffkonzentration c, bzw. der reduzierten Viskosität η_{red}:

$$\upsilon \cdot v_S = \frac{\eta_{sp}}{c} = \eta_{red} \qquad \text{(Gl. 4.3)}$$

Messtechnisch ergibt sich die reduzierte Viskosität η_{red} aus Messungen der relativen Viskosität η_{rel}, die sich aus der Division der Viskosität der Stofflösung η durch die Viskosität des Lösungsmittels η_0 ergibt:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{rel} - 1}{c} = \frac{\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}}{c} \qquad \text{(Gl. 4.4)}$$

Aus Gleichung 4.2 und 4.3 ergibt sich schließlich folgender Zusammenhang zwischen der spezifischen Viskosität η_{sp} und der Stoffkonzentration c, in dem die innere Viskosität [η] den Proportionalitätsfaktor darstellt:

$$\eta_{sp} = [\eta] \cdot c \qquad \text{(Gl. 4.5)}$$

Die Steigung einer linearen Auftragung von spezifischer Viskosität η_{sp} über der Biopolymerkonzentration ergibt damit die innere Viskosität [η]. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass eine Extrapolation außerhalb der Messdaten, wie sie bei den Ansätzen von Huggins, Kraemer u.ä. notwendig ist, hier nicht erfolgt (HARDING, 1997). Bei dem Einstein-Ansatz muss zudem auch nicht die reduzierte Viskosität η_{red} berechnet werden. Damit wird eine Vervielfältigung des Fehlers in der Messung niedriger Stoffkonzentrationen bei der Bestimmung der relativen Viskosität η_{rel} umgangen (REILLY, VAN DER HOFF & ZIOGAS, 1979; KOZICKI & KUANG, 1996).

g) pH-Wert

Die Messungen des pH-Werts erfolgten mit einem Knick pH-Meter 761 Calimatic (Knick, Berlin, Deutschland) mit externem PT-100 Temperatursensor und einer pH-Sonde Typ Inlab 410 (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz).

f) Statistische Auswertung

Kurvenanpassungen wie auch alle Berechnungen für eine statistische Analyse der Messdaten wurden mit Statgraphics Plus 5.0 (StatPoint Inc., Herndon, USA) durchgeführt. Zur Bewertung, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Herstellungsvarianten der Proben vorliegen, wurde das Mindestsignifikanzintervall nach Fisher (LSD: least significant difference) herangezogen. Wenn nicht anders angegeben, zeigen die Fehlerbalken in den Abbildungen das LSD nach Fisher.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Carrageenan-Milchproteinmischung im neutralen pH-Bereich

5.1.1 Vorüberlegungen zur Auswahl des Beispielsystems und der prozesstechnischen Experimente

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit setzt praxisrelevante Polysaccharid-Milchprotein-Mischsysteme voraus und hat zum Ziel, prozessinduzierte Modifikationen dieser Mischsysteme bzw. ihres thermodynamischen Verhaltens aufzuzeigen. Da die Hauptfraktion von Milchprotein, Casein, nur im neutralen pH-Bereich in micellarer Form vorliegt, werden bei Milchproteinsystemen zwei Hauptgruppen unterschieden: neutrale Produkte mit micellaren Casein und gesäuerte Produkte mit zerfallenen und aggregierten Caseinpartikeln. Entsprechend werden zwei Beispiele für Mischsysteme ausgewählt: eines im neutralen Bereich, also mit Polysaccharidwechselwirkungen zu micellaren Casein (Kap. 5.1), und eines im sauren Bereich etwas unterhalb des isoelektrischen Punkts der Caseine (Kap. 5.2).

Im ersten Fall bedeutet dies einen Carrageenanzusatz zu einem Milchsystem und im zweiten Fall einen Zusatz von Pektin. Bei den Prozessparametern im Herstellungsprozess für diese Mischsysteme wird der Schwerpunkt auf thermische und mechanische Einflussfaktoren gelegt, da Standardprozesse in der Regel einen Erhitzungsschritt und eine Scherkraftbelastung enthalten.

Die "spezielle Milchreaktivität" von Carrageenan ermöglicht bereits bei sehr niedrigen Polysaccharidosagen eine erfolgreiche Stabilisierung von Milchproteinsystemen gegenüber physikalisch bedingten Entmischungserscheinungen. Eine Kombination von UHT-Behandlung gegen mikrobiellen Verderb und Carrageenanzusatz zur physikalischen Stabilisation führt zu komplexen Biopolymermischsystemen mit einer Haltbarkeit von mehreren Monaten. So wird dieses Polysaccharid beispielsweise in Kombination mit einem UHT-Prozess bei sterilen Milchmixgetränken, wie trinkfertige Kakaozubereitungen o.ä., eingesetzt (VAN DEN BOOMGARD ET AL., 1987). Da die Dosage von Carrageenan, bezogen auf den Milchproteingehalt, bei diesen Systemen typischerweise im Grenzbereich der Co-Solubilität des Phasendiagramms von vergleichbaren Modellsystemen (SCHORSCH ET AL., 2000) liegt, wird diese Applikation als Grundlage für die folgenden Versuchsreihen gewählt (Abb. 5.1).

Grundlegende und zahlreiche Untersuchungen an Modellsystemen mit κ-Carrageenan und micellarem Casein untermauern die Modellvorstellung einer Netzwerkstruktur, in der zusätzlichen Verbindungen benachbarter Carrageenanhelices durch Proteincluster eine Schlüsselrolle zukommt (SPAGNUOLO ET AL., 2005). Wird nun dieses Modell als Basis für das gewählte Beispielsystem herangezogen, so muss beurteilt werden, welche prozessabhängigen Effekte in diesem Modell vorstellbar sind. Am ehesten sind diese in Mischungen zu erwarten, bei denen eine aktive Beteiligung bei-

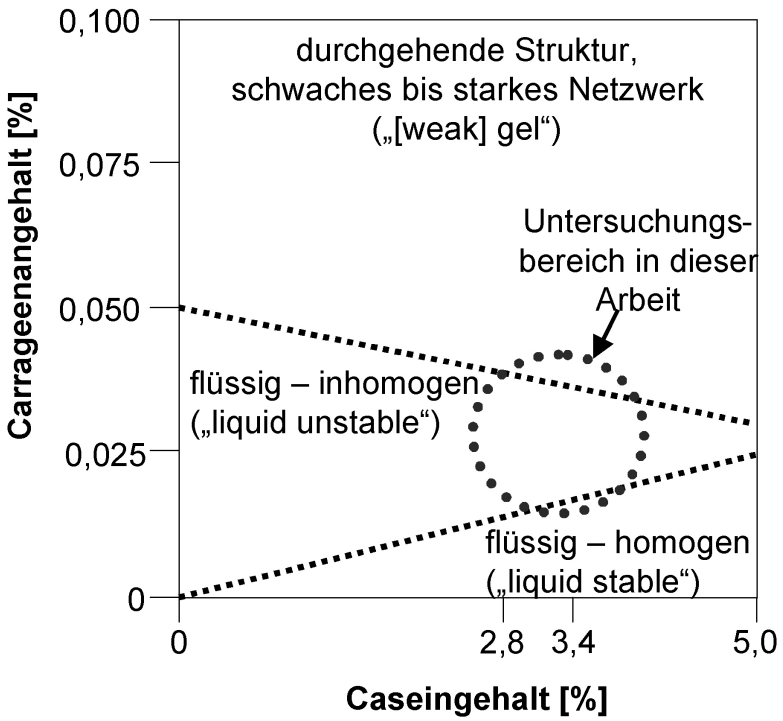

Abb. 5.1: Phasendiagramm für ein Mischsystem mit micellaren Casein und Carrageenan (SCHORSCH ET AL., 2000).

der Biopolymere für ein thermodynamisch stabiles Netzwerk notwendig ist. Misslingt dagegen der Aufbau eines durchgehenden Netzwerks, in das alle vorhandenen Makromoleküle integriert sind, dann wird die Grenze von kompatiblen Systemen zu thermodynamisch inkompatiblen Mischungen überschritten (VEGA ET AL., 2005).

Ein Erhitzungsschritt im neutralen pH-Bereich bedeutet für das Polysaccharid grundsätzlich zunächst eine vollständige Hydratisierung. Das Makromolekül liegt dann als voll bewegliches ungeordnetes Knäuel (Coil-Form) vor. Milchproteine liegen dagegen bei einer Erhitzung in verschiedenen Modifikationen vor, bedingt durch Denaturierungsreaktionen und Komplexbildungen. Da aber andererseits den Proteinclustern eine tragende Rolle im Zusammenspiel beider Biopolymere zugeschrieben wird, sind prozessabhängige Änderungen der Kompatibilität des Mischsystems aufgrund von temperaturabhängigen Modifikationen der Proteine zu erwarten.

Mit diesem Hintergrund werden folgende prozesstechnische Experimente im Pilotmaßstab konzipiert:

Als erster Schritt soll geprüft werden, ob sich prozessinduzierte Veränderungen in den Mischgelcharakteristika reproduzierbar gegenüber der natürlichen Schwankungsbreite (Zufallsvarianz) differenzieren lassen (HAIGER, 1966). In Anlehnung an industrielle Anwendungen wird dazu ein in der Praxis verbreitetes, mit Dextrose standardisiertes Carrageenan in Kombination mit Magermilch einer UHT-Behandlung unterworfen. Bei dieser Versuchsreihe werden der Einfluss der Temperaturhöhe während der UHT-Erhitzung und die Auswirkungen der Kühlendtemperatur geprüft (Experiment Nr. 1; Kap. 5.1.2).

Ergeben sich im 1. Experiment signifikante Unterschiede, die sich auf einzelne Prozessvariablen zurückführen lassen, so werden in Experiment Nr. 2 (Kap. 5.1.3) differenziertere Mischsystem-

abstufungen einer UHT-Temperaturvariation unterworfen. Für ein umfassenderes Bild der Eigenschaften des Biopolymersystems werden verschiedene rheologische Kennzahlen ausgewertet. Für eine klare Zuordnung des Carrageenangehalts wird nach Vergleichsmessungen von dem mit Dextrose standardisierten Carrageenan zu einem unstandardisierten, also reinen Carrageenan gleichen Typs gewechselt. Die folgenden Experimente werden dann ausschließlich mit unstandardisiertem (reinem) Carrageenan durchgeführt.

Die Variation der UHT-Temperatur in Experiment 1 bzw. 2 bedeutet Erhitzungsbedingungen, in denen Modifikationen an allen Milchproteinfraktionen auftreten, es werden also Caseine wie auch Molkenproteine beeinflusst. In den nächsten Versuchsreihen (Experimente Nr. 3 und 4 in Kapitel 5.1.4) wird daher eine Differenzierung der Rolle der einzelnen Proteinfraktionen auf den prozessabhängigen Strukturaufbau angestrebt. Dazu wird die Länge der Vorerhitzungszeit variiert, da diese Zeit im direkten Zusammenhang mit dem Molkenproteindenaturierungsgrad steht. Caseine erfahren bei der Temperatur im Vorerhitzungsabschnitt keine Modifikationen, so dass entsprechend bei vollständiger Molkenproteindenaturierung die Texturveränderungen, die auf die Höhe der UHT-Temperatur zurückzuführen sind, auf die Rolle der Caseine im Mischsystem zurückzuführen sind. Weitere Erkenntnisse über die Funktion der spezifischen Wechselwirkung zwischen Caseinen und den Sulphatgruppen des Carrageenans sollen durch eine Variation des Mischungszeitpunkts in Experiment 4 gesammelt werden.

Für ein vollständiges Bild der an den prozessabhängigen Struktureigenschaften beteiligten Wechselwirkungen sollen die bisherigen Ergebnisse durch eine Bestimmung der Aktivierungsenergie aus der Arrheniusauftragung der Auswirkungen verschiedener UHT-Bedingungen ergänzt werden. Dazu wird in Experiment Nr. 5 (Kap. 5.1.5) neben der UHT-Temperatur zusätzlich auch die UHT-Heißhaltezeit variiert.

Nach dieser Untersuchung von Erhitzungseffekten auf das Biopolymersystem sollen in den nächsten Experimenten die Auswirkungen von Scherkräften während der Herstellung der Mischung aufgezeigt werden (Kap.5.1.6). Für Experiment Nr. 6 wird dazu ein Standardmischsystem aus den vorangegangenen Versuchsreihen ausgewählt, das bekannte und gut differenzierbare UHT-abhängige Veränderungen zeigt. Dieses System wird einer UHT-Erhitzung mit anschließender Homogenisation bei verschiedenen Druckstufen unterworfen. Dieses Vorgehen soll eine bessere Identifizierung von Scherkrafteinflüssen ermöglichen, da durch den Bezug auf die UHT-abhängigen Struktureigenschaften der Auflösung der verwendeten Messverfahren Rechnung getragen wird. Um die Auswirkungen einer Konformationsänderung des Carrageenans von Coil- auf Helix-Form auf die Scherstabilität zu untersuchen, wird in Experiment Nr. 7 zusätzlich die Homogenisationstemperatur von 62 auf 10 °C abgesenkt. Falls die Homogenisationstemperatur als zusätzlicher Einflussfaktor auf die Mischsystemeigenschaften identifiziert wird, soll in Experiment Nr. 8 die Versuchsreihe zur Homogenisationstemperatur mit einer höheren Carrageenanmenge wiederholt werden, um eine Zuordnung der scherkraftabhängigen Mischsystemveränderung auf eine der beiden Biopolymerkomponenten zu ermöglichen. Diese Untersuchungen des Scherkrafteinflusses sollen wiederum das Bild des Zusammenspiels der einzelnen Wechselwirkungen auf der molekularen Ebene des Mischsystems vervollständigen. Zur Abrundung dieser Zusammenhänge werden daher als Experiment 9 gezielte Mischsystemmodifikationen den bisherigen Ergebnissen gegenübergestellt.

5.1.2 Einfluss von Erhitzungstemperatur und Kühlrate

Eine Zielsetzung dieser Arbeit besteht in der Ermittlung der Zusammenhänge zwischen molekularen Vorgängen und Prozesseinflüssen, die für eine Übertragung von Grundlagenforschung auf praktische Anwendungen essentiell sind. Um diesem Punkt Rechnung zu tragen, werden die ersten Versuche mit standardisiertem Carrageenan durchgeführt. Dieser Lebensmittelzusatzstoff (E407) findet in industriellen Anwendungen seinen Einsatz und ist, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, durch einen Dextrosezusatz auf ein bestimmtes Gelstärkenniveau standardisiert. Die Konzentrationsangabe bei Einsatz von standardisiertem Carrageenan entspricht daher nicht dem absoluten Carrageenananteil in der Mischung. Für eine differenzierte wissenschaftliche Untersuchung ist die Kenntnis des absoluten Polysaccharidgehalts jedoch von grundlegender Bedeutung. Es werden daher nach der Präsentation der ersten Ergebnisse Vergleichsmessungen mit reinem, also nicht-standardisiertem Carrageenan gezeigt, um eine Übertragbarkeit der weiterführenden Untersuchungen mit nicht-standardisiertem Carrageenan auf industrielle Anwendungen zu gewährleisten.

Zunächst ist nun die Frage zu klären, ob grundsätzlich statistisch signifikante, prozessinduzierte Unterschiede in praxisrelvanten Mischsystemen nachweisbar sind. Dies muß durch den Einsatz von in der Praxis üblichem, standardiertem Carrageenan geklärt werden.

Als erster Schritt soll ein Experiment zur Überprüfung der These, dass Änderungen der Kompatibilität des Mischsystems aufgrund von erhitzungsbedingten Proteinmodifikationen auftreten können, durchgeführt werden. Da in der natürlichen Zusammensetzung von Milchprotein mit ca. 80 % die überwiegende Hauptfraktion aus Casein besteht, werden für den Erhitzungsschritt UHT-Bedingungen (120-139 °C) gewählt. Denn für Caseine sind erst bei diesen Hocherhitzungstemperaturen Veränderungen sicher nachweisbar (O'Connell et al., 1999). Es wird eine Mischung von 3,4 % bovinem Milchprotein mit 0,04% standardisierten kappa-2 (κ-/ι-hybrid) Carrageenan in Milchserum verwendet. Abbildung 5.2 zeigt den gesamten Prozess an der Pilot-

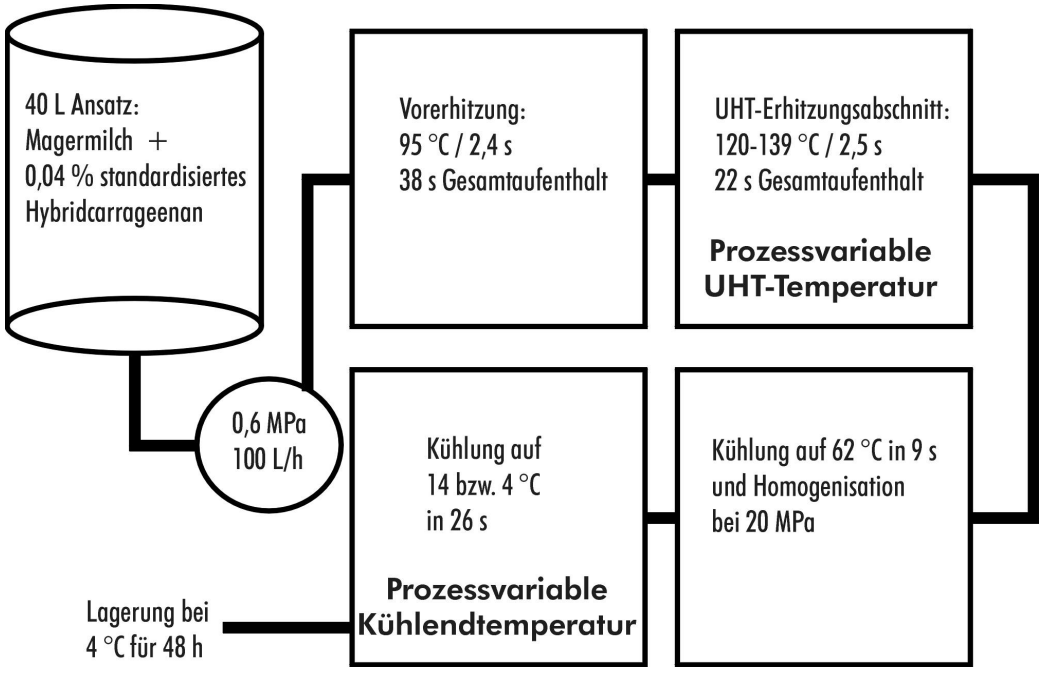

Abb. 5.2: Prozessschema zur Herstellung der Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. In Experiment Nr.1 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Erhitzungstemperatur und Kühlendtemperatur.

anlage, bestehend aus Vorerhitzung, UHT-Erhitzung, Abkühlung auf Homogenisationstemperatur, Homogenisierung und Abkühlung auf Lagertemperatur.. Durch den kontinuierlichen Ablauf dieser Form der Probenherstellung können verschiedene Nachteile von Laborversuchen im Batchbetrieb vermieden werden, wie beispielsweise versteckte Strukturveränderungen aufgrund von Zwischenstandzeiten, Umfüllen oder Ähnlichem. Als Versuchsvariablen sollen zunächst die Prozessparameter UHT-Temperatur und Kühltemperatur herangezogen werden. Dazu werden die Proben nach Wärmebehandlung und definierter Abkühlung bei 4 °C für 48 bis 96 h gelagert und dann mit verschiedenen rheologischen Methoden und Partikelgrößenmessungen charakterisiert.

Abbildung 5.3 zeigt die Schubspannungskurven zweier Proben aus dem gleichen Biopolymermischungsansatz, die unter Variation der Erhitzungsbedingungen hergestellt wurden.

Bei einem Vergleich einer Erhitzung auf 120 °C (a) bzw. auf 139 °C (b) ist vor allem auf den Verlauf der Aufwärtsrampe der Schubspannungskurven (Pfeil nach rechts) ein deutlicher Effekt höherer UHT-Temperaturen zu beobachten. Während bei 120 °C die Differenz zwischen Aufwärts- und Abwärtsrampe relativ gering ausfällt, ist bei 139 °C eine davon deutlich unterscheidbare Charakteristik festzustellen. So nimmt die Hystereseфläche zwischen Aufwärts- und Abwärtsrampe sichtbar zu. Auch ist bei der Prozessbedingung von 139 °C eine Diskontinuität in der Aufwärtsrampe erkennbar. Wie in Kapitel 4.2.2 erwähnt, macht sich diese Auffälligkeit gegenüber einer Kurvenanpassung mit Standardfunktionen ähnlich einem relativen lokalen Maximum bemerkbar. Dies wird von SCHENZ (1997) als Strukturpunkt definiert (Abb. 5.3b). Dieser Punkt deutet auf eine Überdehnung und das schlagartige Abreißen von Netzwerkstrukturen hin, welche sich zuvor im Ruhephasenabschnitt der rheologischen Messprozedur ausbilden konnten.

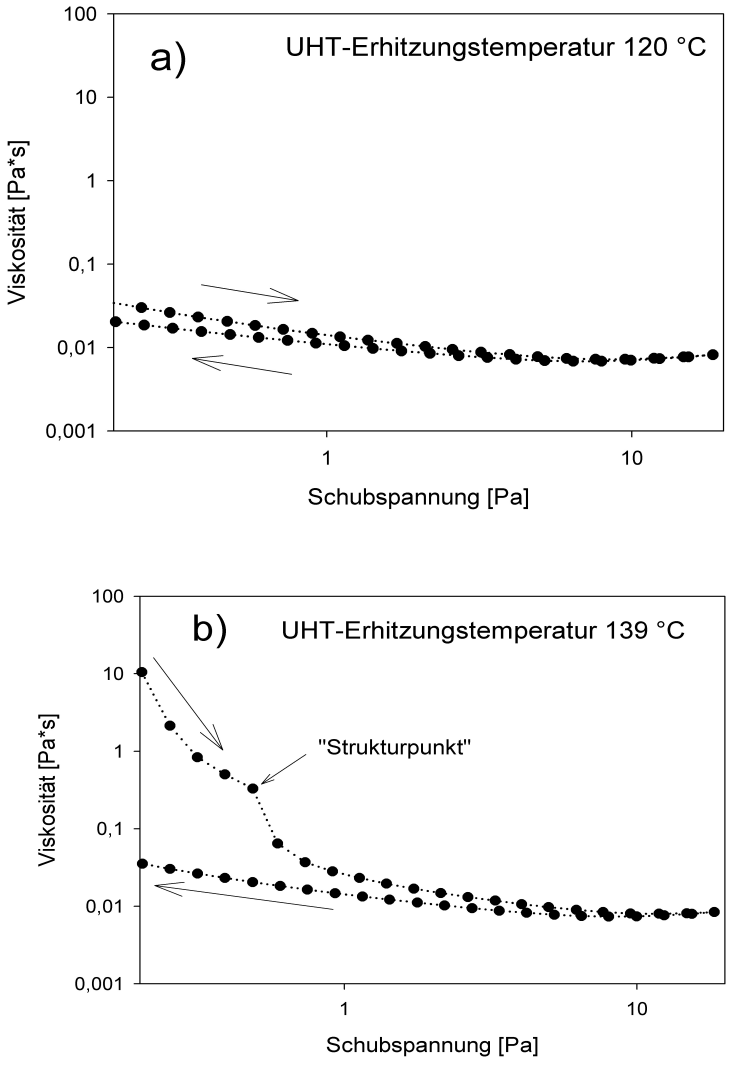

Abb. 5.3: Schubspannungskurven zweier bei unterschiedlichen UHT-Temperaturen erhitzter Carrageenan-Milchproteinsysteme. Kühlendtemperatur bei beiden Systemen 4 °C. Die UHT-Erhitzungstemperatur bei a) ist 120 °C, bei b) 139 °C.

Weiter fällt bei einem Vergleich von Abbildung 5.3a mit 5.3b die mit der Erhitzungstemperatur deutlich gestiegene Anfangsviskosität der Aufwärtsrampe auf. Zur ersten Abschätzung prozessinduzierter Modifikationen des Biopolymermischsystems wurde die Hystereseфläche zwischen Aufwärts- und Abwärtsrampe ausgewertet (Abb. 5.4). Diese hängt nicht-linear von der Erhitzungstemperatur im UHT-Bereich ab. Bei Prozesstemperaturen über 130 °C wird ein expo-

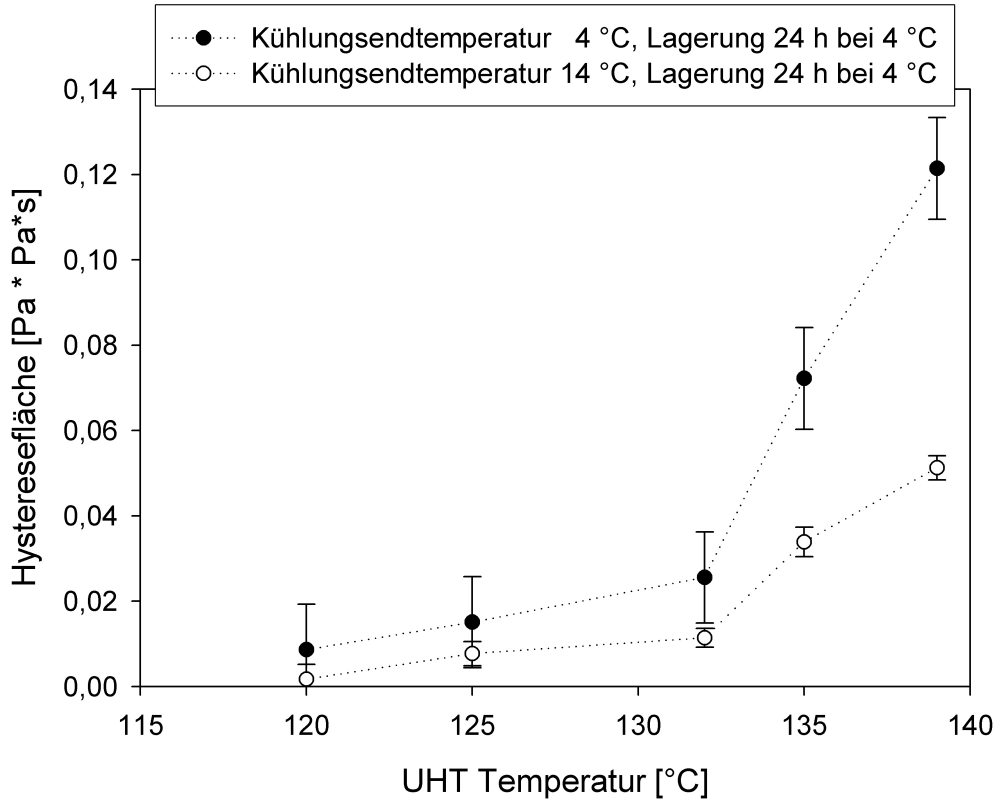

Abb. 5.4: Hystereseфläche der Schubspannungskurven von erhitzten Carrageenan-Milchproteinsystemen. Kühlendtemperaturen 4°C oder 14 °C; Lagertemperatur 4 °C.

nentieller Anstieg beobachtet. Aber auch die Kühltemperatur zeigt einen gewissen Einfluss auf das Mischsystem. So ergibt eine Kühlung auf tiefere Temperaturen innerhalb der gleichen Kühlstrecke (entspricht de facto einer höheren Kühlrate) einen deutlich höheren Anstieg der Hystereseфläche, wenn eine Erhitzung über 130 °C vorausgegangen ist.

Die Versuchsergebnisse belegen deutlich, dass prozessinduzierte Veränderungen in Biopolymermischsystemen auftreten können. Dies stützt die These, dass die Kompatibilität von Carrageenan-Milchproteinmischungen durch erhitzungsbedingte Proteinmodifikationen beeinflussbar und durch geeignete Prozessparameter steuerbar ist.

Für ein Gesamtbild der Mechanismen, die für den prozessabhängigen Aufbau der Mikrostruktur verantworlich sind, wurden zunächst am gleichen Mischsystem mit standardisiertem Carrageenan verschiedene ergänzende Messungen durchgeführt:

Eine Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen kann über Änderungen von Mischsystemeigenschaften bei tiefen Temperaturen abgeschätzt werden, da diese Wechselwirkung bei solchen Bedingungen bevorzugt ausgebildet wird (Walstra, 2003). Eine Zunahme rheologisch erfassbarer Strukturelemente während einer definierten Ruhezeit bei niedrigen Temperaturen kann damit auf die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen interagierenden Partnern zurückgeführt werden.

Abbildung 5.5 zeigt die lagerdauerbedingten Veränderungen der Hystereseфläche als Maß für diese ausgebildeten Interaktionen in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur. Unabhängig von der Temperatur im Kühlschritt lässt sich bei beiden Beispielen ein Anstieg des Hystereseflächenwertes als Maß für strukturbildende Wechselwirkungen sowohl mit steigender UHT-Temperatur als auch mit zunehmender Kühllagerdauer beobachten. Die Temperatur im Kühlschritt bestimmt jedoch, auf welchem Niveau die Steigerungen der Wechselwirkungen stattfinden. Dies liegt in dem

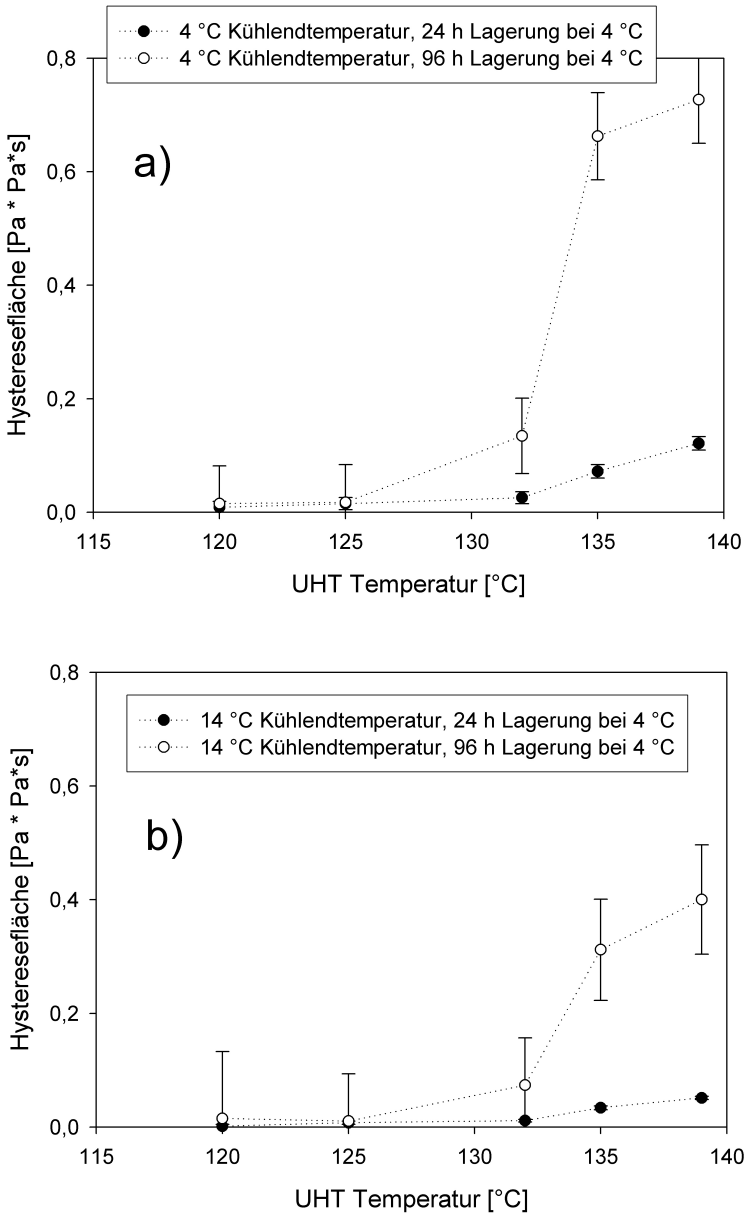

Abb. 5.5: Hystereseфläche in Abhängigkeit der UHT Temperatur bei Lagerdauern von 24 oder 96 h bei 4 °C. Kühlendtemperatur vor Beginn der Lagerung: a) 4 °C; b) 14 °C.

Polydispersitätsgrad des eingesetzten Carrageenans natürlichen Ursprungs begründet. Bei einer langsamen Abkühlung findet eine gewisse Staffelung des Coil-Helix-Übergangs verschiedener Molekulargewichtsfraktionen mit entsprechenden Auswirkungen auf den Zusammenbau der Mischgelstruktur statt.

Der Anteil einer weiteren schwachen Wechselwirkung, nämlich hydrophober Interaktionen, lässt sich über die Anwendung einer Komplexbildung mit dem hydrophoben Farbagens ANS bestimmen. Grundlage für diese Wechselwirkung bilden die hydrophoben Oberflächen der Strukturelemente. Abbildung 5.6 zeigt den Anstieg des hydrophoben Oberflächenanteils im Mischsystem in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur im UHT-Abschnitt für Beispielmischungen mit standardisierten bzw. unstandardisierten Carrageenan. Unabhängig von der Standardisierung mit Dextrose lässt sich ein relativer Anstieg der hydrophoben Gesamtoberfläche feststellen. Die Zunahme fällt bei dem standardisierten System etwas deutlicher aus. Die Messung erhebt jedoch nicht den Anspruch eines absoluten Vergleichs, da das Carrageenan bei beiden Beispielen zwar gleichen Ursprungs ist, der exakte Anteil bei dem standardisierten System jedoch nicht bekannt war. Wie eingangs bereits erwähnt, liegt die Bedeutung dieser Gegenüberstellung mit nicht-standardisiertem Carrageenan für diese Arbeit in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf industrielle Anwendungen. Auf diesen Aspekt wird später noch bei der Vorstellung eines weiteren Messverfahrens detailliert eingegangen.

Zunächst soll die aus Abb. 5.5 und 5.6 erkennbare Beteiligung der im Vergleich zu den kovalenten Bindungen der Polyssaccharidmakromoleküle schwächeren und damit schersensitiveren Wechselwirkungen diskutiert werden. Hierzu zählen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Letztere bedeuten, thermodynamisch gesehen, eine bessere Verteilung der Lösungsmittelmoleküle, denn die gesamte hydrophobe Oberfläche wird durch Aneinanderlagerungen von hydrophoben Abschnitten verringert. Da Wassermoleküle vor hydrophoben Oberflächen in kristallin-ähnlichen Strukturen fixiert sind, kann sich bei einer Reduzierung der

hydrophoben Gesamtoberfläche eine größere Anzahl von Lösungsmittelmolekülen freier im Volumen bewegen, was eine gestiegene Entropie und damit eine Minimierung der freien Enthalpie bedeutet (SINGH ET AL., 1998). Da bei Systemen, die mit höheren UHT-Temperaturen hergestellt wurden, der Anteil exponierter hydrophober Oberflächen vergrößert ist (Abb. 5.6), besteht gerade in diesen Mischungen aus den o.g. Gründen ein erhöhter Zwang zur Aneinanderlagerung der hydrophoben Oberflächen. Daraus kann man schließen, dass der prozessabhängige Anstieg von Strukturstabilität bzw. Vernetzungsgrad unter anderem auch auf diese Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

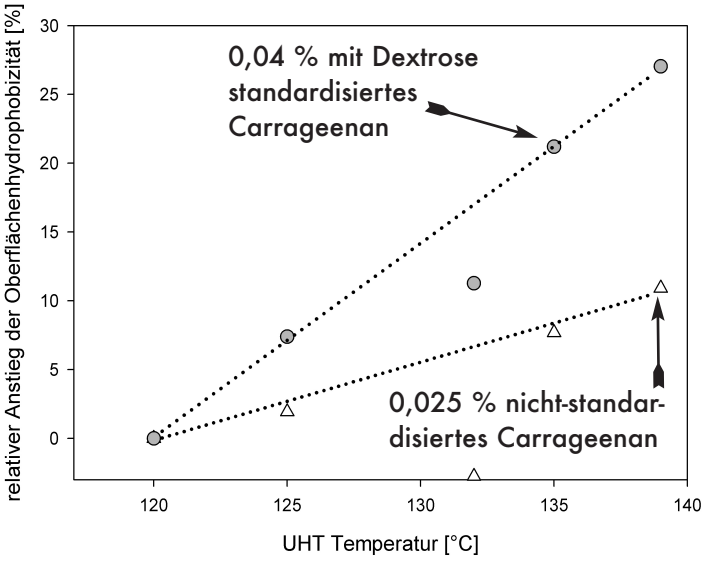

Abb. 5.6: Relativer Anstieg der hydrophoben Gesamtoberfläche in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzung für zwei Carrageenan-Milchproteinmischungen.

Die beschriebenen hydrophoben Wechselwirkungen haben ihr Maximum jedoch bei 60 °C, ihre Intensität nimmt mit sinkenden Temperaturen ab. Andererseits fördern tiefe Temperaturen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (WALSTRA, 2003). Dies zeigt sich auch in diesem Mischsystem, da die Hysteresefläche mit tieferer Kühlung ansteigt (Abb 5.5). Der Anstieg der Hysteresefläche der Schubspannungskurve während einer Lagerung bei 4 °C weist auf den Ausbau von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen im Mischsystem hin (Abb. 5.5).

Wird diesem Ergebnis der bereits angeführte Zuwachs exponierter hydrophober Oberflächen gegenübergestellt, so deutet sich ein temperaturabhängiger Wechsel zwischen den beiden erwähnten schwachen Wechselwirkungen an. Wie bereits bei den thermodynamischen Grundlagen gezeigt, bedingt die vollständige Hydratation der Polysaccharidketten aufgrund ihres Bedarfs an Volumen und Serummolekülen eine Mikrophasentrennung mit Bildung von Proteinclustern. Werden aufgrund höherer UHT-Temperaturen nun bei den Proteineinheiten größere hydrophobe Oberflächen induziert, so fördert dies die Zusammenlagerung der Proteincluster. Der höhere elastische Modulus dieser Aggregate spiegelt sich in den rheologischen Eigenschaften wider. Diese zeigen, dass die Assoziation der Proteincluster auch bei Abkühlung des Mischsystems erhalten bleibt. Aufgrund der bereits genannten Temperaturabhängigkeit der Wechselwirkungen lässt sich schließen, dass nun Wasserstoffbrückenbindungen anstelle der hydrophoben Wechselwirkungen für den Strukturerhalt agieren. Dabei spielt neben dem Zeitfaktor, der für diesen Austausch zur Verfügung steht, das Grundgerüst der Strukturelemente eine entscheidende Rolle.

Eine direkte Messung dieser Strukturelemente und damit der Ursache für die unterschiedlichen rheologischen Eigenschaften ermöglicht die Auswertung dynamischer Lichtstreuung bzw. der Photonenkorrelation. Abbildung 5.7 zeigt den Einfluss der Erhitzungsbedingungen auf den mittleren Durchmesser einer unimodalen Auswertung der dynamischen Lichtstreuung für Mischungen mit standardisierten oder unstandardisierten Carrageenan.

Mit zunehmender UHT-Temperatur ist ein Anstieg der Clustergröße zu verzeichnen. Da mit dem

Messbereich des Photonenkorrelationsgeräts Polysaccharidmakromoleküle nicht erfasst werden, kann der Mittelwert der unimodalen Auswertung der Partikelgrößenmessung den Proteinaggregaten zugeordnet werden. Einer möglichen Verminderung der Messsignalintensität aufgrund von Störungen durch große Partikel wird mit einer entsprechend angepassten Verdünnung der Probe mit Milchserum begegnet. Da die Aggregation von Caseinmicellen zu Proteinclustereinheiten durch die vollständige Hydratisierung des Polysaccharids induziert wird, zeigen sich die thermodynamischen Auswirkungen dieses Vorgangs indirekt in der sehr deutlichen Differenz des Partikelgrößenmittelwerts der noch unerhitzten Mischungen gegenüber dem Wert, den sie nach ihrer Erhitzung aufweisen (Abb 5.7).

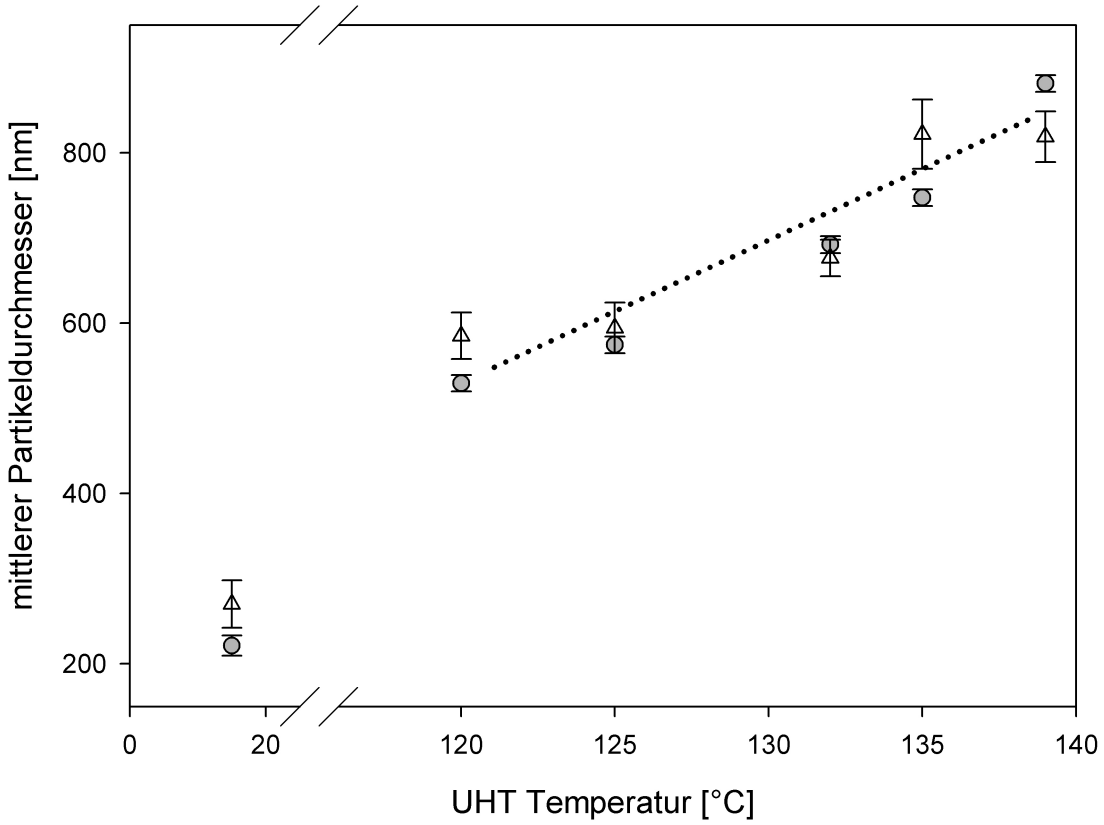

Abb. 5.7: Mittlerer Durchmesser der Proteincluster für zwei Carrageenan-Milchproteinmischungen (Kreise 0,04 % standardisiertes Carrageenan; Dreiecke 0,025 % nicht-standardisiertes Carrageenan).

Bei der Messung der Oberflächenhydrophobizität ließ sich aus analytischen Gründen ein gewisser Einfluss des Dextroseanteils im standardisierten System auf das Messergebnis nicht vollständig ausschließen. Der Vergleich des temperaturabhängigen Clustergrößenanstiegs von Mischungen mit durch Dextrosezusatz standardisierten Carrageenan mit Mischungen mit reinen (unstandardisierten) Carrageenan bestätigt jedoch, dass der beobachtete Temperatureinfluss auf das Mischgelsystem nicht auf die Standardisierung des Carrgeenans zurückzuführen ist, da der gleiche temperaturabhängige Anstieg der mittleren Partikelgröße auch bei Einsatz von dextrosefreien, nicht-standardisierten Carrageenan auftritt. Aufgrund der deutlich höheren Konzentration der Caseinmicellen ist der Einfluss von Dextrose auf den Partikelgrößenmittelwert vernachlässigbar. Lediglich die Konzentrationsangabe verschiebt sich, denn die Proteinclustergröße stimmt bei einem Vergleich von Mischungen mit 0,04 % standardisierten Carrageenan bzw. mit 0,025 %

nicht-standardisierten Carrageenan in etwa überein. In den folgenden Versuchsreihen wird nur noch mit nicht-standardisiertem Carrageenan gearbeitet, da dann die exakte Carrageenanmenge im Mischsystem bekannt ist. Die Ergebnisse sind jedoch grundsätzlich auch auf industriell eingesetzte standardisierte Carrageenanmischungen übertragbar. Damit kann vorerst folgender Zwischenstand festgehalten werden:

1.) Die Variation des Prozessparameters "Erhitzungstemperatur im UHT-Abschnitt" zeigt, dass das thermodynamische Verhalten des Mischsystems von den applizierten Prozessbedingungen abhängt.

2.) Die Kombination von rheologischen Messungen und Partikelgrößenanalyse bestätigt den Prozesseinfluss und die Schlüsselfunktion der Proteincluster für den Aufbau zusätzlicher Mischgelverknüpfungspunkte in Mischsystemen. Aus dem Einfluss der Kühl- und Lagerbedingungen zeichnet sich eine Beteiligung von schwachen Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen ab.

Nach dieser grundsätzlichen Klärung, dass Prozesseinflüsse auf Carrageenan-Milchproteinmischungen messbar sind, werden im nächsten Schritt einzelne Aspekte in der rheologischen Analytik vertieft und Variationen bei der Herstellung dieses Mischsystems gesondert herausgegriffen.

5.1.3 Einfluss von Carrageenankonzentration und UHT-Bedingungen

Um ein umfassendes Bild der Prozessabhängigkeit des Mischsystems zu erhalten, soll nun eine detailliertere Variation der Carrageenankonzentration untersucht werden. Damit Nebeneffekte der zur Standardisierung verwendeten Dextrose oder anderer Stoffe sicher ausgeschlossen sind, wird dabei der Schwerpunkt bei dem Einsatz von Polysacchariden auf nicht-standardisiertes Carrageenan gelegt. Das Experiment wird in Anlehnung an die bisher erarbeiteten Ergebnisse konzipiert, d.h. eine Mischung von 3,4 % Milchprotein mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan wird als Basissystem genommen. Diese Mischung entspricht bei Vergleichsmessungen in etwa einer Mischung mit 0,04 % standardisierten Carrageenan (Abb. 5.6 und 5.7). Aus den bereits vorgestellten Versuchsergebnissen ist bekannt, dass in dieser Biopolymermischung aufgrund der Beteiligung der Proteincluster an einer durchgehenden Struktur eine Prozessabhängigkeit der Mischgeleigenschaften besteht.

Die erwähnte Mischung mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan wird daher als Bezugssystem in der Carrageenankonzentrationsreihe von vier Stufen von 0,020 %, 0,025 %, 0,030 % und 0,040 % gewählt. Als Prozessparameter wird die Höhe der Temperatur im UHT-Abschnitt in fünf Stufen von 120, 125, 132, 135 und 139 °C variiert. Die übrigen Prozessparameter (Vorerhitzung und Kühlung) werden konstant gehalten, wie in Abbildung 5.8 dargestellt.

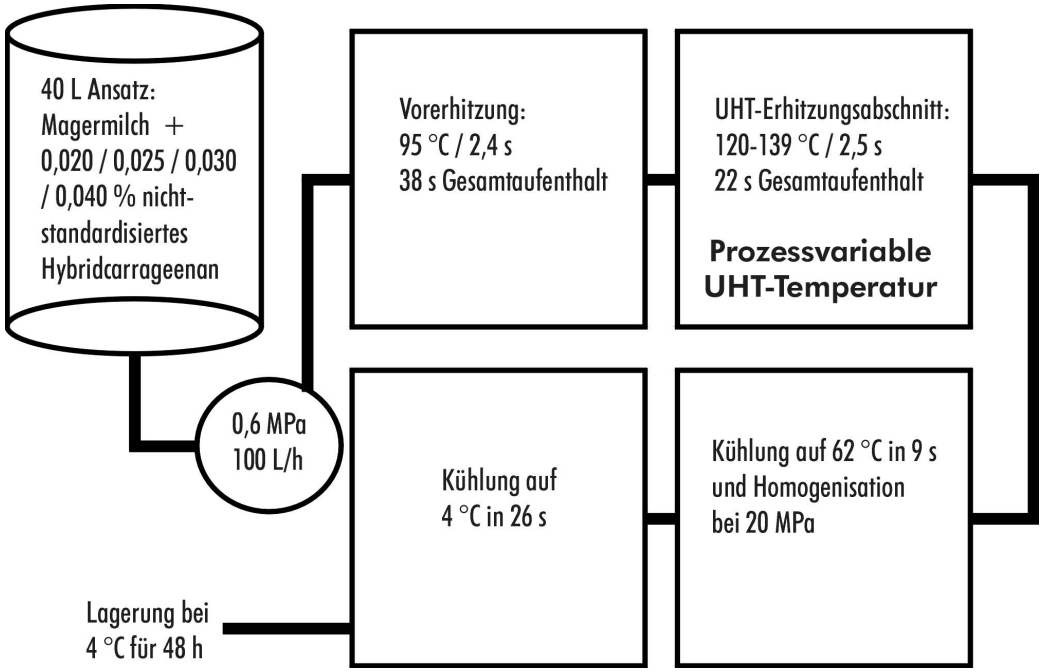

Abb. 5.8: Prozessschema zur Herstellung der untersuchten Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. Unter Experiment Nr.2 werden folgende Parameter variiert: Konzentration des nicht-standardisierten Carrageenan und die Temperatur im UHT-Erhitzungsabschnitt.

Bei der Auswertung dieses Experiments werden unter Kapitel 4 genannte, rheologische Kennzahlen angewendet, um eine korrekte Zuordnung möglicher Prozesseinflüsse in den Messergebnissen durchführen zu können. Die Verwendung der Hysteresefläche zwischen den Schubspannungskurven ist zwar für einen ersten Eindruck bezüglich der Auswirkungen der Prozessführung gut geeignet, einzelne Änderungen verschiedener Mischsystemeigenschaften können jedoch mit dieser integrierten Auswertung nicht differenziert werden. Im Folgenden sollen daher die Kennzahlen

zur Auswertung herangezogen werden, die sich aus der Unregelmäßigkeit am Strukturpunkt der Aufwärtsrampe ergeben.

Da der Strukturpunkt als ein Indikator für eine Überdehnung und das Auseinanderreißen von zusammenhängenden Strukturen interpretiert wird, zeigt der entsprechende Schubspannungswert am Strukturpunkt die Spannungsstabilität der Ruhestruktur an. Bei Anwendungen in der Praxis stellt für die Vergleichbarkeit von Mischsystemen die Schubspannungsstabilität eine wichtige Kennzahl dar, da die Carrageenan-Milchproteinstruktur zur Fixierung weiterer Makromoleküle, wie z.B. Kakaopartikel, ein gewisses Stabilitätsniveau aufweisen muss.

Offen ist jedoch, ob für die Verstärkung der Mischstrukturstabilität Modifikationen der Proteinpartner in der zusammengesetzten Carrageenan-Milchproteinstruktur die Hauptverantwortung tragen oder ob das Mischungsverhalten allein von prozessinduzierten Veränderungen des Polysaccharids abhängt.

Diese Frage lässt sich nicht durch eine Erhitzung von Carrageenan allein beantworten, da bei diesen verdünnten Systemen der Volumenanteil des zweiten Biopolymers eine Voraussetzung für ein ausreichendes rheologisches Signal darstellt. Eine Möglichkeit besteht in einer graduellen Verschiebung des Mischungsverhältnisses der beiden Biopolymere, ohne den Gesamtvolumenanteil, der eine verdünnte Lösung auszeichnet, zu verlassen. Deshalb werden für dieses Experiment Mischungen mit einem graduell erhöhten Carrageenananteil zum Vergleich herangezogen.

Ab einer bestimmten Carrageenanmenge in der Mischung kann aufgrund des höheren Volumenanteils des Polysaccharids eine ausreichende Anzahl von Carrageenanhelices selbstständig untereinander assoziieren. Die Vernetzung wird damit von Carrageenan dominiert und Proteincluster spielen keine entscheidende Rolle mehr zum Aufbau der Netzwerkstruktur. Wenn nun bei diesem System als erster Fall deutliche prozessabhängige Änderungen auftreten, so können diese nicht auf die Beteiligung der Proteincluster zurückgeführt werden, sondern allein auf den Prozesseinfluss am Carrageenan. Der zweite Fall liegt vor, wenn bei carrageenandominierten Milchproteinsystemen keine prozessabhängigen Änderungen differenzierbar sind, und im Gegensatz dazu bei niedrigeren Carrageenankonzentrationen in Mischungen mit Milchproteinen prozessabhängige Veränderungen der Struktureigenschaften auftreten. Da bei letzteren Mischungen die Beteiligung der Proteincluster für das Mischgel eine tragende Rolle spielt, ist bei dem zweiten Fall die Prozessabhängigkeit klar prozessinduzierten Modifikationen am Proteinpartner zuzuschreiben.

Abbildung 5.9 zeigt die Entwicklung des Stabilitätswertes der Mischsysteme gegenüber Spannungen in Abhängigkeit von Carrageenankonzentration und Erhitzungstemperatur. Die Darstellung gibt vor allem einen Überblick über das Zusammenspiel von Mischsystemzusammensetzung und Herstellungsbedingungen auf die Eigenschaften der Biopolymersysteme. Die Messpunkte ergeben als graue Rauten die Matrix aus UHT-Erhitzungsbedingung und Carrageenananteil im Mischsystem, in der die Spannungsstabilität der Biopolymermischung untersucht worden ist. Die eingezeichneten Linien wurden mit Hilfe des Programms Sigmaplot zwischen die gekennzeichneten Messpunkte interpoliert und sind zur visuellen Unterstützung gedacht. Im Sinne von Linien gleichen Effekts zeigt sich somit in graphischer Weise, welche Kombinationen von Mischungszusammensetzung und Prozessführung zu gleichen rheologischen Eigenschaften führen. Aus den Messwerten lässt sich sehr gut ein exponentieller Zusammenhang zwischen Carrageenankonzentration und Strukturstabilität erkennen. Im Vergleich zu den Syste-

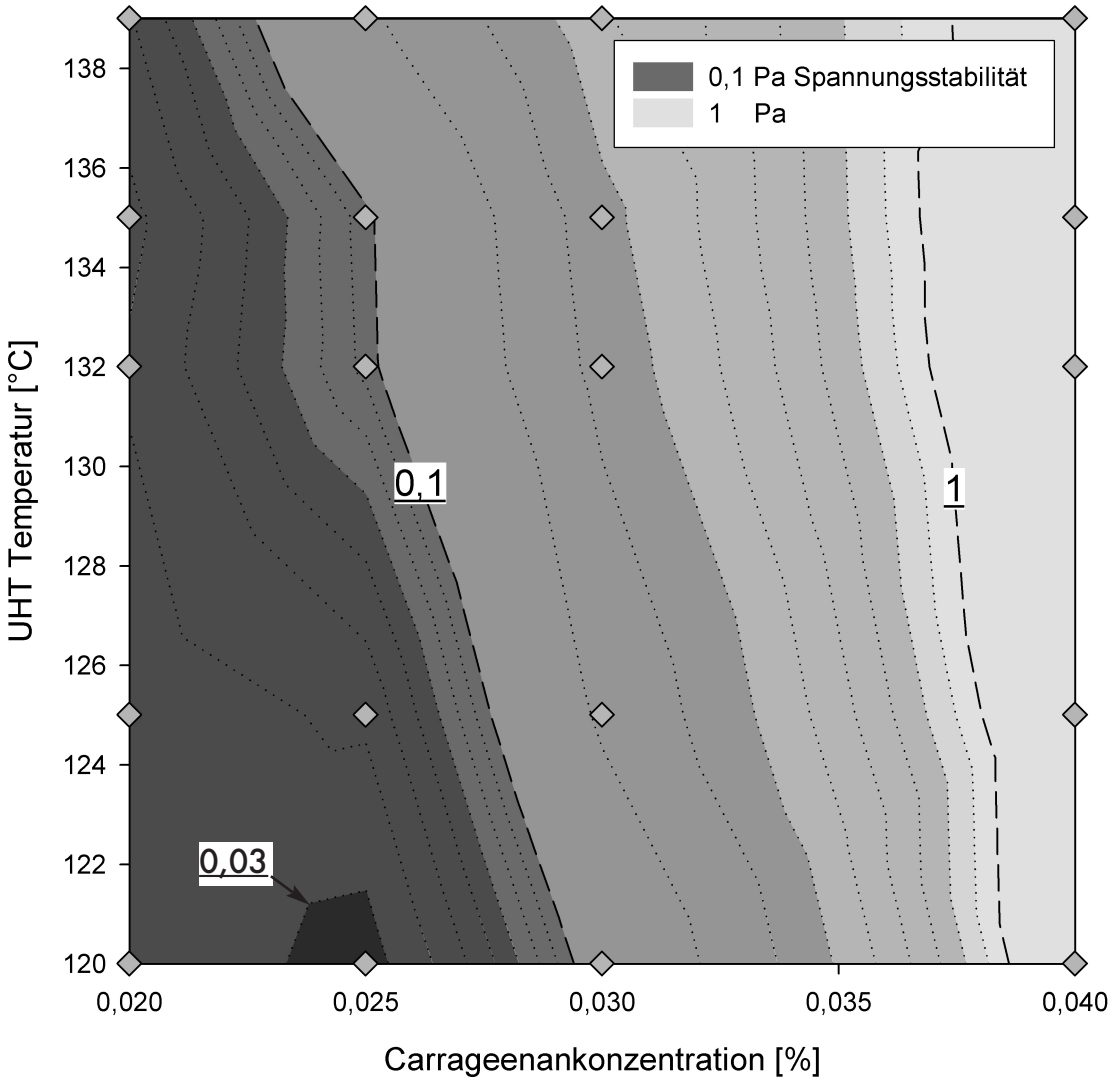

Abb. 5.9: Spannungsstabilität von Milchmischsystemen in Abhängigkeit des Anteils an unstandardisierten Carrageenan und der UHT-Erhitzungstemperatur. Die Rauten zeigen die Messpunkte an, auf deren Grundlage die Linien gleichen Effekts berechnet werden.

men mit 0,025 oder 0,030 % Polysaccharidzugabe zeigen Mischungen mit 0,040 % Carrageenan eine um eine Zehnerpotenz erhöhte Stukturstabilität. Bei Mischungen mit 0,020 % Carrageenan liegt der Stabilitätswert um eine Zehnerpotenz niedriger als bei Systemen mit 0,025 oder 0,030 % Carrageenan. Vor allem Mischungen mit 0,040 %, aber im gewissen Maß auch Proben mit 0,020 %, zeigen zudem keine Abhängigkeit von der UHT-Temperatur. Im Gegensatz dazu wirkt sich dieser Prozessparameter auf die Spannungsstabilität von Mischsystemen mit 0,025 % oder 0,030 % Carrageenan aus. Einen besonders deutlichen Einfluss besitzen die Erhitzungsbedingungen bei einem Carrageenangehalt von 0,025 % mit einer Erhöhung der Spannungsstabilität um eine Zehnerpotenz, wenn die Erhitzungstemperatur von 120 auf 139 °C erhöht wird.

Um die Übertragbarkeit der folgenden systematischen Untersuchungen mit nicht-standardisiertem Carrageenan auf industrielle Anwendungen zu gewährleisten, wird zur Referenz in Abbildung 5.10 eine Vergleichsmessung mit standardisiertem Carrageenan gezeigt. Es sind die Schubspannungswerte, an denen der jeweilige Strukturpunkt detektiert wurde, für Carrageenan-Milchproteinmischungen mit verschiedenem Anteil an standardisiertem Carrageenan über der

jeweils applizierten UHT-Temperatur aufgetragen. Das Bild zeigt, dass auch bei Einsatz eines standardisierten Hydrokolloidzusatzes das Niveau der Strukturstabilität unabhängig von dem Prozessparameter mit der Carrageenanmenge im System ansteigt. Dabei erkennt man, dass nur bei einer Carrageenankonzentration von 0,04% standardisierten Carrageenan die Strukturstabilität eine deutliche Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur zeigt (Abb. 5.10, offene Kreise). Das Ergebnis steht damit mit den Beobachtungen bei nicht-standardisierten Carrageenansystemen in Einklang. Bei einem Einsatz von 0,04 % standardisiertem Carrageenan muss folglich ebenso mit einer deutlichen Abhängigkeit der Stabilisierungseigenschaften gerechnet werden wie bei Mischungen mit 0,025 % nicht-standardisiertem Carrageenan. Die folgenden rheologischen Kennzahlen werden daher nur noch an Mischungen mit reinem, also unstandardisiertem Carrageenan diskutiert.

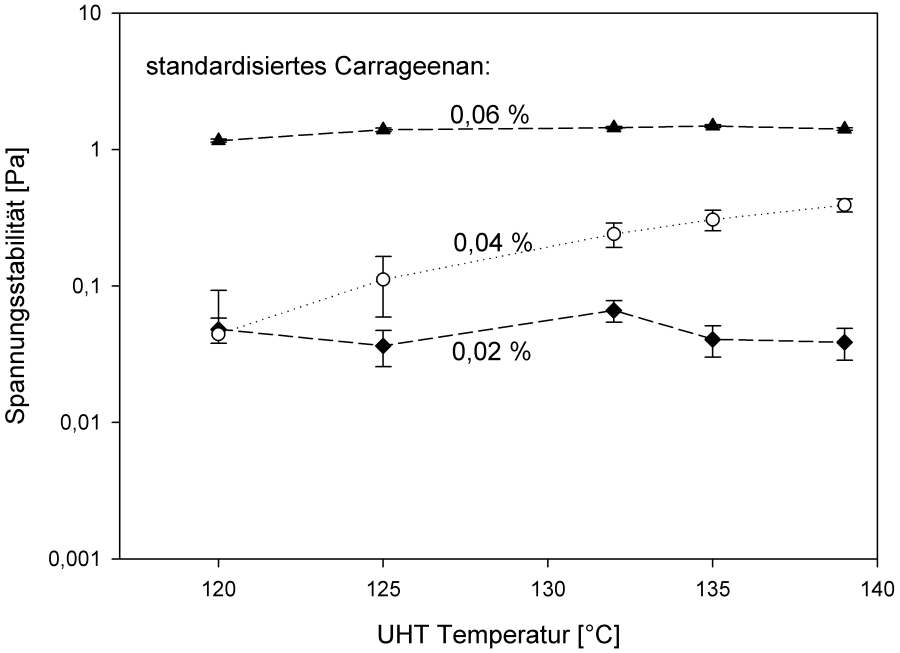

Abb. 5.10: Spannungsstabilität am Strukturpunkt in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur für Biopolymermischungen mit unterschiedlichem Anteil an standardisierten Carrageenan.

Weitere Hinweise auf die Eigenschaften der Mikrostruktur ergeben sich aus dem Verhalten der Viskositätswerte bei steigender Schubspannung. Am deutlichsten wird die tragende Rolle der Proteincluster am Aufbau einer zusammengesetzten, umfassenden Netzwerkstruktur bei der Prozessabhängigkeit des Viskositätsabfalls am Strukturpunkt dieser Systeme. Ein hoher Wert des Viskositätsabfalls steht für ein plötzliches, schlagartiges Abreißen vieler Verknüpfungspunkte einer Netzwerkstruktur, wenn die Spannungsstabilität überschritten wird (Rodd et al., 2000). Dies ist ein Verhalten, das klar einer zusammengesetzten Struktur aus durch Proteincluster vernetzen Carrageenanhelices zugeschrieben werden kann. Ein höherer Wert des Viskositätsabfalls zeigt damit einen höheren Vernetzungsgrad benachbarter Carrageenanhelices durch Proteincluster. Die Proteincluster sind dabei jedoch als Schwachstelle im zusammengesetzten Netzwerkverband zu sehen, da ihr innerer Zusammenhalt vor allem auf schwachen Wechselwirkungen basiert. Damit deutet ein starkes, deutliches Abfallen der Viskosität am Strukturpunkt auf einen klaren, gleichzeitigen Abriss vieler Verbindungspunkte in einer Netzwerkstruktur hin.

Durch dieses Verhalten fällt bei der Auswertung des Viskositätsabfalls am Strukturpunkt der Carrageenankonzentrationsbereich von 0,025 bis 0,030 % auf (Abb. 5.11). Die Messwerte bei höheren Carrageenankonzentrationen, wie beispielsweise 0,040 %, zeigen auch hier nur einen geringen Prozesseinfluss. Der größte Viskositätsabfall wird bei einem Polysaccharidanteil von 0,030 % ab einer UHT-Temperatur von 125 °C festgestellt. Eine deutliche Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur mit Änderungen über eine Zehnerpotenz zeigen Systeme mit 0,020 und 0,025 %

Carrageenan. Auch in Abbildung 5.11 sind die Linien zur visuellen Hilfe mit SigmaPlot interpoliert.

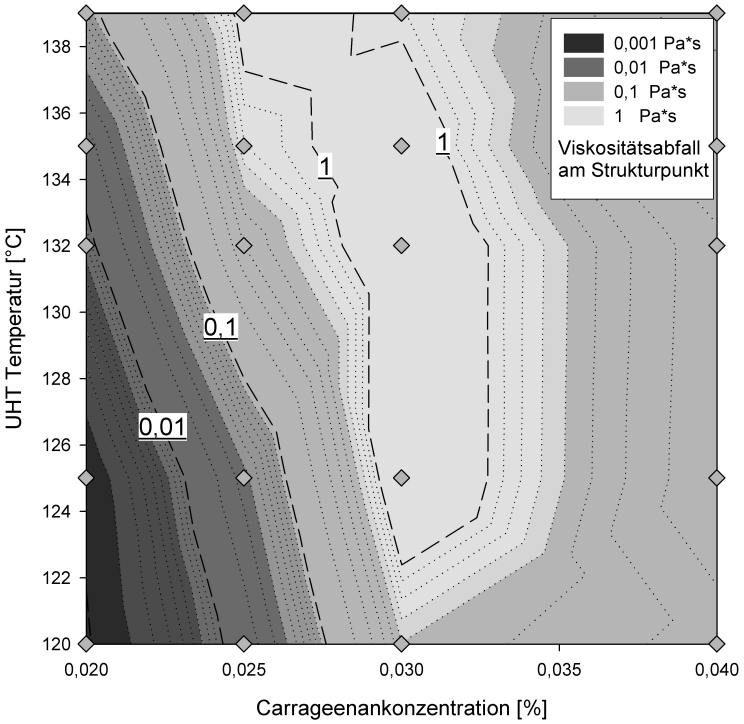

Abb. 5.11: Viskositätsabfall von Milchmischsystemen in Abhängigkeit des Anteils an unstandardisierten Carrageenan und der UHT-Erhitzungstemperatur.

Der deutliche Viskositätsabfall am Strukturpunkt gilt als Hinweis auf die Beteiligung von Proteinclustern an einer Netzwerkstruktur, da diese als schwächstes Glied bei einer Überscherung schlagartig auseinanderreißen. Es ist für das Mischsystem jedoch thermodynamisch vorteilhaft, die nach dieser Zerstörung der Mischstruktur auseinandergebrochenen Proteinclusterreste in einer nachfolgenden Ruhephase wieder in die ursprüngliche Struktur zu integrieren. Für ein umfassendes Bild der thermodynamischen Mechanismen wurden daher parallel zu den Schubspannungskurven zerstörungsfreie oszillatorische Messungen als zweites rheologisches Analyseverfahren durchgeführt. Bei beiden rheologischen Analyseverfahren war die Vorscherbelastung mit einer anschließenden Ruhepause von 15 Minuten zum Strukturaufbau vor der eigentlichen Analyse gleich. Die zerstörungsfreie Messung bei oszillierenden rheologischen Methoden ermöglicht aber zusätzlich die Erfassung des Wiederaufbaus der Struktur im Mischsystem während der Ruhepause nach der Vorscherung. Der Anstieg des elastischen Anteils bzw. die entsprechende Abnahme des Phasenwinkels δ in dem System während dieser Ruhezeit entspricht damit der Geschwindigkeit des Strukturaufbaus.

Der Einfluss von Carrageenankonzentration und UHT-Erhitzungstemperatur auf die Strukturaufbaugeschwindigkeit nach der definierten Vorscherung (6 Pa für eine Dauer von 3 min) ist in Abbildung 5.12 gezeigt. Ähnlich wie bei der Messung des Viskositätsabfalls (Abb. 5.11) sind die Höchstwerte bei diesem Messverfahren für Systeme mit 0,030 % Carrageenan zu verzeichnen. Die Strukturaufbaugeschwindigkeit nimmt für Systeme mit 0,020 bis 0,030 % Carrageenan mit steigender UHT-Temperatur und Polysaccharidkonzentration zu. Mischungen mit 0,040 % Carrageenan liegen mit ihrer von den Prozessbedingungen unabhängigen Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit unter dem Maximum bei 0,030 %. Dies deutet auf eine Dominanz der sperrigeren und damit langsameren Carrageenanhelices für die Struktur dieser Biopolymermischung hin.

Die untergeordnete Rolle der Proteincluster bei 0,040 % Carrageenan wird damit auch bei einer zerstörungsfreien Messung des rheologischen Frequenzspektrums deutlich (Abb. 5.13). Die Steigung des elastischen Moduls über der Frequenz spiegelt den Vernetzungsgrad im Mischsystem wider. Je niedriger dieser Wert ist, desto vernetzter ist die Probe, da weniger unabhängige Resonanzschwingungen auftreten (Sedlmeyer et al., 2003). Die Fehlerbalken in Abbildung 5.12 zeigen Fisher's least significant difference (LSD). Wie in den vorangegangenen Analysen wird dadurch

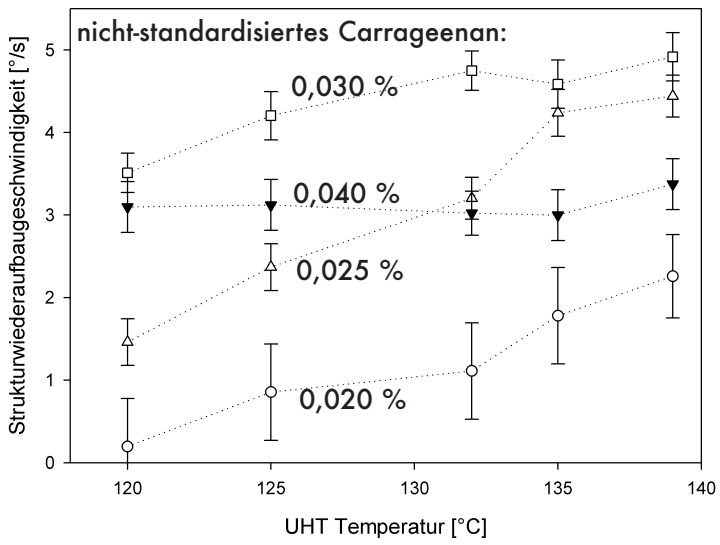

Abb. 5.12: Geschwindigkeit des Strukturwiederaufbaus von Milchproteinsystemen mit verschiedenen Zusätzen an nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzungstemperatur.

deutlich, dass auch bei dieser rheologischen Kennzahl (Abb. 5.13) kein signifikanter Prozesseinfluss bei Mischungen mit 0,040 % Carrageenan auftritt (d.h. überlappende Mindestsignifikanzintervalle). Generell nimmt der Vernetzungsgrad mit sinkender Carrageenankonzentration ab (d.h. der Wert der in Abb. 5.13 angezeigten Kennzahl steigt, da das Antwortsignal stärker von den individuellen Resonanzfrequenzen der einzelnen Strukturelemente abhängt). Vor allem bei einem Polysaccharidgehalt von 0,025 % fällt eine deutliche Abhängigkeit von der UHT-Temperatur auf.

Der Strukturwiederaufbau in der Ruhephase führt zu einem Mischsystem, dessen rheologisch erfassbare Mikrostruktur durch den Phasenwinkel δ beschrieben werden kann. In Abbildung 5.14 wird die Abhängigkeit des Betrags des Phasenwinkels δ von Carrageenankonzentration und Erhitzungsbedingungen durch interpolierte Linien dargestellt. Der Phasenwinkel δ spiegelt das Verhältnis zwischen elastischem

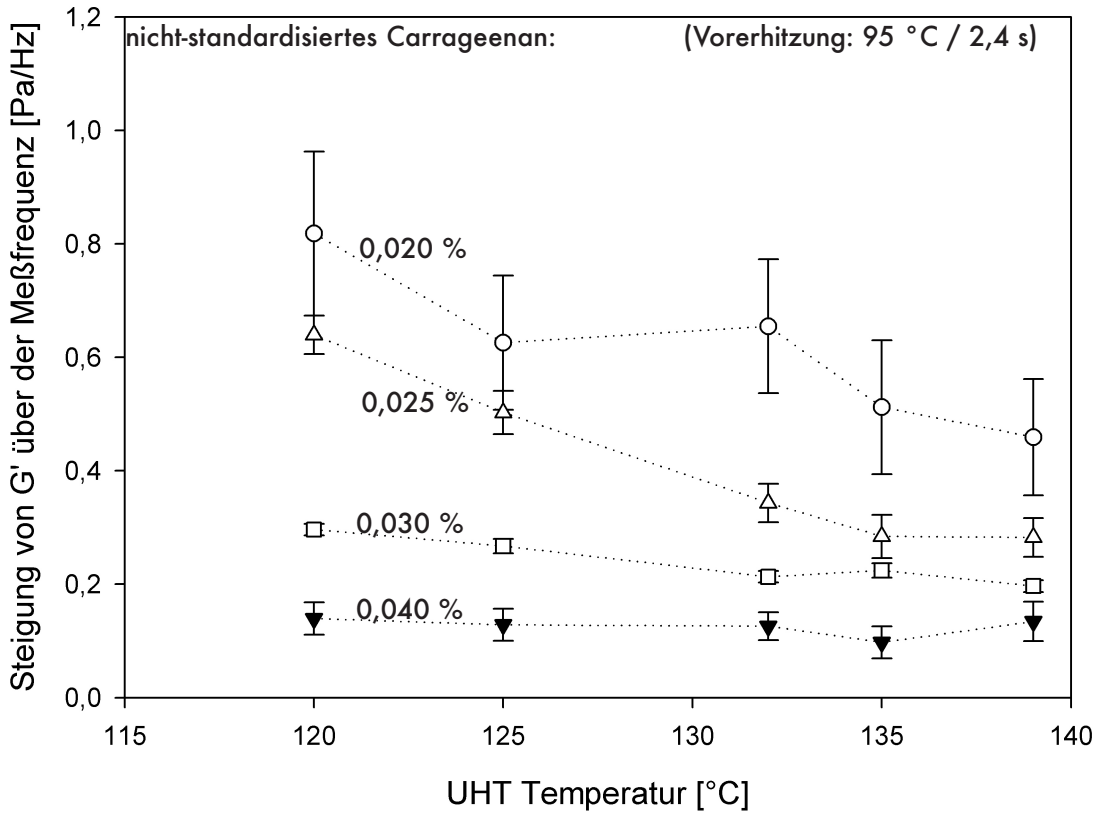

Abb. 5.13: Steigung der Abhängigkeit des elastischen Moduls G‘ von der Messfrequenz als Indikator für den Interaktionsgrad in Milchmischsystemen mit verschiedenem Anteil an nicht-standardisiertem Carrageenan. Aufgetragen über der Variation der UHT-Erhitzungstemperatur.

und viskosem Anteil in der rheologischen Mikrostrukturmessung wider. Je höher der Phasenwinkel δ steigt, desto unzusammenhängender werden assoziierte Strukturen. In diesem Fall kann dies einer Flüssigkeitsmatrix gleichgesetzt werden, in der Gelfragmente wie Flocken schweben. Die Flüssigkeitsmatrix bildet die kontinuierliche Phase, wenn δ Werte über 45° aufweist. Die Gelfragmente sind dabei für den nach wie vor vorhandenen elastischen Anteil verantwortlich. Bei δ=45° sind beide Anteile gleich. Liegen die Werte unter 45°, überwiegt der elastische Anteil, was auf eine das ganze Volumen erfüllende kontinuierliche Netzwerkstruktur hinweist. Der höchste elastische Anteil, also entsprechend der niedrigste Phasenwinkel, findet sich unabhängig von der UHT-Temperatur bei Systemen mit einer Carrageenankonzentration von 0,040 %. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Strukturpunktanalyse (vgl. Abb. 5.9 und 5.11). Auch hier zeigen verschiedene Kenngrößen bei einer Zugabe von 0,040 % Polysaccharid keinen Einfluss der Prozessparameter. Bei niedrigeren Carrageenankonzentrationen unterliegt dagegen der Phasenwinkel δ einem gewissen Einfluss der Herstellungstemperatur. Allgemein muss der Phasenwinkel mit dem Polysaccharidanteil ansteigen, da über die Erhöhung des Helixanteils in der Mischstruktur die kontinuierliche Netzwerkstruktur vergrößert wird.

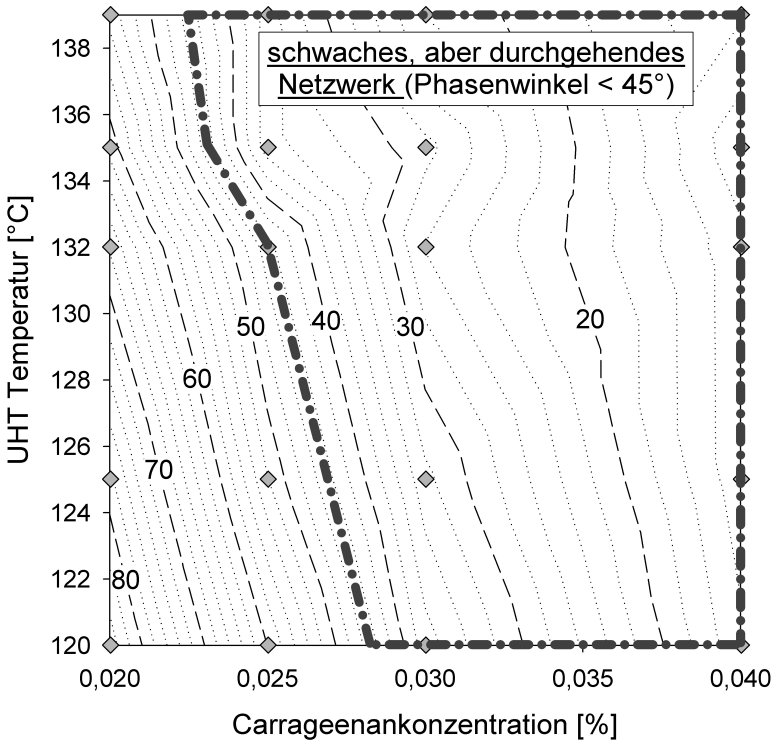

Abb. 5.14: Phasenwinkel δ für Milchmischsysteme in Abhängigkeit der Zugabe an unstandardisierten Carrageenan und der UHT-Erhitzungstemperatur.

Zieht man zu diesem rheologisch messbaren Übergang zu einem durchgehenden Netzwerk als Referenz ein Phasendiagramm eines übertragbaren Modellsystems heran, so liegen Mischsysteme mit 3,4 % Milchprotein und einer Carrageenankonzentration von 0,04 % oberhalb der Phasengrenze von "flüssig ("liquid-stable")" zu Gelstrukur"("gelled"; Abb. 5.1; SCHORSCH ET AL., 2000). Hier ermöglicht die höhere Carrageenankonzentration bei diesen Mischungen eine höhere Packungsdichte der Polysaccharidstränge im Systemvolumen. Aufgrund von Knickstellen in den Carrageenansträngen steigt mit einer dichteren Verteilung der Makromoleküle auch die Wahrscheinlichkeit für Assoziationen an den Kreuzungspunkten zweier benachbarter Carrageenanhelices ohne Beteiligung einer Proteinclusterbrücke (REES, 1972; MORRIS ET AL., 1980; PICULELL ET AL., 1992). Mit steigender Polysaccharidkonzentration nimmt damit die Rolle der Proteincluster für den Aufbau einer durchgehenden, zusammenhängenden Struktur ab, die rheologischen Eigenschaften werden immer stärker durch Carrageenan dominiert. Da das Polysaccharid im untersuchten UHT-Erhitzungsbereich keine Modifikationen erfährt, ist entsprechend kein signifikanter Einfluss der Prozessbedingungen feststellbar. Wird dagegen eine Carrageenankonzentration von 0,025 % eingesetzt, wird diese ausreichend hohe Packungsdichte

von Carrageenan nicht mehr erreicht. Die fehlenden Verbindungen für ein das ganze Systemvolumen beherrschendes Netzwerk müssen dann über Proteincluster realisiert werden. Wie aus Untersuchungen an Modellsystemen bekannt ist, können Erhitzungsbedingungen Veränderungen verschiedener Milchproteineigenschaften verursachen. Dies spiegelt sich fortlaufend in dem deutlichen Prozesseinfluss auf verschiedene rheologische Eigenschaften wider, wenn eine Carrageenankonzentration von 0,025 % vorliegt.

Da die bisher vorgestellten Ergebnisse durchgehend einen deutlichen Prozesseinfluss bei Systemen mit 0,025 % Carrageenan zeigen, wurden bei dieser Mischung ergänzende Partikelgrößenmessungen durchgeführt, um die Rolle der Proteincluster zu bestätigen. Abbildung 5.15 verdeutlicht den erhitzungstemperaturabhängigen Anstieg der Proteinclustergröße, wodurch eine bessere brückenbildende Rolle der Milchproteine im Mischsystem zum Ausdruck kommt.

Zum Vergleich ist in Abbildung 5.15 ein weiteres Mischsystem mit 0,020 % Carrageenankonzentration angeführt. Offensichtlich führt diese Verminderung um 0,05 % Carrageenan jedoch zum Unterschreiten des Mindestvolumenanteils, den die Biopolymere erfüllen müssen, um gemeinsam ein durchgehendes, raumausfüllendes Netzwerk auszubilden (Abb. 5.14). Aufgrund der geringeren Polysaccharidmenge fällt die Mikrophasentrennung zu Proteinclustern geringer aus. Zwar kann die Proteinclustergröße durch die Prozessbedingungen in einem gewissen Rahmen gesteigert werden (Abb. 5.15). Das Niveau der Partikelgröße ist jedoch auch bei hohen UHT-Temperaturen zu niedrig, um ein durchgängiges, zusammengesetztes Netzwerk aufzubauen und damit einen Phasenwinkel kleiner als 45° zu verursachen (Abb. 5.14).

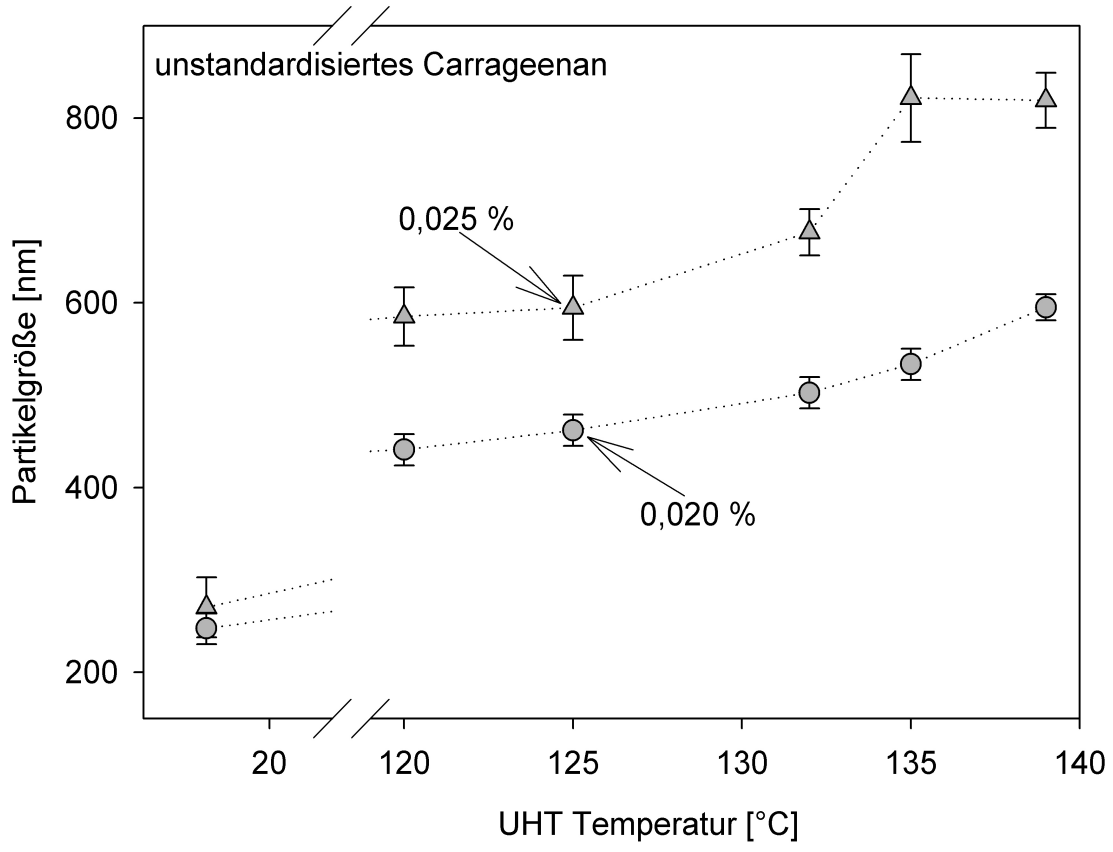

Abb. 5.15: Mittlerer Partikeldurchmesser für Milchmischsysteme mit verschiedenen Carrageenankonzentrationen in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzungstemperatur.

Durch die feinere Abstufung des Polysaccharidzusatzes ist eine bessere Abgrenzung zwischen Systemen mit aktiver Beteiligung und Integration der Proteincluster und carrageenandominierten Systemen möglich. So zeichnet sich in den vorgestellten rheologischen Eigenschaften ein synergistisches Zusammenspiel von Carrageenanhelices und Proteinclustern im Grenzbereich (0,025 bis 0,030 %) zu carrageenandominierten Strukturen bei 0,040 % Polysaccharidzugabe ab. Aufgrund prozessabhängiger Veränderungen der Milchproteine wird dieses Zusammenspiel beider Biopolymere durch eine klare Korrelation zu den jeweiligen Prozessbedingungen deutlich. Ein Fehlen der Prozessabhängikeit zeigt dagegen das Überschreiten der Grenze zu carrageenandominierten Systemen wie bei Polysaccharidkonzentrationen von 0,040 %. Bei Mischungen von 0,020 % findet sich zwar auch eine gewisse Korrelation zu den Prozessbedingungen während der Herstellung. Wie bereits im Detail erörtert, ist bei dieser niedrigen Carrageenankonzentration der Volumenanteil des Carrageenans zu gering und sind die Proteincluster zu klein, um ein das gesamte Systemvolumen ausfüllendes Netzwerk zu bilden. Strukturstabilität oder Vernetzungsgrad können diesen Übergang von Gelfragmenten zu einem durchgehenden Netzwerk jedoch nur indirekt zeigen: Der Übergang zu einem geschlossenen Netzwerk spiegelt sich in den Werten der Spannungsstabilität (=Stabilität der Struktur gegenüber Spannungskräften) durch einen Anstieg um eine Zehnerpotenz wider (vgl. Abb. 5.9). Beim Vernetzungsgrad kann mit Hilfe der korrespondierenden Werte des Phasenwinkels δ in etwa eine Steigung des elastischen Modulus im Frequenzspektrum unterhalb von 0,37 Pa•s vollständig vernetzten Systemen zugeordnet werden (vgl. Abb. 5.13 & 5.14). Mischungen mit 0,020 % Carrageenan weisen dagegen bei einer Erhitzungstemperatur von 120°C für diese Steigung einen Wert von 0,8 Pa•s auf.

Diese indirekte Erfassung des assoziierten Volumens der Mikrostrukturelemente kann durch eine Prüfung auf mögliche Korrelationen mit anderen unabhängigen direkten Messverfahren validiert werden. Tabelle 5.1. zeigt die Korrelationskoeffizienten und das Bestimmtheitsmaß R^2 zwischen mittlerer Partikelgröße und dem Vernetzungsgrad (Steigung von G' über der Messfrequenz). Der Betrag des Korrelationskoeffizienten liegt bei beiden Beispielsystemen höher als 0,97. Die rheologische Kennzahl verhält sich umgekehrt proportional zum mittleren Partikeldurchmesser. Mit steigender UHT-Erhitzungstemperatur sinkt bei einer Mischung mit 0,025 % Carrageenan die Steigung von G' über der Messfrequenz von 0,64 auf 0,28. Dies bedeutet, dass der Vernetzungsgrad zunimmt. Mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 95,5 wird bei dieser Mischung die Korrelation zu dem ebenfalls aufgrund der UHT-Temperatur von 585 auf 819 nm gestiegenen Partikelgrößenmittelwert deutlich. Hinsichtlich der Mikrostruktur dieser Biopolymermischung bestätigt dies, dass die Proteincluster anfangs aufgrund ihrer zu geringen Größe (bezogen auf die Raumverteilung der Carrageenanstränge im Volumen) nur vereinzelt benachbarte Carrageenanhelices zu Mischgelflocken verbinden können. Erst ab einem Carrageenangehalt von 0,025 % können sie mit zunehmendem Durchmesser im gesamten Systemvolumen ein durchgehendes Netzwerk aufbauen. Die Größe der Proteincluster hängt offensichtlich von zwei Faktoren ab, von Carrageenankonzentration und UHT-Erhitzungstemperatur. Der grundlegende Mechanismus ist thermodynamischer Art, wie nachfolgend erläutert wird.

Vereinfacht gesagt, erhöht sich für das Mischsystem bei einer gestiegenen Anzahl an Polysacchariden im Systemvolumen aufgrund des Platzbedarfs der Makromolekülketten der thermodyna-

Tab. 5.1: Korrelationskoeffizienten der mittleren Partikelgröße und der Steigung von G‘ über der Messfrequenz f für verschieden erhitzte Milchmischsysteme mit unterschiedlichem Carrageenananteil. Die Steigung von G‘ über f gilt als Indikator für den Interaktionsgrad im Mischsystem.

Carrageenan-konzentration [%]	UHT-Erhitzungs-temperatur [°C]	mittlere Partikelgröße [nm]	LSD d. Partikelgröße [nm]	Steigung von G’ über f [Pa/Hz]	LSD d. Steigung von G’ über f [Pa/Hz]	Korrelations-koeffizient	R^2
0,020	120	441	± 17	8,182e-01	± 1,181e-01	**-0,974**	**95,0**
	125	462	± 17	6,257e-01	± 1,181e-01		
	132	503	± 17	6,547e-01	± 1,023e-01		
	135	534	± 17	5,121e-01	± 3,402e-02		
	139	595	± 14	4,590e-01	± 3,804e-02		
0,025	120	**585**	± 32	**6,393e-01**	± 3,402e-02	**-0,977**	**95,5**
	125	595	± 35	5,026e-01	± 3,804e-02		
	132	676	± 25	3,431e-01	± 3,402e-02		
	135	822	± 48	2,840e-01	± 1,181e-01		
	139	**819**	± 30	**2,823e-01**	± 1,181e-01		

misch bedingte Zwang zu einer Optimierung der Anordnung der übrigen Biopolymere, d.h. die Proteineinheiten müssen enger und damit zu größeren Clusteraggregaten angordnet werden. Mit steigendem Anteil von Carrageenan in der Biopolymermischung steigt die Konkurrenz um freie Wassermoleküle für den Aufbau einer Hydrathülle zu einer vollständigen Lösung der Makromoleküle, da diese nur dann ihre vollständige Flexibilität im Serumvolumen erreichen. Die größtmögliche Anzahl an flexiblen Anordnungen der Polymere ist jedoch eine Grundvoraussetzung für die vom 2. Hauptsatz der Thermodynamik geforderte Maximierung der Entropie. Je mehr Volumen in der Mischung von Polysaccharidsträngen belegt ist, desto stärker wird der Bedarf, durch die zur Verfügung stehenden physikalischen Kräfte eine - thermodynamisch gesehen - optimale Anordnung der Systemkomponenten zu finden. Bei vollständiger Hydratation der Makromoleküle bedeutet dies, wie in den theoretischen Grundlagen dargelegt, dass die Makromoleküle eine Konformation annehmen, die zur Entropiesteigerung die Freisetzung eines möglichst großen Anteils der von Polymeren eingeschlossenen Lösungsmittelvolumina (excluded volume) ermöglicht. Die von verschiedenen Modellversuchen bekannte Mikrophasenseparation, welche bei Erhitzung aufgrund vollständiger Hydratisierung der Carrageenanknäuel auftritt, fällt damit - abhängig von den durch die Polysaccharidkonzentration erzeugten thermodynamischen Kräften, wie dem “excluded volume”-Effekt - mehr oder weniger stark aus. Auf zwei Aspekte soll in diesem Zusammenhang besonders hingewiesen werden:

1.) Der Aggregationsgrad der Proteincluster hängt also von der Entropie im Mischsystem ab. Die entscheidende thermodynamische Größe, die freie Enthalpie im System, wird allerdings nicht nur von der Entropie bestimmt, sondern auch noch von einem Enthalpieanteil in der Energiebilanz. Dieser Anteil wird von elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflusst, die sich aus der

Serumionenzusammensetzung und spezifischen Wechselwirkungen zwischen polyionischen Biopolymeren ergeben, wie z.B. im Fall von κ-Casein und κ-Carrageenan (SNOEREN ET AL., 1975).

2.) Nach Aspekt 1 ist die Serumionenzusammensetzung ein entscheidender Einflussfaktor auf das thermodynamische Verhalten des Mischsystems. In komplexen Biopolymermischungen beruht der Ionengehalt in der Regel jedoch auf Fließgleichgewichten und wird durch Prozesseinflüsse modifiziert. Bei dem hier untersuchten Beispielsystem ist zudem zu beachten, dass die Art des Gelaufbaus des verwendeten κ-/ι-hybrid Carraggeenan durch das Kalium-Calcium-Verhältnis bestimmt wird (SEDLMEYER ET AL., 2003). Der Gehalt an gelösten Calciumionen hängt in diesem Mischsystem jedoch vom Calciumphosphatgleichgewicht ab, für das bei Erhitzung von Caseinmicellen im UHT-Bereich Verschiebungen beschrieben wurden (O'CONNELL ET AL., 1999).

Bei dem hier vorliegenden komplexeren Mischsystem spiegeln sich einige Aspekte dieser Grundlagenerkenntnisse durchaus wider. In einem nächsten Schritt soll nun der nicht-lineare Anstieg der Proteinclustergröße erklärt werden. Nachvollziehbar ist eine Kombination der einzelnen oben genannten, aus Modellversuchen abgeleiteten Zusammenhänge. Betrachtet man zunächst als Hauptfraktion der Milchproteine die Caseinmicellen, so treten bei Temperaturen von 120 bis 139 °C verschiedene Modifikationen ihrer inneren Struktur auf. Die bereits genannte Verschiebung zwischen kolloidalem und gelöstem Calciumphosphat führt zu weiteren Veränderungen im Zusammenspiel der einzelnen Caseinfraktionen. Beispiele hierfür sind das vereinzelte Ausscheiden von Caseinmonomeren aus dem Micellenverband einerseits und ein höherer Vernetzungsgrad über kovalente Bindungen innerhalb der Micelle andererseits (BULCA ET AL., 2004).

Wird dieser Hintergrund auf das hier untersuchte, komplexere Stoffsystem übertragen, bedeutet eine dementsprechende Modifikation der Caseinmicellen, dass die Elastizität der Proteincluster aufgrund einer höheren Anzahl interner kovalenter Bindungen mit steigender UHT-Temperatur zunimmt. Gleichzeitig erhöht sich mit der Prozesstemperatur die Ionenstärke im äußeren Milieu, da aufgrund der Gleichgewichtsverschiebung mehr kolloidale Calciumionen in Lösung gehen. Dies reduziert zum einen das diffuse Potential (Sternmodell) um suspendierte Teilchen, so dass eine Aggregation zu Proteinclustern erleichtert wird. Aus dem Micellinneren freigesetzte Calciumionen neutralisieren negative Partialladungen an Oberflächen benachbarter Teilchen, was strukturstabilisierend und enthalpieminimierend wirkt. Dies wirkt sich insgesamt positiv auf den Ausbau zu einer kontinuierlichen, das gesamte Volumen umfassenden Netzwerkstruktur aus.

Folgerichtig spiegelt sich dieser UHT-temperaturabhängige Strukturaufbau in verschiedenen rheologischen Eigenschaften wider. In dieser Arbeit ist der Phasenübergang zu einem kontinuierlichen Netzwerk auf Mikroskalaebene durch den Grenzwert von 45° des Phasenwinkels δ definiert. Grundsätzlich hängen diese und andere rheologische Eigenschaften bei Carrageenansträngnetzwerken sehr stark von der Verteilung von Verknüpfungspunkten aggregierter Doppelhelices ab (MORRIS ET AL., 1980). Zur räumlichen Verknüpfung dieser Aggregationspunkte dienen Knickstellen in der Makromolekülkette zwischen den Abschnitten an und für sich linearer Carrageenanhelices (REES, 1972). Sie müssen jedoch in einer bestimmten Mindestfrequenz auftreten, die bei reinen Carrageenannetzwerken auf einer unvollständigen Umwandlung von μ- bzw. ν-

Carrageenaneinheiten beruht. Diese "hetero-units" treten in einem geringen Ausmaß in der Polysaccharidkette auf und verursachen die für ein dreidimensionales Strangnetzwerk notwendigen abknickenden Unterbrechungen von helixbildenden Abschnitten (PICULELL ET AL., 1992). Damit nun der auf Verbindungen zwischen einzelnen Struktureinheiten beruhende, elastische Anteil in der Mischgelstruktur überwiegt, sind bei 0,025 % Carrageenan zusätzliche Verbindungen benachbarter Polysaccharidhelices notwendig, da die natürlichen Knickstellen der Carrageenanstränge nicht für eine dreidimensionale Vernetzung ausreichen. Statistisch gesehen steigt damit die Wahrscheinlichkeit für erfolgreich geknüpfte Verbindungen in allen drei Dimensionen statt einer "collection of isolated chain pairs" (REES, 1972).

In dieser komplexen Mischung ist nun der Einfluss des Zusammenspiels beider Biopolymere zu berücksichtigen, bzw. die prozessinduzierte Veränderung der Milchproteine auf die Verknüpfungspunkte. Erfolgreich geknüpfte elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen beeinflussen die Beweglichkeit der benachbarten Abschnitte in den Makromolekülen. Konnten sich beispielsweise zwei gleichgeladene ionische Gruppen aufgrund der elektrostatischen Abstossung nicht einander annähern und wirken sie damit wie eine virtuelle sterische Blockadestelle gegenüber den Drehmöglichkeiten der Makromolekülkette, so ist dies nach der Neutralisierung dieser ionischen Gruppen nicht mehr der Fall. Damit erhöht sich die Beweglichkeit in diesem Makromolekülsegment und mündet schließlich in einen höheren Grad von Kooperativität zur Assoziation hydrophober Gruppen (CARAM-LELHAM ET AL., 1997; TOSTOGUZOV, 2003). Letzteres ergibt wiederum durch das Freisetzen einer hohen Anzahl von Lösungsmittelmolekülen einen Anstieg der Entropie. Im Sinne einer Minimierung der freien Enthalpie ist dies thermodynamisch von Vorteil.

Mit diesen Vorgängen werden auch Anzahl und Winkel dieser Knickstellen beeinflusst. Folglich wirken auf den Aufbau der Carrageenanhelices auch Veränderungen der Ionenzusammensetzung des Milchserums, wie beispielsweise aufgrund der Calciumphosphatgleichgewichtsverschiebung in Caseinmicellen bei UHT-Bedingungen. Abhängig von der Zusammensetzung verfügbarer Ionen zur Neutralisation der Sulphatgruppen während des Coil-Helix-Übergangs, wird bei κ-/ι-Hybridcarrageenan die Helixbildung bestimmter Carrageenanabschnitte gefördert (SEDLMEYER ET AL., 2003). So werden in κ-dominierten Abschnitten bevorzugt Kaliumionen zum Ladungsausgleich herangezogen, in ι-dominierten Abschnitten Calciumionen (SYRBE ET AL., 1998). Zu betrachten ist nun, inwieweit diese aufgrund der Prozessbedingungen verursachten Modifikationen im thermodynamischen Zusammenspiel der Biopolymermischung die Anzahl der Knickstellen bzw. den Anteil an in Verschlaufungen assoziierten Makromolekülabschnitten erhöhen, oder ob dies allein von der Carrageenankonzentration bestimmt wird. Die Veränderung von verbundenen Abschnitten der Carrageenanhelices kann durch eine Berechnung des Molekulargewichts des Anteils verschlaufter Makromoleküle abgeschätzt werden. Das Kalkulationsverfahren ist aus der Analyse synthetischer Polymere bekannt (FUCHS ET AL., 1996). Die bereits im Kapitel 2.1.5 genannte Gleichung bildet die Berechnungsgrundlage (DOI ET AL., 1986):

$$M_e = \frac{\rho \cdot R \cdot T}{G_{N0}} \qquad \text{(Gl. 2.39)}$$

Gleichung 2.39 ermöglicht - unter Berücksichtigung von Dichte ρ, allgemeiner Gaskonstante R und Temperatur T - aus der rheologischen Messung des elastischen Modulus G_{N0} die Berechnung der Größe des für dieses Messsignal zugrunde liegenden Molekülverbands (LARSON, 2003). M_e repräsentiert damit das Molekulargewicht aller miteinander verbundenen (="verschlauften") Moleküle und wird als Verschlaufungsmolekulargewicht bezeichnet. In dem hier untersuchten Biopolymermischsystem umfasst dies alle miteinander assoziierten Proteincluster und Carrageenanstränge. Bei der Anwendung von Gl. 2.39 müssen jedoch folgende Aspekte unbedingt berücksicht werden:

Die hier verwendeten Biopolymere besitzen im Gegensatz zu synthetischen Polymeren aufgrund ihres natürlichen Ursprungs eine relativ breite Molekulargewichtsverteilung. Da die rheologische Charakterisierung anhand des vollständigen Mischungsvolumens ohne Aufschlüsselung auf einzelne Inhaltsstoffe erstellt wurde, kann sich eine Interpretation der Messdaten immer nur auf komplexe Strukturen aus dem Zusammenspiel beider Biopolymere beziehen. Zudem ist zu beachten, dass mit den vorhandenen Mitteln bei diesem System als Datengrundlage nicht der vollständige Frequenzbereich im Sinne einer rheologischen Masterkurve zur Verfügung gestellt werden kann. Damit kann nur ein relatives Minimum des Phasenwinkels δ zur Bestimmung von G_{N0} herangezogen werden, was eine Einschränkung der Anforderungen zur Definition dieses Faktors bedeutet (LARSON ET AL., 2003). Das Ziel dieser Arbeit besteht jedoch nicht in der Bestimmung absoluter Werte, zumal deren Streubreite aufgrund der breiten Molekulargewichtsverteilung der beteiligten Biopolymere nur einen Wertebereich umfassen kann. Daher wird hier als Grundlage für G_{N0} das Minimum des Phasenwinkels im Frequenzspektrum von 0,01 bis 3 Hz herangezogen. Das damit berechnete scheinbare Verschlaufungsmolekulargewicht eignet sich gut zum relativen Vergleich von Biopolymermischungen verschiedener Zusammensetzung und Herstellungsgeschichte. Dabei wird nicht der Anspruch auf eine absolute Klassifizierung von Polymereigenschaften erhoben. Durch den Zusatz "scheinbar" wird im Folgenden diesen Einschränkungen Rechnung getragen.

Das Verschlaufungsmolekulargewicht M_e bildet eine wichtige Grundlage in der Modellvorstellung des thermodynamischen Verhaltens von Polymeren. Gemäß dem Flory-Huggins-Modell werden die Aufenthaltsbereiche unabhängig schwingender Abschnitte der Makromolekülketten in sogenannte Röhrensegmente (= "tubes" = Röhrenabschnitte) eingeteilt, um Knickmöglichkeiten und damit die für die Entropie entscheidende Anzahl an möglichen Konformationen zu erfassen. Die Anzahl der Röhrenabschnitte Z lässt sich mit folgender Gleichung aus dem Molekulargewicht M und dem Verschlaufungsmolekulargewicht M_e berechnen (DOI ET AL, 1986):

$$Z = \frac{5}{4} \cdot \frac{M}{M_e} \qquad \text{(Gl. 2.40)}$$

Die Berechnung der Röhrensegmentanzahl ermöglicht einen wichtigen Einblick in den Aufbau der Mikrostruktur der Biopolymermischungen, die an der Grenze zu carrageenandominierten Systemen liegen (Abb. 5.16). Tabelle 5.2 zeigt die Veränderung der Röhrensegmentanzahl durch eine UHT-Behandlung bei höheren Temperaturwerten. Das nach Gleichung 2.39 berechnete

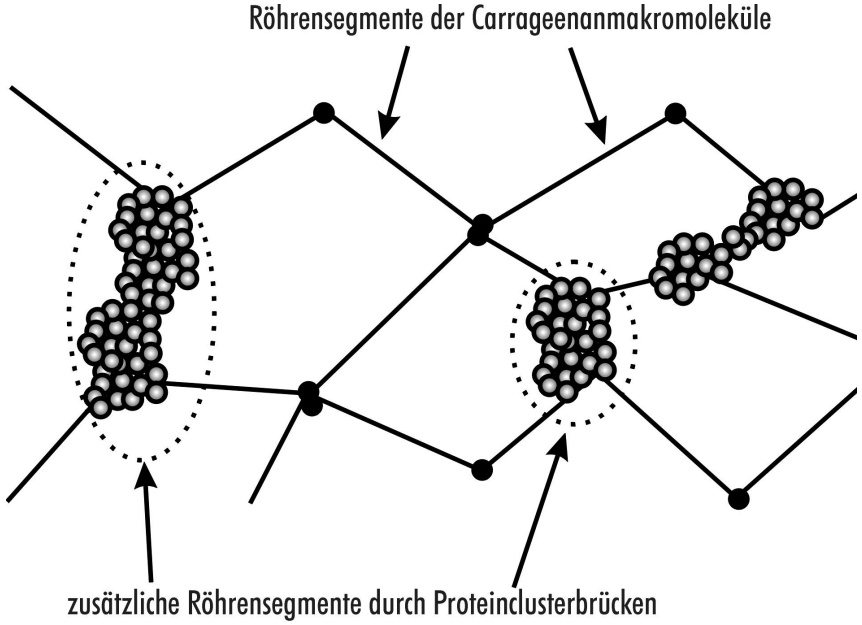

Abb. 5.16: Schematische Darstellung einer Aufteilung der Mischstruktur in Röhrensegmente.

Tab. 5.2: Scheinbares Verbundmolekulargewicht und Anzahl der dabei beteiligten Röhrensegmente für Milchmischsysteme verschiedener Carrageenankonzentration und unterschiedlicher UHT-Behandlung.

Carrageenan-konzentration [%]	UHT-Temperatur [%]	scheinbares Molekulargewicht von Verbund-einheiten Me [10^6 g/mol]	LSD von M_e [10^6 g/mol]	Mittlere Anzahl an scheinbaren Röhren-elementen Z bezogen auf Me: Z/Me [$*10^{-20}$]	Änderung von Z durch Anstieg der UHT-Temperatur im Vergleich zur jeweiligen bei 120 °C erhitzten Probe
0,020	120	2890000	± 938280	2,79	-
	125	1855000	± 938280	6,77	1,6
	132	1751000	± 663460	7,59	1,6
	135	1178000	± 663460	16,8	2,5
	139	897200	± 593420	28,9	3,3
0,025	120	649300	± 55589	55,2	-
	125	449333	± 58701	115	1,4
	132	385385	± 48842	157	1,6
	135	203750	± 50836	561	3,1
	139	218560	± 45470	487	3,0
0,030	120	192714	± 18757	627	-
	125	155667	± 20259	961	1,2
	132	92533	± 16542	2720	2,1
	135	112120	± 22193	1850	1,7
	139	49355	± 16542	9560	3,9
0,040	120	17100	± 1372	136200	-
	125	14962	± 1372	155600	1,1
	132	14308	± 1188	162700	1,2
	135	13356	± 1372	174300	1,3
	139	20743	± 1556	112300	0,8

scheinbare Molekulargewicht M_e von Verbundeinheiten bildet den Bezugspunkt für die mittlere Röhrensegmentanzahl Z. Je höher das Verhältnis von Z zu M_e ausfällt, desto mehr Querverbindungen sind in einem Netzwerksegment ausgebildet. Bei den hier untersuchten Mischsystemen ergeben sich für Z/M_e Werte im Bereich von 260 bis 174300 (Tab. 5.2). Der Anstieg der Werte lässt sich grundsätzlich auf die Carrageenankonzentration zurückführen. Bei einigen Mischungen spielt zusätzlich die UHT-Erhitzungstemperatur eine Rolle, wie in Tabelle 5.2 anhand der Änderung von Z im Vergleich zu der jeweiligen bei 120 °C erhitzten Probe deutlich wird (z.B. bei 0,025 % Carrageenan). Im Folgenden sollen drei Fälle, die aus unterschiedlichen Carrageenangehalten im Mischsystem resultieren, im Detail diskutiert werden:

1.) Niedriger Carrageenangehalt: 0,020 bis 0,025 %

Die Röhrensegmentanzahl repräsentiert die Gesamtzahl der Berührungspunkte von Carrageenansträngen untereinander und mit Milchproteinclusterbrücken. Betrachtet man den Einfluss der UHT-Temperatur auf die Anzahl der Röhrensegmente bei Systemen mit 0,020 und 0,025 % Carrageenan, so kann ein deutlicher Prozesseinfluss festgestellt werden. Die Anzahl der Röhrensegmente steigt mit höherer Prozesstemperatur im Vergleich zu einer Erhitzung bei 120 °C (Tab. 5.2) bis um den Faktor 3. Da Anfang und Ende eines Röhrensegmentes immer durch Knickstellen determiniert werden, gilt deren Anstieg immer auch als Indikator für eine höhere Anzahl von Knickpunkten bzw. einen Anstieg der Wahrscheinlichkeit von erfolgreichen dreidimensionalen Verknüpfungspunkten (Doi et al., 1986).

Die zerstörungsfreie oszillierende Messung des Phasenwinkels δ bei 0,1 Hz bestimmt, ob ein das ganze Volumen vollständig ausfüllendes Netzwerk vorliegt. Die Anzahl der berechneten Röhrensegmente gibt einen detaillierteren Einblick in den Aufbau der Mikrostruktur. Um den Zusammenhang dieser beiden Mischsystemeigenschaften zu verdeutlichen, sind diese Kennzahlen in Abbildung 5.17 gemeinsam aufgetragen.

In der Grafik wird ersichtlich, dass erst ab einer Anzahl von 500 Röhrensegmenten pro Verbundeinheit (als Molekulargewichtsmittelwert) Phasenwinkel messbar sind, die auf eine durchgehende Netzwerkstruktur hinweisen. Dem gegenüber treten bei Mischungen mit 0,020 % Carrageenan Systeme mit einem Phasenwinkel δ über 45° auf, was ein unverbundenes Gelflockensystem anzeigt. Damit wird die Mindestanzahl an erforderlichen Knickstellen in den Carrageenanhelices bzw. in der Mischgelstruktur deutlich, die notwendig ist, um eine durchgehende Netzwerkstruktur zu bilden, die über den Phasenwinkelwert messbar wird ($\delta \geq 45$).

Die Anzahl bzw. die Unterteilung der Carrageenanstränge in Röhrensegmente erhöht sich durch zwei Faktoren: Zum einen folgerichtig mit einem Anstieg der Carrageenankonzentration, zum anderen mit einer aktiven Beteiligung von assoziierten Proteinclustern an der Netzwerkstruktur. Die Beteiligung dieser Proteinbrücken am Strukturaufbau wird v.a. bei bestimmten Carrageenan:Protein-Verhältnissen mit steigender UHT-Temperatur deutlich.

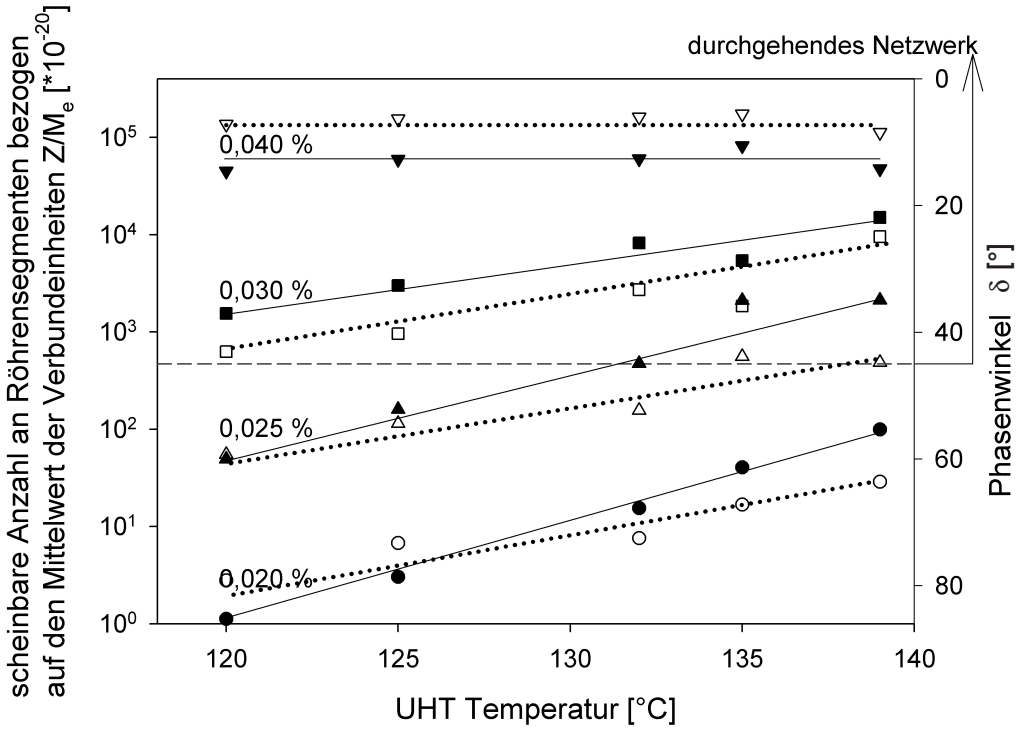

Abb. 5.17: Scheinbare Röhrensegmentanzahl Z in Abhängigkeit der UHT Temperatur für Milchmischsysteme mit unterschiedlichem Carrageenanzusatz (weiße Symbole, gepunktete Linien). Zur Verdeutlichung der Auswirkungen steigender Röhrensegmentzahlen sind zusätzlich die entsprechenden Werte des Phasenwinkels δ aufgetragen (schwarze Symbole, durchgehende Linien). Gestrichelte horizontale Linie: Grenze zu einer durchgehenden Netzwerkstruktur (δ≤45°).

2.) An der Grenze zu carrageenandominierten Systemen: 0,025 bis 0,030 % Carrageenan

Bei Carrageenankonzentrationen von 0,025 % bzw. 0,030 % findet sich dagegen ein erhitzungstemperaturabhängiger Anstieg der Knickpunkte bzw. Röhrensegmente wie auch eine Verminderung des Phasenwinkels δ unter 45°, womit der elastische Anteil im System überwiegt (Abb. 5.17). Dies bedeutet den Wandel zu einer durchgehenden Netzwerkstruktur. Diese Abhängigkeit von den Prozessbedingungen zeigt die aktive Rolle der an Carrageenan assoziierten Proteincluster beim Aufbau der gemischten Netzwerkstruktur. Bei einer erfolgreichen Integration der Proteincluster liegen dann an der Grenze zu carrageenandominierten Systemen abhängig von den Prozessparametern kompatible Mischungen vor. Diese haben den Vorteil, dass beide Biopolymere aktiv in der Mischgelstruktur integriert sind, so dass ein höherer Grad von Stabilität gewährleistet ist.

Spiegelt sich eine Temperaturabhängigkeit in diesen Kennzahlen wider, wird sie durch die prozessinduzierten Modifikationen der Milchproteine verursacht. Assoziationen zwischen Carrageenansträngen und Proteinclustern sind damit der Grund für die gegenüber einer Erhitzung bei 120 °C gestiegene Anzahl an Röhrensegmenten (z.B. 3,7-fach bei 0,030 % Carrageenan und Erhitzung bei 139 °C; Tab. 5.2). Die an Modellsystemen beschriebenen Auswirkungen einer UHT-Erhitzung auf Caseinmicellen passen gut ins Bild (Schreiber, 2001; Bulca et al., 2004). Für ein vollständiges Verständnis von komplexer aufgebauten Systemen werden die weiteren Inhaltsstoffe eines milchbasierten Systems in den nächsten Kapiteln dieser Arbeit behandelt.

3.) Bei hohen Carrageenankonzentrationen: 0,040 %

Vergleicht man den Einfluss der UHT-Temperatur auf die Änderung von Z in Mischungen mit jeweils konstantem Carrageenananteil, so fällt auf, dass der prozesstemperaturbedingte Anstieg der Röhrensegmente ab einer Carrageenankonzentration von 0,040 % gegenüber niedrigeren Konzentrationsstufen nicht mehr ins Gewicht fällt (Abb. 5.17). Der Faktor, um den sich die Anzahl der Röhrensegmente Z gegenüber dem Wert bei 120 °C erhöht, liegt in diesem Fall nur bei 0,8 bis 1,3 (Tab. 5.2). Hat ein Anstieg der UHT-Temperatur um 19 °C bei einem Carrageenanzusatz von 0,020 bis 0,030 % noch zu einem Anstieg der Knickpunktanzahl um den Faktor 3 geführt, so findet sich bei einem höheren Polysaccharidanteil kein Prozesseinfluss. Dies entspricht auch der fehlenden Temperaturabhängigkeit des Phasenwinkels δ in Abbildung 5.17. Bei UHT-Bedingungen von 139°C zeigt sich eher die Tendenz zu einer leichten Abnahme der Röhrensegmentanzahl. Dies deutet auf ein Verteilungsproblem hin, da Proteincluster und Carrageenanhelices sich in einem limitierten Volumen anordnen müssen. Aufgrund ihrer in dieser Mischung (0,040 % Carrageenan) höheren Raumdichte besteht schon über im Polysaccharid enthaltene Knickstellen eine ausreichende Anzahl von Berührungspunkten, ohne dass eine Beteiligung der Proteincluster notwendig ist. Wächst der Umfang der unbeteiligten Proteincluster aufgrund der Prozessbedingungen, so stellen sie nun eher eine Störstelle im dichter gepackten Carrageenansystem dar, da sie im gewissen Sinn wie Abstandshalter im Helixstapel wirken.

Daraus entstehende Spannungen haben eine schlechtere Integration der Proteincluster im carrageenanbasierten Netzwerk zur Folge. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die unter intensiver Hitzebelastung hergestellten Systeme mit 0,040 % Carrageenan eher eine Neigung zu Synäreseerscheinungen aufweisen, da Kontraktionskräfte aufgrund der fehlenden Integration der Proteincluster während der Lagerung ihre Wirkung voll entfalten können. Eine Sedimentation von Aggregaten und Entmischungserscheinungen ist die Folge.

Abschließend kann folgender Zwischenstand festgehalten werden:

1.) Ein deutlicher Einfluss des Herstellungsprozesses findet sich bei Mischungen von 3,4 % Protein und 0,025-0,030 % nicht-standardisierten, also reinem Carrageenan. Diese Systeme weisen eine zusammengesetzte Mischgelstruktur aus über Proteinbrücken verbundenen Carrageenanhelices auf.

2.) Die Geschwindigkeit, mit der sich das Milchprotein-Carrageenanmischgel nach Überscherung rekonstituieren kann, hängt von der Beteiligung und Größe der Proteincluster ab.

3.) Die Beteiligung der Proteinclusterbrücken beeinflusst das Frequenzantwortspektrum bei zerstörungsfreier oszillierender Messung des elastischen Moduls dieser Mischungen. Dies bedeutet, dass der Vernetzungsgrad der Mischstruktur von den Erhitzungsbedingungen abhängt.

4.) In Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur im UHT-Abschnitt erhalten die Proteincluster

die Fähigkeit, durch ihre Brückenbildung benachbarte Carrageenanhelices zu verbinden. Dies spiegelt sich bei Systemen mit einem Carrageenananteil bis 0,030 % in einer steigenden Anzahl von Knickstellen im Strangsystem wider. Bei höheren Carrageenankonzentrationen, wie z.B. 0,040%, erzeugen jedoch die in den Carrageenansträngen enthaltenen Unregelmässigkeiten aufgrund der höheren Packungsdichte schon eine ausreichende Anzahl an Röhrensegmenten und damit Berührungspunkten zum Aufbau eines eigenen Carrageenanhelixnetzwerks. Entsprechend fällt in diesen Systemen Proteinclustern nur eine passive Rolle zur Strukturbildung zu. Damit fehlt eine aktive Integration eines der beiden Biopolymere des Mischsystems, mit der entsprechenden Folge von Instabilitätserscheinungen.

Nachdem die bisher gezeigten Ergebnisse das Vorhandensein und die Messbarkeit von Prozesseinflüssen auf die Eigenschaften des gewählten Mischsystems bestätigen, soll nun in den nächsten Versuchen gezielt auf einzelne Inhaltsstoffe und verschiedene Aspekte im Herstellungsprozess eingegangen werden.

5.1.4 Rolle der Vorerhitzungsbedingungen / Molkenproteine

Bisher stand bei der Diskussion um prozessinduzierte Biopolymermodifikationen die Hauptfraktion der Milchproteine im Mittelpunkt. Im nächsten Schritt soll das Verhalten der zweitgrößten Proteinfraktion, der Molkenproteine, die ca. 1/5 des Gesamtproteingehalts ausmachen, betrachtet werden. Dazu wird eine Variation der Vorerhitzungsbedingungen gewählt, da bei diesem Prozessschritt bei 95 °C ausschließlich Molkenproteine beeinflusst werden, Caseinmicellen erfahren bei diesen Prozessbedingungen keine Veränderungen (O'Connell et al, 1999). Die Denaturierung von Molkenproteinen beginnt je nach Expositionszeit jedoch schon ab Temperaturen von 60 °C. Molkenproteine sind im nativen Zustand globuläre Proteine und enthalten schwefelhaltige Aminosäuren, die bei entsprechenden Reaktionsbedingungen für neue Disulfidbindungen zur Verfügung stehen und somit für eine irreversible Denaturierung der Proteinstruktur sorgen. Verschiedene Arbeiten haben dabei gezeigt, dass diese kovalenten Bindungen nicht nur mit Molkenproteinen untereinander geknüpft werden, sondern auch auf der Oberfläche von Caseinmicellen (Kirchmeier, 1987). In den bisher zur Erklärung der Hintergründe herangezogenen Modellversuchen stellt jedoch die Micellenoberfläche den Partner für die elektrostatische Wechselwirkung mit den Sulfatgruppen der Carrageenanstränge dar. In komplexeren Systemen mit Caseinmicellen, Carrageenan und Molkenproteinen ist daher eine direkte Konkurrenzsituation zu erwarten. Die bisher gezeigten Ergebnisse zeigen jedoch, dass sich diese Konkurrenzsituation nicht in jedem Fall in einem reduzierten Aufbau der auf Carrageenan-Milchprotein-Interaktionen begründeten Mischstruktur äußert.

Es wird daher die These aufgestellt, dass Carrageenan eine elektrostatische Interaktion mit der Caseinmicellenoberfläche eingeht, bevor Molkenproteine an der Micellenoberfläche binden. Bei der darauf folgenden kovalenten Bindung von denaturierten Molkenproteinen an der Caseinmicelle werden die elektrostatisch assoziierten Carrageenanhelices überdeckt, was eine zusätzliche Fixierung bedeutet.

Abbildung 5.18 verdeutlicht die zusätzlichen Veränderungen im Herstellungsprozess zur Untersuchung des Einflusses der Vorerhitzungszeit als Prozessvariable. Um die Auswirkungen der Molkenproteindenaturierung auf das Mischgelsystem aufzuzeigen, werden zwei Vorerhitzungsbedingungen gegenübergestellt.

Beim System A erfolgt der Herstellungsprozess wie bei den vorangegangenen Experimenten, d.h. mit einer Vorerhitzung bei 95 °C und 2,4 s Heißhaltezeit (37,8 s Gesamtaufenthalt im Prozessschritt). System B wird zwar bei der gleichen Vorerhitzungstemperatur von 95 °C behandelt, jedoch mit einer längeren Heißhaltestrecke, so dass die Heißhaltezeit 187,4 s beträgt (225,2 s Gesamtaufenthalt im Prozessschritt). Bei einem reinen Milchsystem entsprechen diese beiden Vorerhitzungsbedingungen Untersuchungen von Dannenberg (1986) zufolge Molkenproteindenaturierungsgraden von unter 10 % bei System A und knapp 80 % bei System B. Der darauf folgende UHT-Erhitzungsschritt mit Temperaturen von 120, 125, 132, 135 und 139 °C bei einer Heißhaltezeit von 2,5 s (22 s Gesamtaufenthalt im Prozessschritt) bedingt ebenfalls einen Einfluss auf den Denaturierungsgrad. “Da die Proteose-Peptone, deren prozentualer Anteil an der Molkenproteinfraktion in der Größenordnung von 10 % liegt, als nicht denaturierbar gilt, ist hin-

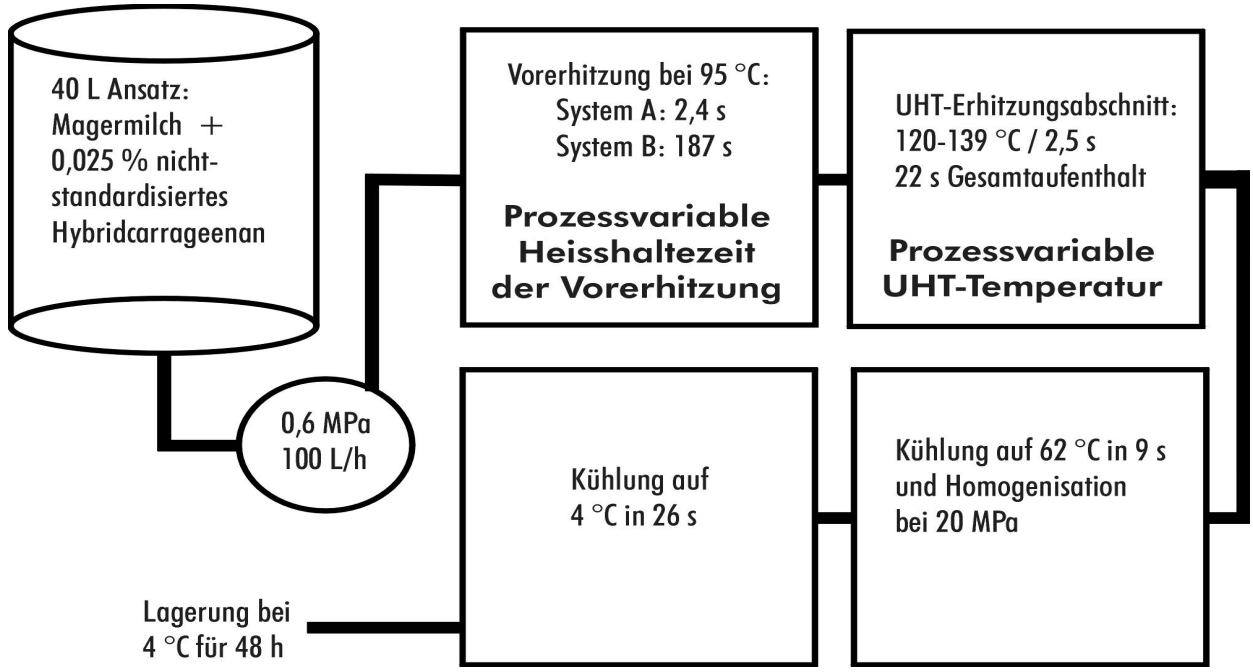

Abb. 5.18: Prozessschema zur Herstellung der Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. Unter Experiment Nr.3 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Erhitzungstemperatur und die Heißhaltezeit im Vorerhitzungsschritt.

sichtlich einer Gesamtdenaturierung eine Maximalrate von nur etwa 90 % erzielbar" (KESSLER, 1996). Damit liegt System B nach der Vorerhitzung schon relativ nahe am maximal möglichen Denaturierungsgrad. Die Bedeutung zusätzlicher Hitzedenaturierungserscheinungen im UHT-Schritt auf die Molkenproteinfraktion fällt daher bei diesen Versuchsansätzen weniger ins Gewicht, wird aber in einem späteren Experiment noch explizit überprüft.

Abbildung 5.19 zeigt den Einfluss der UHT-Temperatur auf die Schubspannungsstabilität der Struktur für System A und B dieses Experiments. Die Schubspannungsstabilität von System A, zu sehen als weiße Kreise, liegt deutlich unter den Werten des mit längerer Vorerhitzung hergestellten Systems B (schwarze Dreiecke). Betrachtet man den Verlauf der Messpunkte, so sind zwei Einflussfaktoren erkennbar:

Als erster Faktor ist die UHT-Temperatur bei beiden Systemen, A und B, deutlich als Ursache für einen Anstieg der Spannungsstabilität zu erkennen. Das Ergebnis zeigt damit, dass die prozessinduzierte Verstärkung der Netzwerkstruktur durch Proteinclusterbrücken auch stattfindet, wenn der Großteil der Molkenproteine bereits im Vorerhitzungsschritt denaturiert wurde (System B).

Als zweiter Faktor, der zu einem Anstieg der Stabilität der Mischstruktur führt, kann die Heißhaltezeit der Vorerhitzung und damit der Denaturierungsgrad der

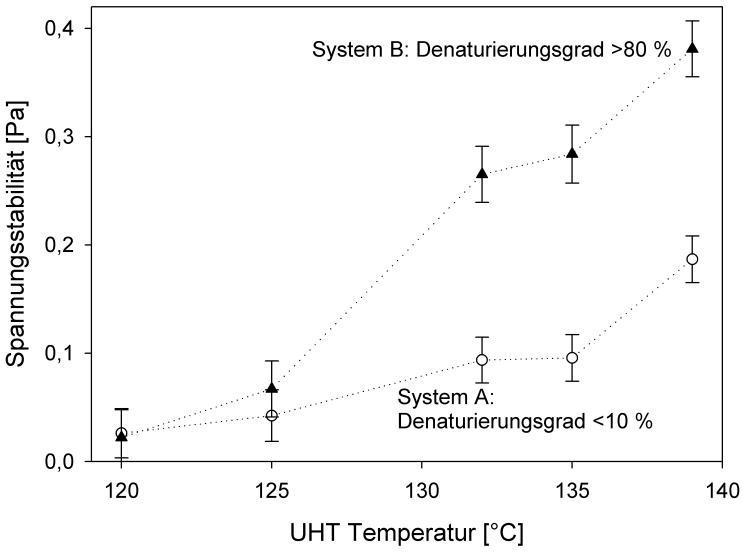

Abb. 5.19: Spannungsstabilität eines Milchmischsystems mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan in Abhängigkeit der UHT-Erhitzungstemperatur und des durch unterschiedliche Vorerhitzungsdauer variierten Molkenproteindenaturierungsgrads.

Molkenproteine selbst identifiziert werden. Die Bildung von Molkenproteinkomplexen auf der Caseinmicellenoberfläche während der Vorerhitzung wirkt sich damit positiv auf die mechanischen Eigenschaften der Mischstruktur aus.

Der Einfluss dieser beiden Faktoren wird auch bei den Ergebnissen weiterer rheologischer Kennzahlen ersichtlich. Abbildung 5.20 zeigt die Geschwindigkeit, mit der sich die Struktur nach einer definierten Überscherung wieder zu einem Gesamtsystem rekonstituiert. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten ausgeführt, bedeutet eine hohe Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit, dass die Proteincluster in einer durchgehenden Biopolymermischstruktur eine tragende Rolle als notwendige Verknüpfungspunkte von benachbarten Carrageenanhelices übernehmen. Auch bei diesem Messergebnis findet sich neben dem Einfluss der UHT-Temperatur der Faktor Vorerhitzungszeit als ein signifikanter Modulator der Mischsystemeigenschaften. Der Geschwindigkeitswert nimmt mit steigender UHT-Temperatur zu. Auf molekularer Ebene bedeutet der Prozess des Strukturwiederaufbaus eine Umlagerung der Proteinclusterbruchstücke zur Reduzierung der hydrophoben Gesamtoberfläche. Die Kräfte für diesen Umlagerungsprozess entstehen aus der für die Gesamtentropie ungünstigen Wassermolekülanordnung vor hydrophoben Oberflächen. Ein Anstieg der hydrophoben Oberfläche durch eine Erhöhung der UHT-Temperatur wurde bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, er führt entsprechend zu einem beschleunigten Strukturwiederaufbau. Dieser Effekt geht durch eine Verlängerung der Vorerhitzungszeit nicht verloren, sondern wird auf ein höheres Niveau angehoben (Abb. 5.20). Durch die längere Vorerhitzung ist ein größerer Anteil Molkenproteine als Komplex an den Caseinmicellenoberflächen gebunden. Das bedeutet zunächst eine Erhöhung des hydrophoben Oberflächenanteils. Zur Minimierung der Entropie lagern sich in Folge die hydrophoben Oberflächen aneinander. Dies äußert sich in einem verstärkten Proteinclusteraufbau zu größeren Aggregaten.

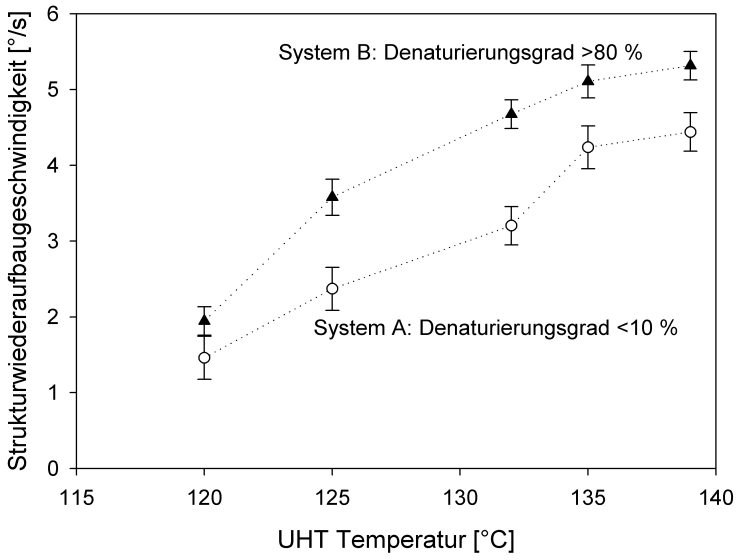

Abb. 5.20: Geschwindigkeit des Strukturaufbaus nach definierter Vorscherung eines Milchmischsystems mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan in Abhängigkeit der UHT-Erhitzungstemperatur und des durch unterschiedliche Vorerhitzungsdauer variierten Molkenproteindenaturierungsgrads.

Diese Schlussfolgerung bestätigt sich ebenfalls in nicht-rheologischen Messungen, wie bei den Ergebnissen der Partikelgrößenmessung (Abb. 5.21). Aufgetragen ist der Mittelwert einer unimodalen Auswertung der über Photonenkorrelation gemessenen Partikelgrößenverteilung für System A bzw. B in Abhängigkeit der UHT-Temperatur bei der Herstellung der Biopolymersysteme. Aufgrund des verwendeten Messbereichs spiegelt dieser Wert in etwa die mittlere Größe der Proteincluster wider. Der UHT-temperaturabhängige Anstieg der Proteinclustergröße erfolgt bei System B auf höherem Niveau. Dies bestätigt den oben genannten Mechanismus, nämlich dass

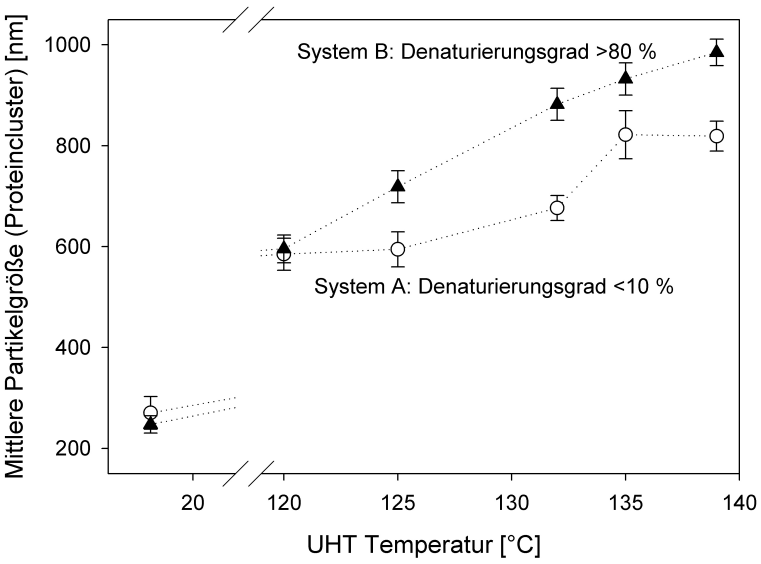

Abb. 5.21: Mittlere Partikelgröße eines Milchmischsystems mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan in Abhängigkeit der UHT-Erhitzungstemperatur und des durch unterschiedliche Vorerhitzungsdauer variierten Molkenproteindenaturierungsgrads.

aufgrund der Caseinmicellenoberflächenmodifizierung durch die längere Vorerhitzung die Bildung größerer Proteinclusteraggregate zur Minimierung hydrophober Oberflächen forciert wird.

Dieser Zusammenhang zwischen Proteinclustergröße und dem rheologisch messbaren thermodynamischen Verhalten des Mischsystems wird in dem hohen Korrelationskoeffizienten zwischen dem mittleren Partikeldurchmesser der unimodalen Auswertung der Photonenkorrelationsmessung und dem Wert der Texturwiederaufbaugeschwindigkeit bestätigt (Tab. 5.3). Der mittlere Partikeldurchmesser fällt bei Systemen mit einem Denaturierungsgrad (DG) kleiner 10 % mit 585 bis 819 nm etwas geringer aus als der Wertebereich von 596 bis 985 nm bei den Ansätzen mit einem DG >80 %. Ein entsprechender denaturierungsgradabhängiger Anstieg ist auch bei der Texturwiederaufbaugeschwindigkeit erkennbar. Der Wert des Korrelationskoeffizienten beträgt bei Mischungen mit einem DG <10 % 0,96, bei Systemen mit DG >80 % 0,99 (Tab. 5.3). Das gute bis sehr gute Bestimmtheitsmaß der Korrelation bestätigt die tragende Rolle der Proteincluster beim Aufbau der Mischgelstruktur. Dies ist konsistent mit der Vorstellung, dass bei Biopolymermischungen an der Grenze zu carrageenandominierten Systemen eine kontinuierliche Netzwerkstruktur von der Brückenbildung durch Proteincluster und deren Größe abhängt. Ihre funktionellen Eigenschaften werden damit von den Prozessbedingungen

Tab. 5.3: Gegenüberstellung von Texturwiederaufbaugeschwindigkeit und mittlerem Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von UHT-Erhitzungstemperatur und Molkenproteindenaturierungsgrad.

UHT Temperatur [°C]	Molkenprotein-denaturierungs-grad nach Vorerhitzung bei 95 °C [%]	Texturwieder-aufbauge-schwindigkeit [°/s]	LSD der Textur-wiederaufbau-geschwindigkeit [°/s]	Mittlerer Partikel-durchmesser [nm]	LSD des mittle-ren Partikel-durchmessers [nm]	Korrelations-koeffizient	R^2
120	< 10	1,46	± 0,28	585	± 32	0,962	92,7
125		2,37	± 0,28	595	± 35		
132		3,20	± 0,25	676	± 25		
135		4,24	± 0,28	822	± 48		
139		4,44	± 0,25	819	± 30		
120	> 80	1,94	± 0,19	596	± 28	0,986	97,2
125		3,58	± 0,24	719	± 32		
132		4,67	± 0,19	882	± 32		
135		5,11	± 0,22	932	± 32		
139		5,31	± 0,19	985	± 26		

bestimmt.

Aus dieser Temperaturabhängigkeit wird auch deutlich, dass eine elektrostatische Assoziation der Caseinmicellen mit dem Polysaccharid nicht durch die gleichzeitige Bildung von Molkenprotein-Caseinkomplexen behindert wird. Bei einer gleichzeitigen Vorerhitzung aller Biopolymere ist damit denkbar, dass denaturierte Molkenproteine an der Caseinmicellenoberfläche binden, bevor deren elektrostatische Interaktion mit Carrageenan stattfindet. Die elektrostatische Wechselwirkung findet dann zwischen Carrageenan und denaturierten Molkenproteinen statt. Dieser Vorgang setzt eine zu Caseinen gleichwertige elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Sulphatgruppen des Carrageenanstrangs und denaturierten Molkenproteinen voraus. Wechselwirkungen zwischen Carrageenan und Molkenproteinen werden jedoch in der Literatur widersprüchlich beurteilt: Wird dem Molkenproteinanteil bei verschiedenen industriellen Anwendungen einerseits keine tragende Rolle zugebilligt, so werden andererseits in Modellsystemen Wechselwirkungen zwischen beiden Biopolymeren beschrieben (Mlleko et al., 1997). Die Rolle der molkenproteinbasierten Wechselwirkungen wird also nur in einfach aufgebauten Mischungen aus Carrageenan und Molkenproteinen deutlich, während bei komplexeren Mischungen Wechselwirkungen des Polysaccharids mit Caseinmicellen die Mischungseigenschaften dominieren. Besonders deutlich wird diese Dominanz in der abnehmenden Gelstärke von Carrageenangelen, wenn bei konstant bleibendem Gesamtproteingehalt der Molkenproteinanteil im Casein-Molkenproteinverhältnis erhöht wird (Sedlmeyer et al., 2003).

Der Grund für diese Beobachtung liegt in den schwächeren Wechselwirkungen von Carrageenan mit dieser Milchproteinfraktion bis hin zu einem Verhalten im Sinne eines unbeteiligten Füllmaterials. Molkenprotein-Carrageenan-Wechselwirkungen können nicht die gleichwertige Rolle zu den entsprechenden Casein-Wechselwirkungen übernehmen, da sie eher auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren und daher nicht so stark und spezifisch wie ihr elektrostatischer Gegenpart bei Caseinsystemen sind (Mlleko et al, 1997). Aus diesen Gründen ist es unwahrscheinlich, dass der in Abbildung 5.19 gezeigte Anstieg der Strukturstabilität hauptsächlich auf hydrophobe Assoziationen von Carrageensträngen an Molkenproteinaggregate als Kontaktpunkte zu den Milchproteinclustern zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass bei einer gleichzeitigen Erhitzung der drei Biopolymere (Caseinmicellen, Molkenproteine und Carrageenan) zunächst erfolgreich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Caseinmicellen und Carrageenan etabliert wird. Danach erfolgt die Komplexierung der Caseinmicellenoberfläche mit denaturierten Molkenproteinen. Durch die Größe der denaturierten Molkenproteineinheiten auf der Caseinmicellenoberfläche können diese Komplexe die Carrageenanbindestellen sterisch einschliessen und damit zu einer zusätzlichen Fixierung der Polysaccharid-Proteinmischstruktur führen. Die Ergebnisse rheologischer Messverfahren und auch die Partikelgrößenbestimmung weisen auf eine Stabilisierung der Aggregate im Mischsystem bei höherem Molkenproteindenaturierungsgrad hin (Sedlmeyer et al., 2005).

Der Vergleich von System A und B macht damit klar, dass bei einer gleichzeitigen Erhitzung von Caseinmicellen, Molkenproteinen und Carrageenan die Prozesskonditionen des Vorerhitzungsschritts vor der eigentlichen UHT-Erhitzung ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die späteren Mischgeleigenschaften besitzen.

Offen bleibt jedoch eine Gegenprobe, d.h. die getrennte Vorerhitzung der Milchproteine vor der

Carrageenanzugabe. In diesem Fall kann keine Konkurrenzsituation zwischen Molkenproteinen und Polysaccharid um eine Reaktion mit der Micellenoberfläche eintreten. Zeigt diese Gegenprobe keinen Unterschied, dann besteht keine Konkurrenz um die Micellenoberfläche. Dies kann durch eine Modifikation des Prozessschemas erfasst werden, durch die die Komplexbildung zwischen Molkenproteinaggregaten und der Caseinmicellenoberfläche in einem genügenden zeitlichen Abstand zu der Zugabe des Carrageenans stattfindet.

Abbildung 5.22 zeigt die Änderungen im Prozessschema. Verändert wurde zum einen die Heißhaltezeit im Vorerhitzungsschritt, zum anderen der Mischungszeitpunkt von Carrageenan und Milchproteinen. Als Referenz zu den vorangegangenen Versuchen wird System B mit einer Vorerhitzung bei 95 °C mit 187 s Heißhaltungsdauer gewählt. Diesem System B werden zwei Systeme gegenübergestellt:

a) Bei System C wird die Vorerhitzung in zwei getrennten Schritten durchgeführt. Zuerst werden Milchproteine alleine für 187 s bei 95 °C erhitzt und wieder auf 15 °C abgekühlt. Dann wird Carrageenan in die so vorbehandelte Milchproteinlösung gemischt und gemeinsam wiederum für 187 s bei 95 °C vorerhitzt, bevor es im eigentlichen UHT-Schritt mit Temperaturen von 120 bis 139 °C behandelt wird. Eine vollständig getrennte Vorerhitzung von Carrageenan und Milchproteinen ist nicht möglich, da der UHT-Erhitzungsabschnitt eine Eintrittstemperatur von 95 °C benötigt. Die Wahl von 187 s Vorerhitzung der Milchproteine alleine zuzüglich 187 s Vorerhitzung mit Carrageenan bedeutet jedoch einerseits eine vollkommmen ausreichende Reaktionszeit für die Bildung von Casein-Molkenproteinkomplexen, andererseits eine Gesamtvorerhitzungsdauer, die im Bereich von System D liegt.

b) In System D erfolgt dagegen ausschließlich eine gemeinsame Vorerhitzung von Milchproteinen und Carrageenan, und zwar für eine fast doppelt so lange Heißhaltezeit im Vergleich zu System B, konkret 357 s bei 95 °C. Diese Vorerhitzungsbedingungen bedeuten eine vollständige Molkenproteindenaturierung (DG = 90 %; KESSLER, 1996).

Die übrigen Prozessbedingungen wie auch die Variation der Erhitzungstemperatur im UHT-

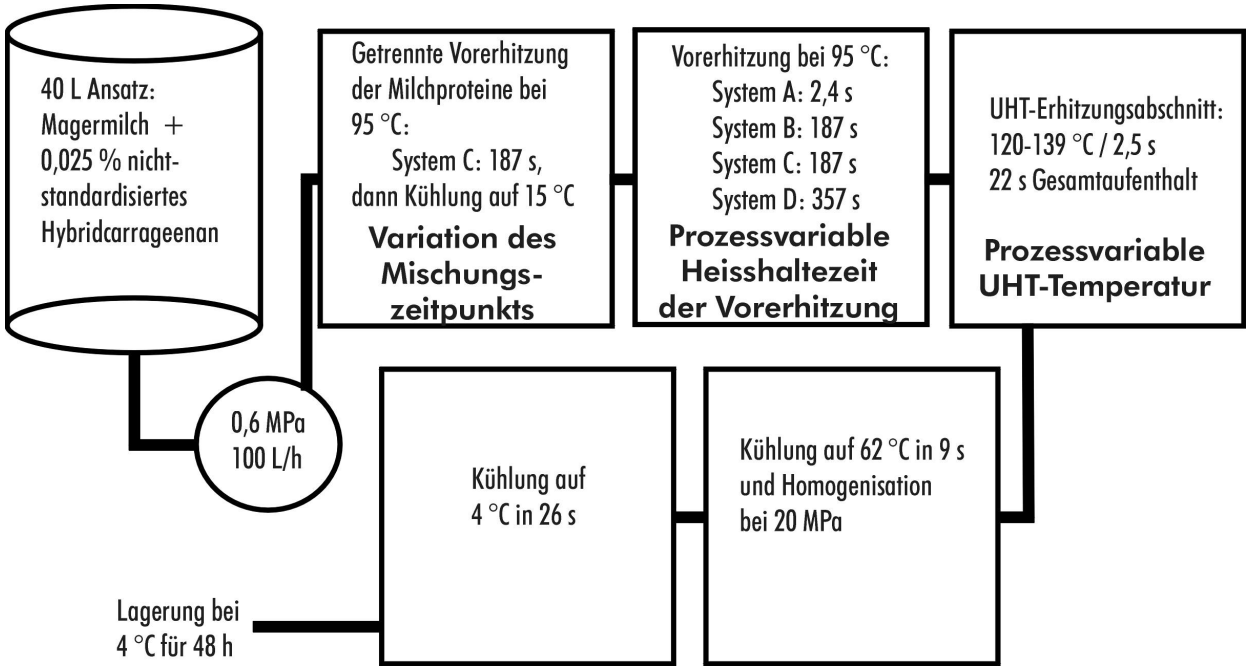

Abb. 5.22: Prozessschema zur Untersuchung von Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. Unter Experiment Nr.4 werden folgende Parameter variiert: Mischungszeitpunkt der Biopolymere während der Vorerhitzung, Dauer der Heißhaltung im Vorerhitzungsschritt und die Temperatur im UHT-Erhitzungsabschnitt.

Abschnitt sind für alle drei Systeme gleich. Auch das Mischungsverhältnis bleibt konstant, die Carrageenankonzentration beträgt 0,025 % bei einem Milchproteingehalt von 3,4 %.

Abbildung 5.23 zeigt die Auswirkungen der Erhitzungstemperatur im UHT-Abschnitt auf den Mittelwert der unimodalen Auswertung der Partikelgrößenmessung über Photonenkorrelation. Generell steigen die Messwerte von jedem der drei verschieden vorerhitzten Systeme B, C und D mit Erhöhung der UHT-Temperatur. Das Niveau, auf dem der erhitzungsbedingte Proteinclusteranstieg stattfindet, unterscheidet sich jedoch ab einem Temperaturwert von 132 °C signifikant zwischen den drei Systemen. Während die Partikelgrößen von System D über den Werten von System B liegen, liegt System C unter System B. Als Referenz zu den übrigen Experimenten dient System B, dargestellt in grauen Kreisen. Carrageenan wurde bei diesem System bei 15 °C in die Milchproteinlösung untergerührt. Als erste Wärmebehandlung der Biopolymermischung erfolgte die Vorerhitzung bei 95 °C bei den Systemen B und D für Polysaccharide und Proteine gemeinsam. Das bedeutet, dass hydratisiertes Carrageenan bereits während der Auffaltung und Denaturierung der Molkenproteine bzw. während der Komplexbildung zwischen Caseinmicellen und Molkenproteinen präsent ist. Da aufgrund des gerätebedingten Messbereichs der Partikelgrößenmittelwert bei unimodaler Auswertung die mittlere Proteinclustergröße widerspiegelt, bedeutet dies, dass System B bei einer nachfolgenden UHT-Behandlung von 120 °C Proteincluster in der Größe von ca. 600 nm aufbaut.

Eine Verlängerung der Heißhaltezeit im Vorerhitzungsschritt auf 357 s (System D, gefüllte

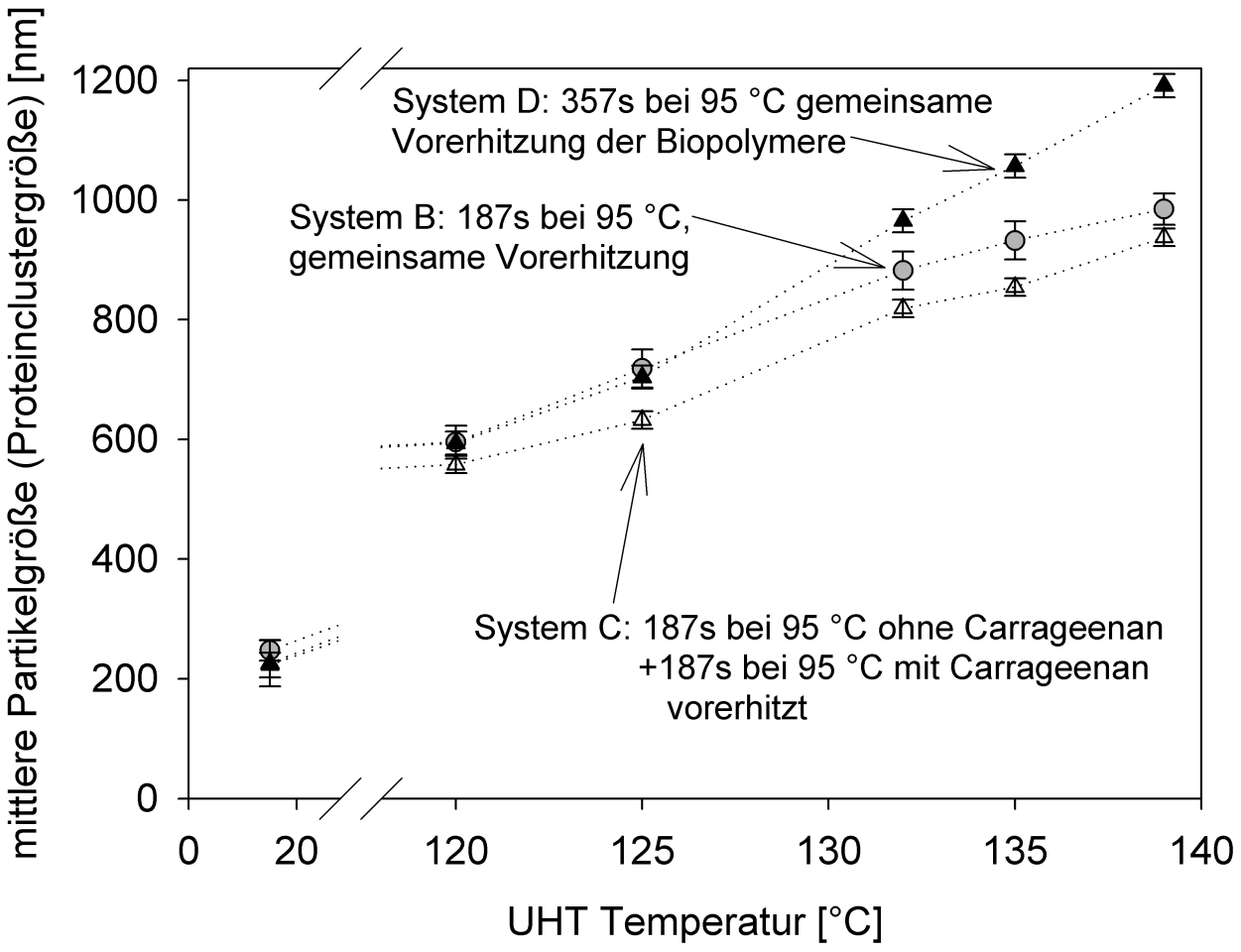

Abb. 5.23: Einfluss des Vorerhitzungsschritts auf die Proteinclustergröße von Milchmischsystemen mit 3,4 % Protein und 0,025 % unstandardisierten Carrageenan.

Dreiecke in Abb. 5.23) führt zu keiner Änderung zum Referenzsystem, solange die UHT-Behandlung bei Temperaturen von 120 bis 125 °C erfolgt. Ein deutlicher von der Vorerhitzungsdauer abhängiger Anstieg der Clustergröße von System D gegenüber System B wird erst bei UHT-Temperaturen ab 132 °C sichtbar.

Im vorangegangenen Experiment (Abb. 5.18; Experiment Nr.3) wurde als Einschränkung bei System B genannt, dass aufgrund der Vorerhitzungszeit von 187 s beim Eintritt in den UHT-Erhitzungsabschnitt ein Gesamtmolkenproteindenaturierungsgrad (DG) von ca. 80 % statt der maximal erreichbaren 90 % vorliegt. Damit kann bei System B nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass UHT-temperaturbedingte Veränderungen auf der Steigerung des DG von 80 auf 90 % im UHT-Abschnitt beruhen. Das UHT-temperaturabhängige Ergebnis von System D entkräftet diese Vermutung, da in diesem Fall die Molkenproteine aufgrund der verlängerten Vorerhitzungszeit bereits im Vorerhitzungsschritt vollständig denaturiert werden. Entsprechend sind hier Veränderungen im DG während der UHT-Erhitzung nicht mehr möglich und können nicht der Hauptgrund für das temperaturabhängige Verhalten der Biopolymermischungen sein!

Ein interessantes Verhalten offenbart in diesem Zusammenhang System C (offene Dreiecke in Abb. 5.23). Hier entspricht die Gesamtdauer der Vorerhitzung in etwa System D, jedoch mit dem Unterschied, dass Carrageenan erst nach der ersten Hälfte der Vorerhitzungszeit zu der Milchproteinlösung zugegeben wird. Die Molkenproteine haben damit zunächst die Gelegenheit, ohne Konkurrenz durch das Polysaccharid mit den Caseinoberflächen zu reagieren. Dies wirkt sich auf die Größe der im UHT-Abschnitt induzierten Proteincluster aus. Während bei einer UHT-Temperatur von 120 °C der Unterschied des niedrigeren Partikelgrößenmittelwerts von System C im Vergleich zu den übrigen Systemen noch relativ gering ist, fällt die Differenz mit steigender Erhitzung im UHT-Abschnitt gegenüber System D immer deutlicher aus. Die Partikelgrößen liegen dann knapp unter den Werten von System B, welches ja nur mit der Hälfte der Gesamtvorerhitzungszeit von System C hergestellt wurde. Aufgrund der in etwa gleichen Gesamtvorerhitzungszeit von System C und D wäre eigentlich ein Ergebnis auf dem Niveau von System D zu erwarten.

Der Hauptunterschied auf molekularer Ebene, der sich aus dem unterschiedlichen Prozessdesign von System C gegenüber den Systemen B und D ergibt, besteht in der Bildung des kovalenten Komplexes zwischen denaturierten Molkenproteinen und der Caseinmicellenoberfläche, bevor eine elektrostatische Interaktion der Caseinmicelle mit Carrageenan stattfindet. Diese kovalente Bindung von Molkenproteinen an der Caseinmicellenoberfläche behindert den Aufbau von größeren Proteinclustereinheiten, wenn bei System C im zweiten Abschnitt der Vorerhitzung durch die Zugabe von Carrageenan die Zusammenlagerung der Milchproteineinheiten durch den thermodynamischen “excluded volume”-Mechanismus initiiert wird. Zudem wurde bei dem vorangestellten Experiment bereits ausgeführt, dass Molkenproteine auf der Micellenoberfläche statt einer elektrostatischen Assoziation nur schwächere hydrophobe Wechselwirkungen zu den Carrageenansträngen aufbauen können.

Diese Unterschiede auf molekularer Ebene spiegeln sich in den rheologischen Eigenschaften der zusammengesetzten schwachen Gelstruktur wider. Abbildung 5.24 zeigt als Beispiel die Strukturstabilität (gemessen als Schubspannungsstabilität) der drei Systeme B, C und D in Abhängigkeit von den UHT-Bedingungen.

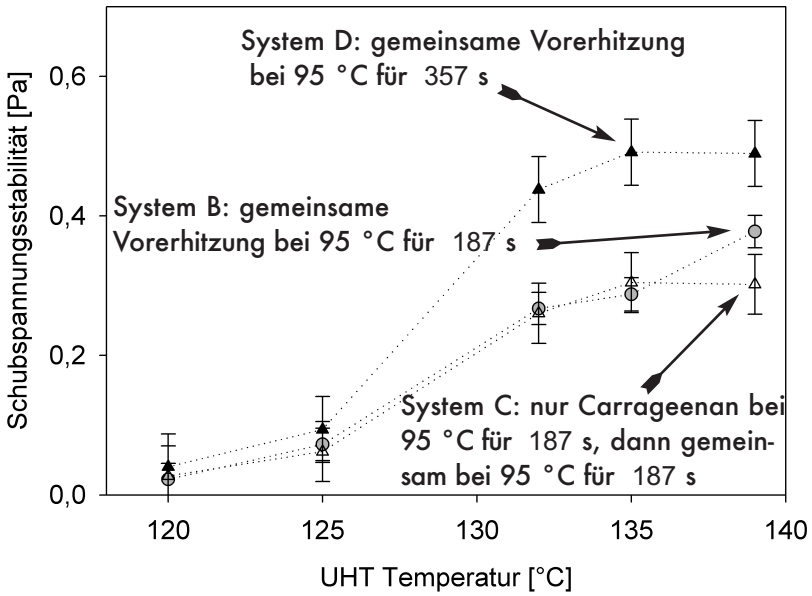

Abb. 5.24: Einfluss des Vorerhitzungsschritts auf die Spannungsstabilität (gemessen als Stabilität gegenüber einer angelegten Schubspannung = Schubspannungsstabilität) von Milchmischsystemen mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan. Variationen in den Vorerhitzungsbedingungen wie in der Grafik angegeben.

Die Vorerhitzung der Systeme C und D erfolgte, wie in Abb. 5.22 angegeben, in etwa mit der doppelten Heißhaltezeit wie das Referenzsystem B. Letzteres zeigt gemäß der zugeordneten Proteinclustergröße (Abb. 5.23) eine verminderte Spannungsstabilität im Vergleich zu dem länger vorerhitzten System D. Auch System C, bei welchem in der ersten Hälfte der Vorerhitzungszeit eine getrennte Behandlung der Milchproteine erfolgte, zeigt sich weniger stabil als System D. Dies passt in das Gesamtbild, da C eine knapp unter B liegende mittlere Proteinclustergröße aufweist. System C wurde jedoch der doppelten Vorerhitzungsdauer von B unterzogen.

Werden publizierte Ergebnisse zum Erhitzungseinfluss auf Milchproteinmodelllösungen zur Einschätzung des Effekts dieser Erhitzungsdauer herangezogen, so ist zu berücksichtigen, dass abhängig von der Erhitzungsdauer aus kleineren Proteinaggregaten neue Partikel entstehen und entsprechende Veränderungen in der Partikelgrößenverteilung zu beachten sind (RODRIGUEZ ET AL., 2006). Aufgrund längerer Prozessbelastung kann so beispielsweise eine größere Anzahl kleinerer Molkenproteinaggregate entstehen, die sich entsprechend auf den Mittelwert der Partikelverteilung auswirken. Mit diesem Hintergrund bedeutet die getrennte Vorerhitzung der Milchproteine bei System C, dass zunächst Proteinpartikel entstehen, die ab der Zugabe von Carrageenan aus thermodynamischen Gründen zu Clustern zusammengelagert werden. Diese modifizierten Cluster von System C besitzen jedoch im Vergleich zu D nicht die gleichen Eigenschaften (Abb. 5.23). Sie sind im Mittelwert kleiner und besitzen nicht die gleiche Fähigkeit, zur Stabilität der Mischgelstruktur beizutragen (Abb. 5.24; System C).

Dies macht die Konkurrenzsituation um reaktive Zentren auf der Micellenoberfläche zwischen Molkenproteinen und Carrageenan deutlich. Die Mischgelstabilität kann nicht allein von der Zeit für die Ausbildung der Mikrophasentrennung, also der gemeinsamen Erhitzungsdauer von Carrageenan und Milchproteinen, bestimmt sein, da sich dann die Ergebnisse bereits bei den UHT-Temperaturen von 120 und 125 °C signifikant unterscheiden müssten. Findet die elektrosta-

tische Assoziation von Carrageenan und Caseinmicellen zuerst statt, so werden diese Initiationspunkte für Proteinclusterbrücken durch die Bildung der Molkenproteinkomplexe an erreichbaren Caseinmicellenoberflächen verstärkt (Abb. 5.24; System D). Werden die Molkenproteine dagegen bereits vorher denaturiert und an Caseinmicellen bzw. untereinander kovalent gebunden, so können sie nicht mehr die caseindominierten Proteincluster verstärken. Wird nachfolgend noch Carrageenan zugegeben, findet zwar auch eine Assoziation zu Proteinclusterbrücken statt. Die reduzierte Schubspannungsstabilität von C in Abbildung 5.24 zeigt jedoch, dass diese schwächer in das Carrageenannetzwerk integriert sind. Aufgrund der Molkenproteinaggregate an den Oberflächen der Proteinclusteruntereinheiten beruhen die messbaren rheologischen Wechselwirkungen in diesem Fall auf schwächeren unspezifischen Wechselwirkungen, wie z.B. hydrophoben Assoziationen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Messdaten, die sich aus der weiteren Steigerung der Heißhaltezeit im Vorerhitzungsschritt von System B auf System D ergeben, bestätigen die Aussagen aus dem Vergleich von System A und B (Experiment Nr. 3). Der Vergleich mit einer getrennten Vorerhitzung (System C) zeigt signifikante Auswirkungen dieser Anordnung der Prozessschritte bzw. des Mischungszeitpunkts.

Abschließend können folgende Zwischenergebnisse festgehalten werden:

1.) Bei gleichzeitiger Erhitzung von Carrageenan, Caseinmicellen und Molkenproteinen besteht eine Konkurrenzsituation zwischen dem Polysaccharid und denaturierten Molkenproteinen um reaktive Zentren zur Komplexbildung auf der Micellenoberfläche.

2.) Bei gleichzeitiger Erhitzung der drei Biopolymere erfolgt zunächst die elektrostatische Adsorption von Carrageenanhelices an die Caseinmicellen. Der Komplex aus denaturierten Molkenproteinen an der Micellenoberfläche wird erst danach aufgebaut und stabilisiert zusätzlich den Casein-Carrageenankomplex.

3.) Erfolgt der Aufbau des Molkenprotein-Caseinkomplexes vor der Zugabe von Carrageenan, so wird dessen Wechselwirkung zu den Caseinmicellen beeinträchtigt.

4.) Molkenproteinbasierte Partikel, welche bei längeren Hitzebehandlungen entstehen, verstärken die Scherstabilität im Sinne eines zusätzlichen Füllmaterials in der Mischgelstruktur. Die Kombination von rheologischen Messungen und Partikelgrößenbestimmungen zeigt jedoch, dass sie nicht verstärkend für die caseindominierten Proteinclusterbrücken im Carrageenanverband wirken bzw. diese vergrößern.

5.1.5 Variation der UHT-Heißhaltezeit

Nachdem im vorangegangenen Kapitel der Einfluss der Vorerhitzungszeit auf die Mischungseigenschaften deutlich wurde, sollen im folgenden Abschnitt die Auswirkungen der Erhitzungsdauer im nachfolgenden UHT-Prozeßabschnitt untersucht werden. Auch wenn der exponentielle Einfluss des Prozessparameters UHT-Erhitzung bereits gezeigt wurde, ist noch offen, inwieweit sich die Netzwerkstrukturausbildung auch durch eine Verlängerung der UHT-Erhitzungsdauer steigern lässt. Zudem ermöglicht die kombinierte systematische Untersuchung von Temperatur- und Zeiteinfluss eine Auftragung der Messergebnisse nach Arrhenius, aus der sich die Aktivierungsenergie ableiten lässt. Die Kenntnis dieser Größe bedeutet eine experimentelle Identifikation der prozessabhängigen Wechselwirkungen. Im nächsten Experiment soll daher zusätzlich zur Variation der UHT-Prozesstemperatur auch die Dauer der Heißhaltestrecke in diesem Abschnitt als Prozessvariable hinzugezogen werden.

Mit dem Hintergrundwissen aus den Versuchen zu einer Variation der Vorerhitzungsdauer kann auch bei einer Erhöhung der UHT-Heißhaltezeit eine prozessabhängige Bildung von Proteinaggregaten erwartet werden. Diese können über spezifische Wechselwirkungen das carrageenanhelixbasierte Netzwerk zusätzlich stabilisieren. Anderseits ist aufgrund der Ergebnisse von Kapitel 5.1.4 mit der Verlängerung der Erhitzungsgesamtdauer auch das Auftreten von unspezifischem Füllmaterial aus Proteinpartikeln zur Verstärkung der Netzwerkstruktur vorstellbar (Rodriguez et al., 2006). Unabhängig von der Spezifität ihrer Wechselwirkungen erhöht die Bildung von Aggregaten den elastischen Anteil des Mischsystems. Daher kann von der These ausgegangen werden, dass sich mit steigender UHT-Heißhaltezeit die Strukturstabilität (=Spannungsstabilität) des Mischsystems weiter erhöht. Inwieweit dieser Stabilisationszuwachs auf spezifischen oder unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den im System vorhandenen Biopolymeren beruht, kann indirekt durch eine Gegenüberstellung des Prozesseinflusses auf die Proteinclustergröße bzw. auf die Scherstabilität der Gesamtstruktur eingegrenzt werden. Die Abhängigkeit dieser Mischgelcharakteristika von der UHT-Temperatur lässt eine Beteiligung spezifischer Casein-Carrageenan-Wechselwirkungen erkennen. Erfolgt dagegen nur eine allgemeine Veränderung des Messwertniveaus, so kann dies der Bildung von unspezifisch wechselwirkenden Aggregaten zugeschrieben werden.

Der Herstellungsablauf zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen auf die Mikrostruktur des Protein-Carrageenan-Mischsystems ist in Abbildung 5.25 dargestellt. Das grundsätzliche Prozessschema entspricht den vorangegangenen Versuchen. Die Vorerhitzungsbedingungen werden bei 95 °C für 3 min. konstant gehalten. Die Erhitzungstemperatur im UHT-Abschnitt wird in 5 Einstellungen (120, 125, 132, 135, 139 °C) variiert. Ebenso wird der Einfluss der Dauer der Heißhaltung für jede UHT-Temperatur in 3 Abstufungen, die sich durch Skalierung des entsprechenden Abschnitts der UHT-Pilotanlage realisieren ließen, untersucht (2,5; 11,0; 24,0 s). Um diese Zeitvariation klar herausarbeiten zu können, wird anlagebedingt die Aufheizstrecke im UHT-Bereich auf 6,5 s verkürzt.

Abbildung 5.26 zeigt die Auswirkungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen der UHT-Behandlung auf die Stabilität der dabei induzierten Mischstruktur. Im Vergleich zu dem in

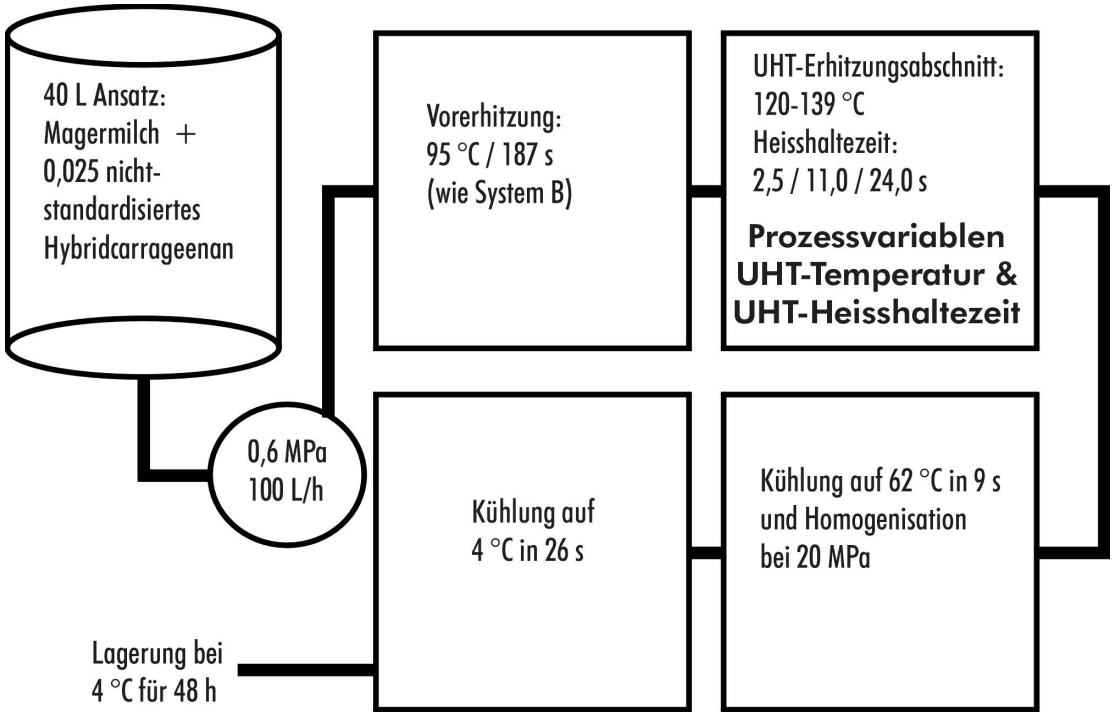

Abb. 5.25: Prozessschema zur Herstellung der Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. In Experiment Nr.5 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Temperatur und die Heißhaltezeit im UHT-Erhitzungsschritt.

Abbildung 5.19 vorher gezeigten System B fallen hier die absoluten Werte des B entsprechenden Systems (UHT-Heißhaltezeit = 2,5 s) etwas niedriger aus, da in diesem Experiment die Aufheizstrecke im UHT-Abschnitt verkürzt wurde und damit auch die Gesamtaufenthaltsdauer geringer ist (Abb. 5.26). Bei UHT-Temperaturen von 132 und 135 °C wirkt sich eine Verlängerung der Heißhaltezeit von 2,5 s auf 24 s positiv auf die Strukturstabilität (=gemessen als Spannungsstabilität) aus. Dieser prozessabhängigen Strukturverstärkung scheinen jedoch Grenzen gesetzt zu sein, wie der Einbruch des Stabilitätswertes bei der intensivsten Hitzebehandlung von 139 °C über eine Dauer

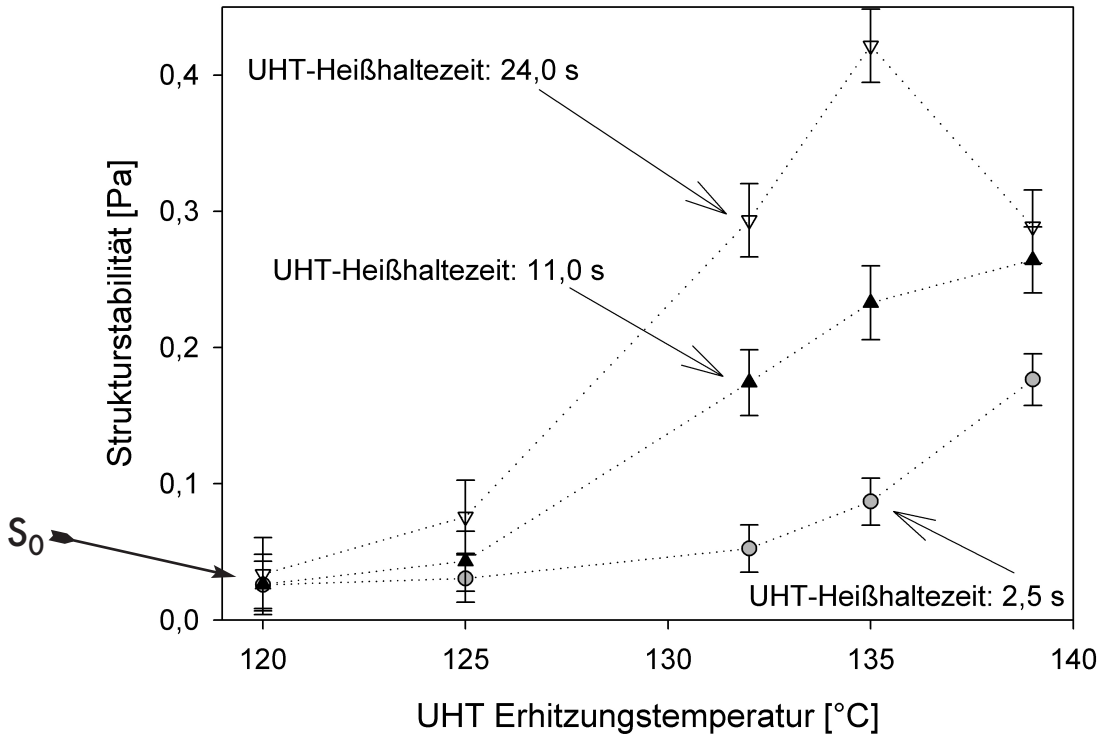

Abb. 5.26: Stabilität verschieden lang erhitzter Milchmischsysteme mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von der UHT Temperatur. Heißhaltezeiten wie in der Grafik angeführt.

von 24 s zeigt. Die Mischgelstabilität entspricht in diesem Fall in etwa einem System, welches bei 139 °C für 11 s hergestellt wurde (Abb. 5.26). Eine Diskussion, welche Wechselwirkungen für dieses prozessabhängige Verhalten verantwortlich sein können, wird im nachfolgenden Abschnitt zusammen mit den Ergebnissen der Partikelgrößenmessung gegeben.

Auch in den Ergebnissen der Proteinclustergröße wird eine Begrenzung der prozessinduzierten Stabilitätssteigerung bei einer Verlängerung der Heißhaltezeit auf 24 s sichtbar (Abb. 5.27). Deutliche Steigerungen der caseindominierten Proteinclustergröße finden sich dagegen bei einer Verlängerung der Heißhaltung von 2,5 s auf 11 s. Wie bereits erwähnt, gilt es beim Vergleich der absoluten Werte mit vorangegangenen Experimenten die anlagenbedingte Verkürzung der UHT-Aufheizstrecke zu berücksichtigen.

Grundsätzlich stützen die Messergebnisse in Rheologie und Partikelgrößenanalytik die These, dass die Mischgelstabilität durch eine Verlängerung der UHT-Heißhaltestrecke weiter gesteigert werden kann. Allerdings muss für einen deutlich prozessabhängigen Effekt die UHT-Temperatur ein gewisses Niveau erreichen und überschreiten (≥132 °C). Aus den im vorangegangenen Kapitel gezeigten Ergebnissen zu System D in Experiment Nr.4 wurde zudem bestätigt, dass eine der Ursachen für den prozessinduzierten Stabilitätszuwachs in erhitzungsbedingten Modifikationen der Caseinmicellen liegt. Zu nennen sind hier beispielsweise Umstrukturierungen im inneren Aufbau der Micellen und die Verschiebung des Calciumphosphatgleichgewichts (Schreiber, 2001; Bulca et al., 2004). Dadurch steht eine höhere Anzahl von Calciumionen für zusätzliche Brückenbindungen zur Verfügung. So führen zusätzliche Brückenbindungen zwischen Carrageenanhelices zu einer Verfestigung von Aggregationen in der Mischgelstruktur, mit entsprechenden Auswirkungen auf die Textur (Vega et al., 2004).

Bei einer molekularen Betrachtung dieser calciumvermittelten Biopolymerassoziation ist zu beachten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zur Ausbildung des aktivierten Komplexes beim Aufbau von Brückenbindungen unter anderem auch von der Ionenstärke abhängt. Bei dieser Bio-

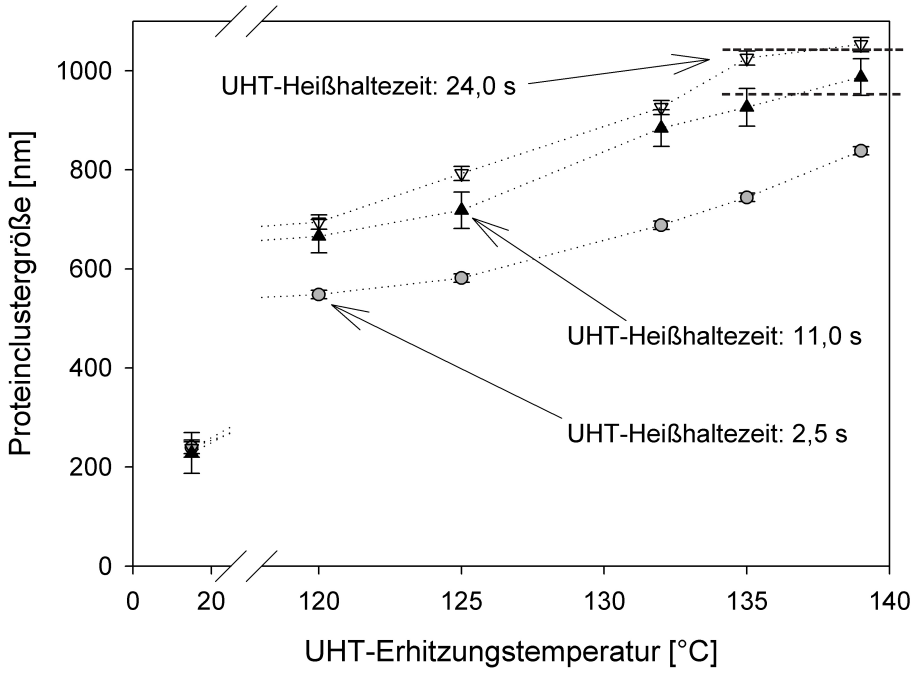

Abb. 5.27: Proteinclustergröße verschieden lang erhitzter Milchmischsysteme mit 0,025 % unstandardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von der UHT Temperatur. Heißhaltezeiten wie in der Grafik angeführt.

polymermischung bedeutet dies, dass sich eine zu starke Freisetzung von Calciumionen als sogenannter kinetischer Salzeffekt hemmend auf die Komplexbildung auswirkt (ATKINS, 1990). Diese Hemmung zeigt sich indirekt in dem unterschiedlichen Verlauf der Strukturstabilität und der Proteinclustergrößen bei Prozesskombinationen von 24 s Heißhaltezeit und Erhitzung auf 135 bzw. 139 °C. Die prozessbedingten Veränderungen der Caseinmicellen, wie die Freisetzung von gelösten Calciumionen, muss also noch in einem Bereich liegen, der eine grundsätzliche Beteiligung der caseindominierten Proteincluster an der Mischgelstruktur erlaubt. Dies ist nach Abbildung 5.26 für Prozessbedingungen bei Heißhaltezeiten bis 24 s und bei Temperaturen bis 135 °C der Fall. Bei intensiverer UHT-Erhitzung, wie bei 139 °C für 24 s, zeichnet sich dann eine Abnahme der Strukturstabilität ab. Dies ist als Hinweis auf Begrenzungen in der Kapazität des caseinmicellenbedingten Strukturbildungsmechanismus zu werten, z.B. aufgrund einer limitierenden Freisetzung von Calciumionen aus den Micellen.

Im Hinblick auf prozessinduzierte Verschiebungen der Mischsystemstabilität sind daher UHT-Temperaturen bis 135 °C interessant. Für eine reaktionskinetische Betrachtung werden somit die Ergebnisse der Strukturstabilität von Systemen, die unter Erhitzung von 120 bis 135 °C bei 2,5 bis 24,0 s Heißhaltezeit hergestellt wurden, herangezogen. Als Bezugswert S_0 wurde die Prozessparameterkombination 120 °C für 2,5 s ausgewählt, da unter diesen Herstellungsbedingungen eine Strukturstabilität (=Spannungsstabilität) unterhalb des temperaturinduzierten exponentiellen Anstiegs gemessen wird (Abb. 5.26). Zur Erfassung dieses prozessinduzierten Stabilitätszuwachses wird der gemessene Anstieg in der Strukturstabilität S daher auf den Startwert S_0 bezogen, der für das System gilt, bei dem noch keine ausgeprägten UHT-bedingten Effekte auftreten. Das Verhältnis dieser Größen wird in Anlehnung an HORAK (1980) als relatives Maß N wie folgt definiert:

$$N = \frac{S}{S_0} \qquad \text{(Gl. 5.1)}$$

Tab. 5.4: Vergleich von R^2 bei Anpassung verschiedener Reaktionsordnungen an die experimentelle Datengrundlage.

Reaktionsordnung	UHT-Temperatur [°C]	Korrelationskoeffizient	Bestimmtheitsmaß der Anpassung R^2	Mittelwert R^2
0 (N)	125	0,9880	97,61	
0 (N)	132	0,9922	98,45	98,60
0 (N)	135	0,9988	99,75	
1 (lgN)	125	0,9999	99,97	
1 (lgN)	132	0,9440	89,12	94,10
1 (lgN)	135	0,9655	93,22	
2 (1/N)	125	-0,9928	98,56	
2 (1/N)	132	-0,8828	77,94	86,32
2 (1/N)	135	-0,9080	82,45	
3 ($1/N^2$)	125	-0,9708	94,24	
3 ($1/N^2$)	132	-0,8283	68,60	79,01
3 ($1/N^2$)	135	-0,8613	74,18	

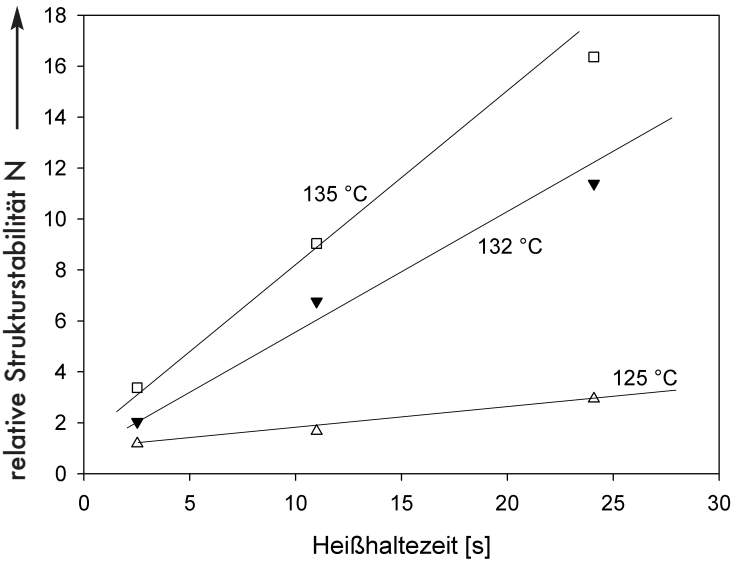

Abb. 5.28: Darstellung des relativen Anstiegs der Strukturstabilität im UHT-Erhitzungsabschnitt als Reaktion 0. Ordnung.

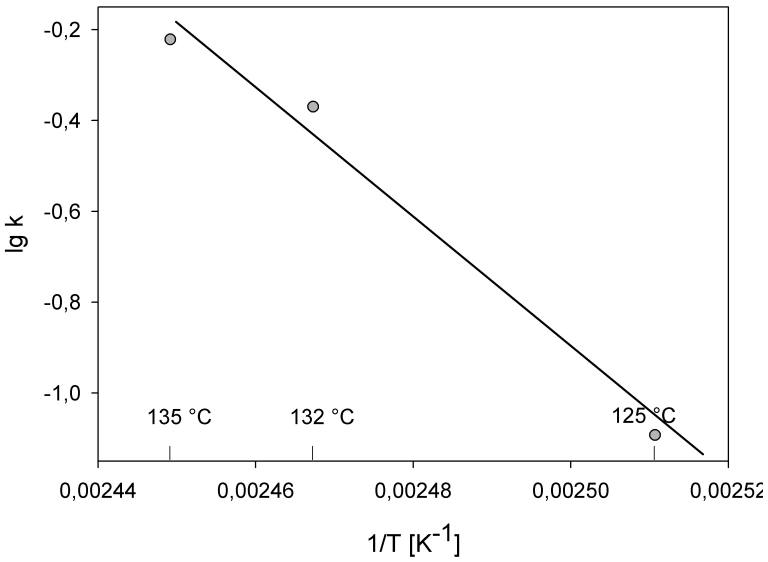

Abb. 5.29: Arrheniusplot des Strukturstabilitätsanstiegs im UHT-Erhitzungsabschnitt.

Betrachtet man die relative Stabilitätsänderung bezogen auf das System, welches bei 120 °C für 2,5 s hergestellt wurde, so lässt sich bei der vorhandenen Datengrundlage für diesen Bereich der Temperatur-Zeit-Kombinationen eine Reaktion 0. Ordnung als am wahrscheinlichsten annehmen (Tabelle 5.4). Denn die Anpassungsqualität der Korrelation, also das Bestimmtheitsmass R^2 erreicht mit 98,6 bei einer Reaktionsordnung von Null deutlich höhere Werte als bei Anpassungen höherer Reaktionsordnungen. Bei der in Abb. 5.28 gezeigten Auftragung von N über der Heißhaltezeit ermittelt sich die der jeweiligen Erhitzungstemperatur zugehörige Geschwindigkeitskonstante k aus der Steigung der Regressionsgeraden (FINK, 1984).

Aus dem in Abbildung 5.29 dargestellten Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten und dem Kehrwert der zugehörigen absoluten Reaktionstemperatur lässt sich nach Arrhenius aus der Steigung der Ausgleichsgeraden die Aktivierungsenergie bestimmen. Deren Betrag liegt in diesem Fall bei 280 KJ/mol. Zur temperaturunabhängigen Betrachtung von einzelnen interpartikulären Wechselwirkungen kann dieser Wert durch Division durch die Loschmidtsche Konstante ($6{,}022045*10^{23}$) auf das Produkt von Boltzmannkonstante k_B und absoluter Temperatur T bezogen werden. So kommt man mit Beträgen von 82 bis 84 k_BT in einen Wertebereich, der neben schwächeren Bindungstypen (hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) auch die Beteiligung von ladungsinduzierten Dipolsystemen an der Strukturbildung beinhaltet (WALSTRA, 2003). Der Wert der Aktivierungsenergie liefert damit einen deutlichen Hinweis auf die Rolle von Dipolsystemen für den Strukturaufbau des Mischsystems. Da Wassermoleküle die größte dipolfähige Stofffraktion im Mischsystem darstellen, soll ihre Rolle im Folgenden im Detail betrachtet werden:

Das Wassermolekül selbst wird mit einem Dipolmoment von 1,85 D als das wichtigste agierende polare Teilchen bezeichnet (WALSTRA, 2003). Mit seinem tetraederförmigen Aufbau ordnet es sich in einer Weise im Raum an, dass sich das Dipolmoment der einzelnen Moleküle kompensiert. Dies

beinhaltet die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, bedeutet jedoch nicht eine absolute Fixierung (und entsprechende Entropieverminderung) einzelner Moleküle. Ähnlich wie Elektronen in einem Metall nicht einem bestimmten Atomkern zugeordnet sind, sondern vielmehr als Elektronenwolke im ständigen Austausch bestimmte Positionen im System besetzen, lässt sich das Verhalten von Molekülen in einer freien Wasserfraktion beschreiben. Die Wassermoleküle sind zwar in einem ständigen Austausch untereinander, bewegen sich aber immer auf den Positionen im Raum, die durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen determiniert sind. Die Polarität des Wassergrundbausteins spiegelt sich auch in der hohen relativen Dielektrizitätskonstante ε_r von ca. 80 wider. Ladungsträger, wie freigesetzte Ionen, werden daher mit relativ hohen Bindungskräften in die Wassermatrix eingebunden (WALSTRA, 2003).

Andere Verhältnisse liegen dagegen an Grenzflächen zwischen Wassermatrix und hydrophoben Oberflächen vor. Letztere stören den gegenseitigen Austausch von Wassermolekülen im Wasserstoffbrückenbindungsverband. Das Verhalten der Wassermoleküle an diesen Grenzflächen wird als eisähnlich-kristallin beschrieben und besitzt damit einen höheren Ordnungsgrad (SINGH ET AL., 1998). Entsprechend entropiesteigernd wirkt sich dagegen die Etablierung hydrophober Wechselwirkungen aus, da sich nun zwei hydrophobe Grenzflächen gegenseitig abdecken und das entsprechende Grenzflächenwasser freigesetzt wird. Der Wert von 5 k_BT wird daher bei hydrophoben Wechselwirkungen der freien Enthalpie zugeordnet und steht in engem Zusammenhang mit der exponierten hydrophoben Gesamtoberfläche im wässrigen System (WALSTRA, 2003). Damit ist dieses Ergebnis konsistent mit der in vorangegangenen Kapiteln angesprochenen Rolle hydrophober Wechselwirkungen für den Strukturaufbau. In Abbildung 5.6 wurden bereits Messungen der hydrophoben Gesamtoberfläche vorgestellt. Dort findet sich ein Anstieg des Gesamtwerts exponierter hydrophober Oberflächen mit zunehmender UHT-Temperatur. Dieses Beispiel belegt das Vorhandensein der hier festgestellten Wechselwirkungsenergien auch auf molekularer Ebene.

Somit ist die Grundlage für die prozessparameterabhängige Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen und ihre Auswirkungen auf die Dipolmatrix des Lösungsmittels beschrieben und gegeben. Diese Beteiligung lässt sich in der gewählten Reaktionsordnung und entsprechenden Arrheniusbeziehung bei Heißhaltezeiten bis 24 s und Temperaturen bis 135 °C zeigen.

Der Zusammenhang gilt jedoch bei länger andauernder UHT-Behandlung bzw. höheren Temperaturen nicht mehr. Das deutet auf eine Limitierung des strukturstabilisierenden Effekts hin. Zu nennen ist an dieser Stelle neben einer möglichen Hemmung aufgrund des kinetischen Salzeffekts auch die begrenzte Verfügbarkeit exponierter hydrophober Flächen. Das bedeutet, dass ab höheren Temperatur-Zeit-Kombinationen keine Reaktion 0. Ordnung mehr vorliegen kann, da die bei der Strukturumbildung verbrauchten Einheiten nicht mehr konzentrationsunabhängig durch die Verschiebung von Gleichgewichtsverhältnissen ersetzt werden können (WEDLER, 1997). In diesem Zusammenhang ist als treibende Kraft die Gesamtentropie zu nennen, welche sich aus einem Gleichgewichtssystem aus den Anordnungsmöglichkeiten von Makromolekülen und Serummolekülen zusammensetzt. Bei der Assoziation zweier hydrophober Oberflächen erhöht sich die Gesamtentropie durch die Freisetzung von vorher fixierten Serummolekülen. Für das Mischsystem besteht damit eine Möglichkeit, auf prozessinduzierte Veränderungen zu reagieren. Ein solcher Reaktionsablauf ist jedoch bei längeren Heißhaltezeiten (24 s und mehr) und

hohen Temperaturen (135 °C) offensichtlich beschränkt, wie der Einbruch der Messergebnisse der Spannungsstabilität (Abb. 5.26) und die überschneidenden Fehlerbalkenbereiche der mittleren Proteinclustergröße bei 135 und 139 °C (Dreiecke in Abb. 5.27) zeigen. Die Partikelgrößenbestimmung über Photonenkorrelation erfasst den hydrodynamischen Durchmesser der Proteincluster und damit auch stark assoziierte Wasserschichten der Hydrathülle. Damit bedeutet eine Stagnation der Werte dieses Messergebnisses auch eine fehlende Steigerungsmöglichkeit der Wasserbindung bei diesen UHT-Prozessbedingungen. Dies kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass bei zu starker thermischer Prozessbelastung im UHT-Abschnitt einschneidende Veränderungen in der Mikrostruktur auftreten, wie beispielsweise eine Auflockerung im Proteinclusterverband.

Ergänzende Partikelclusteranalysen und Anwendung der Fraktaltheorie

Während Polysaccharidhelices im gemischten Netzwerkverbund Stranggelen zugeordnet werden können, gehören die Proteinclusterbrücken zur Art der Partikelgele. Diese lassen sich sehr gut mittels fraktaler Geometrie beschreiben. Eine zentrale Kennzahl ist die fraktale Dimension der Partikelstruktur, welche die Raumausfüllung beschreibt. Damit ermöglicht die Fraktaldimensionsanalyse, prozessinduzierte Veränderungen in der Dichte dieses Teils der Biopolymermischstruktur zu erfassen. Grundsätzlich haben nach der Fraktaltheorie Partikel mit sinkender Fraktaldimension eine geringere Raumausfüllung bzw. niedrigere Dichte (Kennel, 1994).

Die fraktale Dimension der Proteincluster wurde daher zusätzlich zur verbesserten Kenntnis über den Aufbau der zusammengesetzten Netzwerkstruktur bestimmt. Als Grundlage zur Berechnung der Fraktaldimension dienten zusätzliche Partikelmessungen bei einem Streuwinkel von 62,5°. Aus der winkelabhängigen Intensität der Lichtstreuung lässt sich nach Teixeira (1986) die Fraktaldimension ableiten, da die Streuungsintensität von der Anzahl der Einzelpartikel eines lichtstreuenden Aggregats abhängt (Kennel, 1994).

In Abbildung 5.30 ist für UHT-Behandlungen mit Heißhaltezeiten von 2,5 und 24 s neben den mittleren Partikelgrößen auch die zugehörige fraktale Dimension der Proteincluster in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur aufgetragen. Der Wert 3 der fraktalen Dimension D ist dabei einem dichten Partikelnetzwerk zuzuordnen. Eine hohe Dichte spricht für eine Entstehung durch Anlagerung bzw. Aggregation einzelner Partikeleinheiten, da in diesem Fall einzelne Einheiten auch vorhandene Lücken besetzen können. Niedrigere Werte der fraktalen Dimension (z.B. 1,8) lassen dagegen auf eine Entstehung nach dem Cluster-Cluster-Aggregationsmodell (CCA) schließen. Das CCA geht davon aus, dass die fraktale Struktur auch durch Assoziation größerer Einheiten gebildet wird. Denn bei dieser Aneinanderlagerung bleiben bei nicht genau zueinanderpassenden Aggregatsumrissen Lücken bestehen, welche als Konsequenz die Packungsdichte herabsetzen. Für die hier untersuchten Prozesskombinationen zeigt sich eine Abnahme der Fraktaldimension sowohl bei steigender Heißhaltezeit wie auch bei steigenden Temperaturen (>132 °C). In Kombination mit der ebenfalls in Abbildung 5.30 gezeigten Zunahme der Proteinclustergröße bedeutet dies, dass die an der Mischgelstruktur beteiligten Proteincluster mit steigender UHT-Temperatur bei moderaten Heißhaltezeiten (wie 2,5 s) eine immer offenere Schwammstruktur mit einer hohen Wasserbindungskapazität entwickeln. Liegt die Fraktaldimension bei

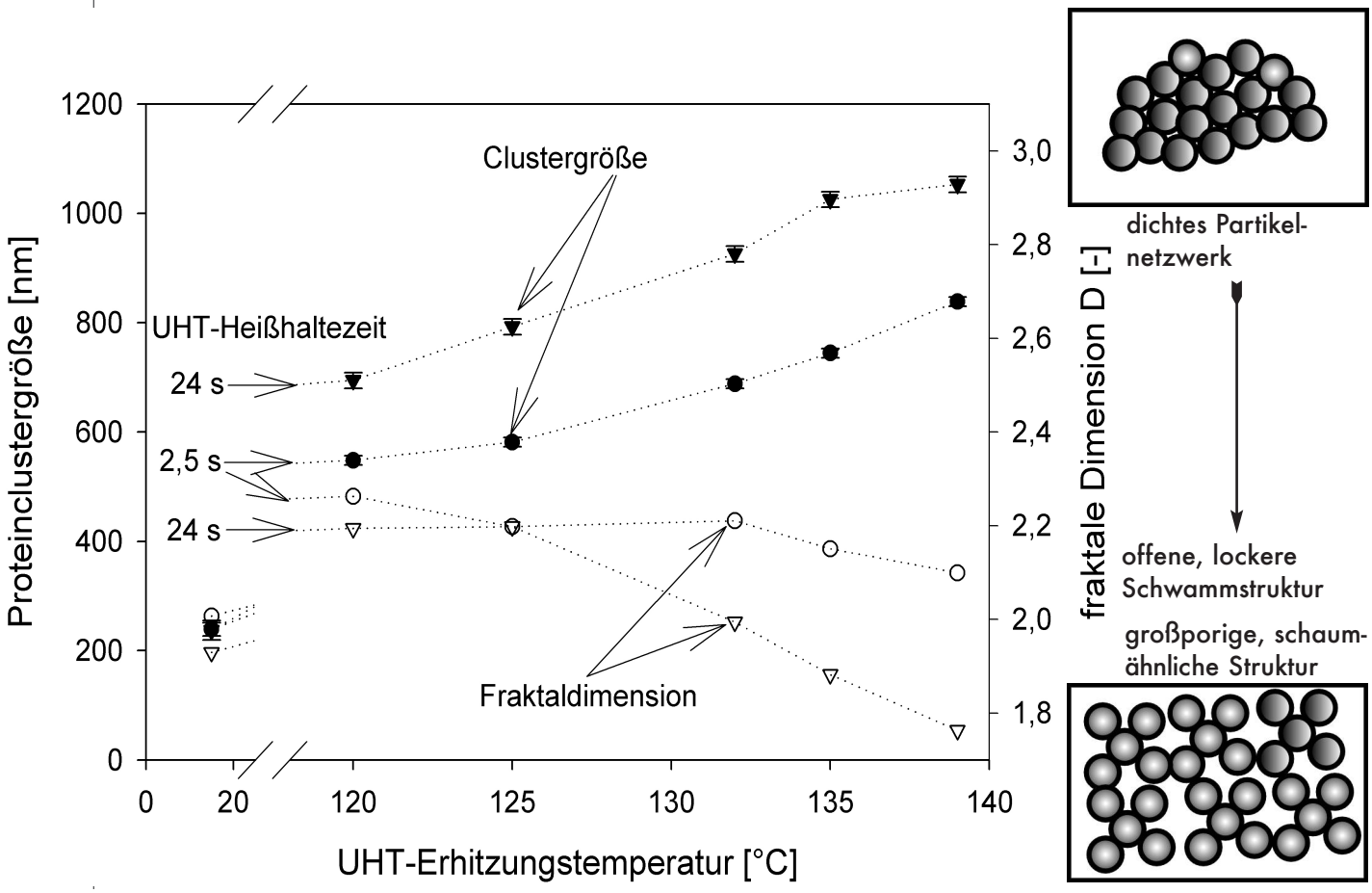

Abb. 5.30: Proteinclustergröße und Fraktaldimension in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur für zwei unterschiedlich lang erhitzte Milchmischsysteme mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan. Schwarze Symbole zeigen die Clustergröße, weiße die Fraktaldimension.

einer längeren Heißhaltung von 24 s bei Temperaturen von 120 und 125 °C noch bei ähnlichen Werten wie bei 2,5 s Erhitzungsdauer, so führen höhere Temperaturen jedoch zu einer deutlich stärkeren Abnahme der fraktalen Dimension.

Das bedeutet, dass die offenen Schwammstrukturen immer großporiger werden. Bei höheren UHT-Temperaturen (139 °C) wird jedoch das optimale Verhältnis zwischen Porendurchmesser der Schwammstruktur und eingeschlossenem Serum überschritten. Das Serum ist nicht mehr so stark assoziiert, dass es dem hydrodynamischen Durchmesser der Proteincluster zugerechnet werden kann, wie der stagnierende Partikelgrößenwert von 135 und 139 °C bei 24 s Heißhaltung zeigt (Abb. 5.30). Einem großporigen Schaum entsprechend nimmt auch die Stabilität der Proteincluster ab (Abb. 5.30 rechts unten). Das Absinken der fraktalen Dimension bei einer Heißhaltezeit von 24 s bei Temperaturen von 139 °C auf Werte unter 1,8 entspricht Fraktaldimensionen, die sich aus Simulationen mit dem CCA ergeben (Kennel, 1994). Dies kann als Hinweis auf ein Auseinanderbrechen der lockeren Schwammstruktur innerhalb der Proteincluster gesehen werden. Die Folge sind neue Assoziationen von Clusterbruchstücken, welche nicht mehr in die Mischgelstruktur eingebunden sind. Damit nimmt auch die Anzahl der Verknüpfungspunkte im zusammengesetzten Netzwerk ab, ein Umstand, der in einem Einbruch der Spannungsstabilität deutlich wird (Abb. 5.26).

5.1.6 Einfluss von Scherkräften während der Herstellung von Carrageenan-Milchproteinsystemen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zur Variation der Erhitzungsbedingungen zeigen in den meisten Fällen einen positiven Effekt der variierten Parameter auf den Ausbau bzw. die Stabilität der Mischstruktur. Als zweiter grundlegender Faktor bei der Herstellung der Mischungen soll nun der Einfluss von Scherkräften im Prozess untersucht werden. Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen diese Prozessgröße auf die Struktureigenschaften hat.

Ein steigender Homogenisationsdruck führt beispielsweise bei Emulsionen zu einer höheren Anzahl kleinerer, dispergierter Tropfen im umgebenden Medium. Damit steigt die gesamte Berührungsfläche zwischen beiden Phasen. Dies bedeutet eine Stabilitätssteigerung aufgrund höherer Viskosität und niedrigerer Sedimentationsgeschwindigkeit. Bei dem hier verwendeten Carrageenan-Milchproteinsystem handelt es sich jedoch um ein Zusammenspiel aus Strang- und Partikelgelsegmenten. Da die rheologische Messprozedur eine definierte Vorscherung beinhaltet, lässt sich aus den bereits gezeigten Ergebnissen eine gewisse Fähigkeit dieser Mischung zu einem Strukturaufbau nach einer Scherbelastung erkennen. Die Scherbelastung in diesem Fall ist jedoch mit 6 Pa relativ gering. Während der Herstellung der bisher gezeigten Versuchsergebnisse wurde nach dem UHT-Abschnitt eine Homogenisierung bei 20 MPa und 62°C durchgeführt. Diese Herstellungsbedingungen sind der Ausgangspunkt für eine weitergehende Untersuchung des Einflusses des Prozessparameters "Scherbelastung" auf die Mischgeleigenschaften.

Bei der Herstellung der Proben erfolgt dieser Prozessparametereinfluss während der definierten Scherbelastungsspitze im Homogenisationsschritt auf eine Mischung von Carrageenan in der Coil-Form mit bereits erhitzungsbedingt modifizierten Proteinclustern. Eine Variation der Druckverhältnisse zu diesem Zeitpunkt bedeutet deshalb eine scherkraftbedingte Modifikation der Biopolymere vor dem gemeinsamen Aufbau der Mischstruktur aus Carrageenanhelices und Proteinclusterbrücken (Abb. 5.31). Durch die Höhe des Homogenisationsdruckes ist eine definierte Variation der Scherkraftbelastung möglich. Nach den bisherigen Ergebnissen ist deutlich, dass die Fähigkeit der Proteincluster zu aktiver Teilnahme am Stukturaufbau auch von ihrer Größe abhängt. Es wird daher untersucht, ob die Proteincluster durch eine intensivere Homogenisation irreversibel geschädigt werden oder ob sie dadurch die Möglichkeit zu einer optimaleren

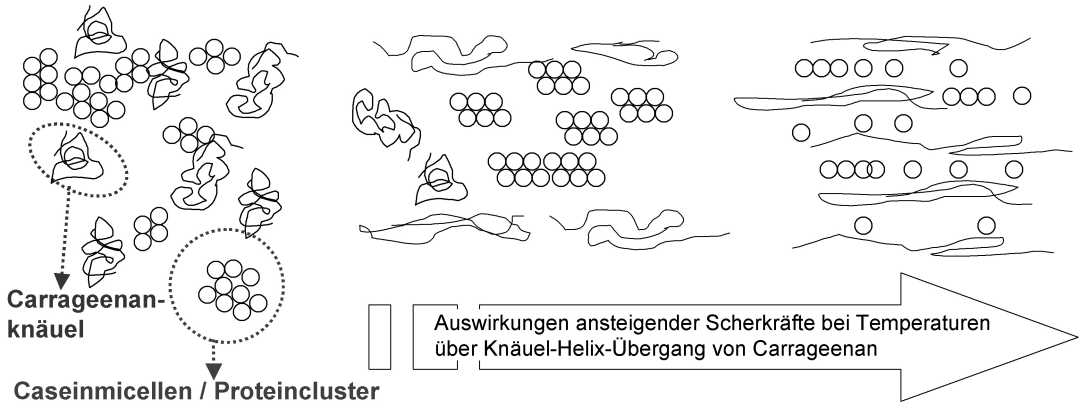

Abb. 5.31: Schematische Darstellung der Mikrostruktur zu Überlegungen der Auswirkungen von Scherkräften während der Herstellung von Milchmisch-Carrageenansystemen.

Neuformierung mit verbesserten Fähigkeiten zur zusätzlichen Vernetzung der Mischstruktur erhalten (Abb. 5.31). Diese Optimierung könnte durch die Vereinzelung von Proteinclustereinheiten (vgl. Abb. 5.31 rechts) mit anschließendem Wiederaufbau gleichmässig verteilter Clusterbrücken während einer scherkraftfreien Ruhepause stattfinden.

Hauptursache für die Entstehung der Proteincluster ist eine Mikrophasentrennung aufgrund des steigenden Bedarfs nach Lösungsmittel bei vollständiger Hydratisierung des Polysaccharids. Durch die Aneinanderlagerung der Caseinmicellen wird das vorher zwischen ihnen eingeschlossene Serum für den Hydrathüllenaufbau des Carrageenans frei. Dieser thermodynamische Vorgang wird grundsätzlich von den Systembedingungen wie Temperatur, Druck etc. bestimmt. Der Fall, dass nach der Homogenisation und bei den dann herrschenden Bedingungen die gleichen thermodynamischen Kräfte wirken, gilt als wenig wahrscheinlich. Es wird daher die These aufgestellt, daß zu hohe Scherbedingungen zu irreversiblen Schäden an den Proteinclustern führen und damit deren Fähigkeit zur aktiven Teilnahme an einem Strukturaufbau eingeschränkt wird. Zur Prüfung dieser These wird folgender Versuch durchgeführt:

Einfluss von Scherkräften auf Proteincluster und Carrageenan in Coil-Form

Für die Mischung wird System B (3,4 % Protein, 0,025 % nicht-standardisiertes Carrageenan; 20 MPa Homogenisationsdruck bei 62 °C) als Standard mit aktiver Beteiligung der Milchproteincluster an der Netzwerkstruktur ausgewählt. Der Herstellungsprozess bleibt bis auf die stufenweise Variation des Homogenisationsdrucks von 0, 20, 30, 40, 50 und 80 MPa gleich (Abb. 5.32).

Als Maßzahl für die Widerstandskraft bzw. Spannungsstabilität der Mischstruktur gilt die Schubspannung, bei der eine Unregelmäßigkeit in der entsprechenden Viskositätskurve auftritt.

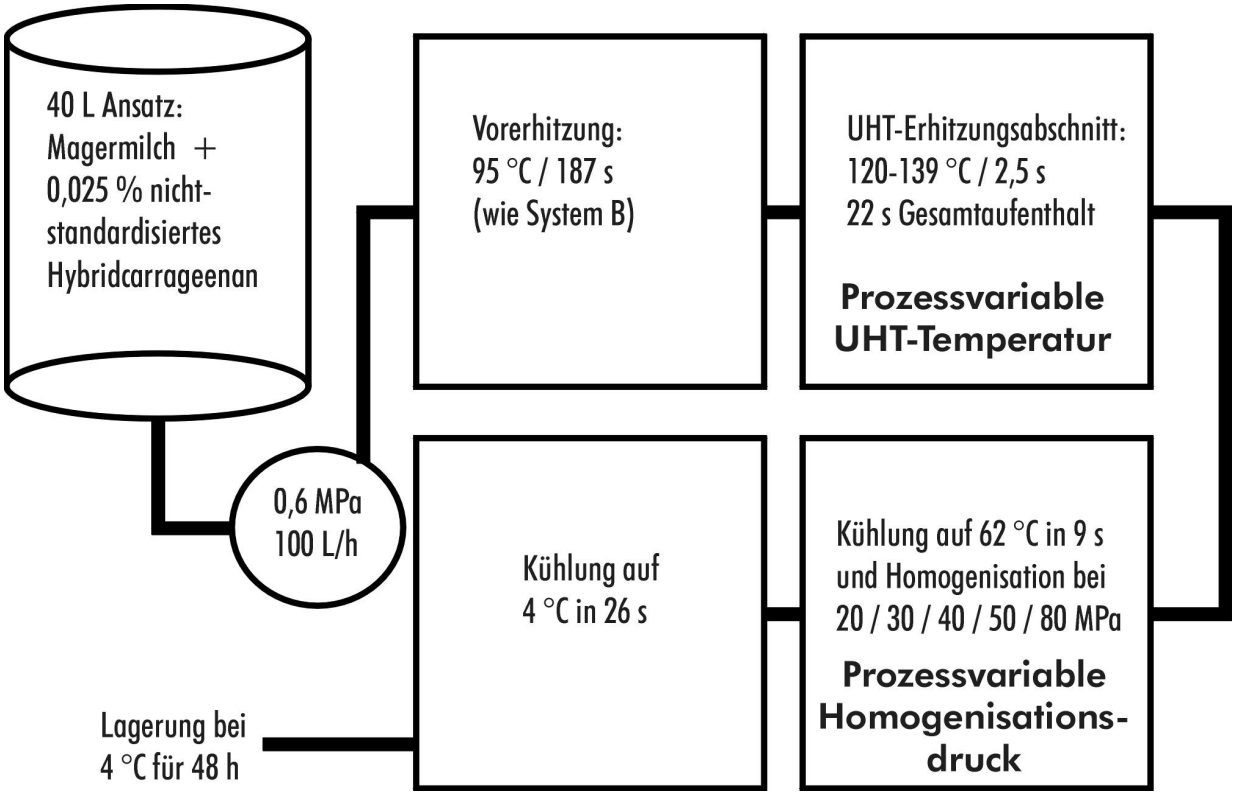

Abb. 5.32: Prozessschema zur Herstellung der Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. Unter Experiment Nr.6 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Temperatur und die Druckhöhe im Homogenisationsschritt.

Die Begriffe “Spannungsstabilität”, “Strukturstabilität” und “Schubspannungsstabilität” werden daher in der Diskussion als gleichbedeutend verwendet. Wie bereits erwähnt, wird dieser Strukturpunkt einem Auseinanderreißen von überdehnten Verknüpfungspunkten im Mischsystem zugeschrieben (SCHENZ, 1997; RODD ET AL., 2000; BIXLER ET AL., 2001). Die Mischstrukturstabilität hängt sowohl von der Erhitzungstemperatur im UHT-Bereich wie auch vom Druckniveau im nachfolgenden Homogenisationsschritt ab (Abb. 5.33). Ohne Homogenisierung bzw. bei niedrigem Homogenisationsdruck und bei UHT-Erhitzungsbedingungen von über 125 °C lässt sich deutlich ein temperaturabhängiger Anstieg der Spannungsstabilität (=Strukturstabilität) beobachten. Wird jedoch der Homogenisationsdruck auf Werte über 30 MPa angehoben, so sinkt die Stabilität des Mischsystems und erreicht einen Plateauwert bei Drücken über 40 MPa. In Abbildung 5.33 wird damit der signifikante Stabilitätszuwachs deutlich, der auf einer Prozessführung mit hohen Erhitzungstemperaturen, gefolgt von niedrigen Scherbelastungen, also niedrigen Homogenisationsdrücken wie beispielsweise 20 MPa, basiert.

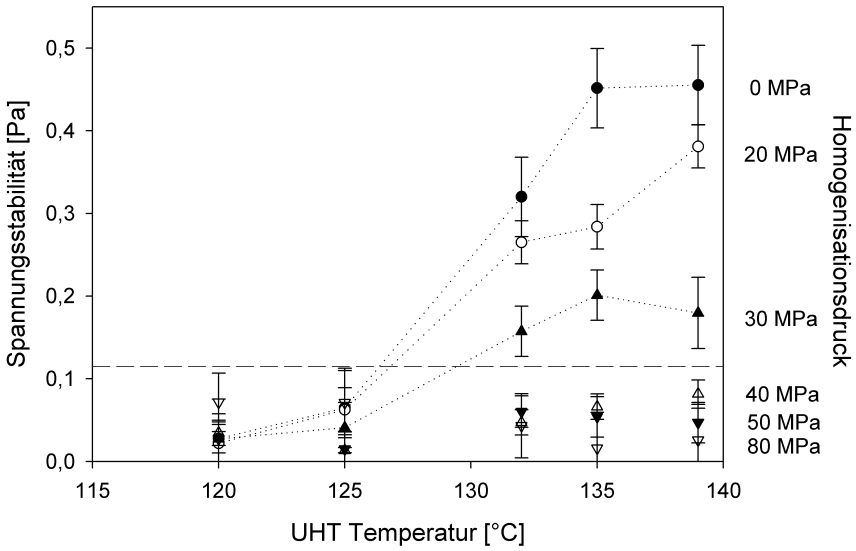

Abb. 5.33: Strukturstabilität von Milchmischungen mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von UHT-Temperatur und Homogenisationsdruck. Die Symbole sind dem rechts daneben stehenden Homogenisationsdruck zugeordnet.

Abbildung 5.34 zeigt den Viskositätsabfall am Strukturpunkt, der durch eine die Stabilität der Mischstruktur übersteigende Schubspannungsbelastung hervorgerufen wird, in Abhängigkeit von Erhitzungstemperatur und Druckbedingungen. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Druckstufen 30 MPa und 50 MPa nicht aufgetragen; sie liegen in der Streubreite der bei 20 bzw. 80 MPa erhaltenen Werte. Deutlich sichtbare Viskositätsänderungen in Richtung niedrigerer Werte sind nur bei Homogenisationsdrücken unter 40 MPa und UHT-Erhitzungsbedingungen ab 132 °C zu verzeichnen. Wie in Kapitel 5.1.3 angeführt, wird dieser gut

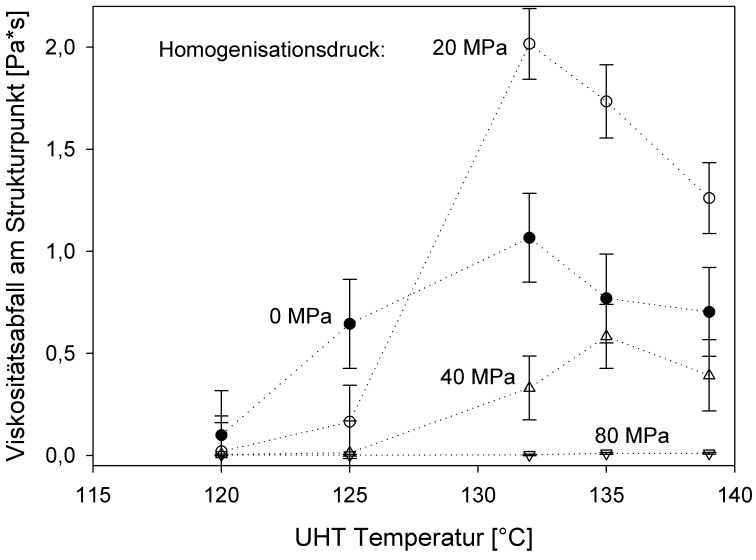

Abb. 5.34: Viskositätsabfall am Strukturpunkt von Milchmischungen mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von UHT-Temperatur und Homogenisationsdruck.

differenzierbare und damit schlagartige Viskositätsabfall am Strukturpunkt einer Überlastung der schwächsten Mitglieder der Mischstruktur zugeschrieben, die dann auf einen Schlag auseinanderbrechen. In diesem Fall sind dies die Proteinclusterbrücken, da die Mischstruktur nur bei Temperaturen ab 132 °C eine aktive Rolle der caseindominierten Proteincluster bei den Texureigenschaften des Biopolymersystems aufweist.

Grundsätzlich entstehen die traubenartigen Proteincluster durch eine Mikrophasentrennung während der Erhitzung der Biopolymermischung. Mit der Erhitzung lösen sich auch innermolekulare Aneinanderlagerungen im Carrageenanmakromolekül. Durch diese Lockerungen und Auffaltungen des ungeordneten Molekülknäuels wächst der Bedarf nach einer erweiterten Hydrathülle für das Polysaccharid. Für die Milchproteine bedeutet dies eine thermodynamisch bedingte Aggregation der Caseinmicellen zu Mikrodomainclustern, was zur Freisetzung von eingeschlossenem Serum führt. Dies entspricht dem Bild, das durch elektromikroskopische Aufnahmen eines entsprechenden Modellsystems von Spagnuolo et al. (2005) entsteht (Abb. 2.32). Die Proteincluster erfahren abhängig von der Temperaturhöhe im UHT-Bereich verschiedene Veränderungen, wie z.B. eine Verschiebung im Calciumphosphatgleichgewicht (Schreiber, 2001; Bulca et al., 2004). Die temperaturabhängigen Modifikationen bilden die Grundlage für eine aktive Teilnahme der Milchproteine an einem schwachen Netzwerk. Jedoch beschränkt sich diese erhitzungsbedingte Beteiligung der Proteincluster am schwachen Netzwerk in Abbildung 5.34 auf Systeme, welche nur mit einem Homogenisationsdruck unter 40 MPa hergestellt wurden. Steigt der applizierte Druck auf ein höheres Niveau, nimmt der den Proteinbrücken zugeschriebene Viskositätsunterschied deutlich ab. Dies zeigt, dass bei höheren Scherkräften Zusammensetzung und damit auch Größe der Proteincluster irreversibel verändert werden.

Um dieser Beobachtung in den Ergebnissen der Schubspannungskurve im Detail nachzugehen, wurden jeweils Proben aus dem gleichen Versuchsansatz parallel und nach gleicher definierter Vorbehandlung mit zerstörungsfreien rheologischen Messungen untersucht. Dabei ist beiden Methoden gemeinsam, dass vor der eigentlichen Messung eine konditionierte Vorscherung (6 Pa für 180 s), gefolgt von einer definierten Ruhephase, im Rheometer selbst durchgeführt wird. Da oszillierende Messungen mit kleiner Auslenkung zerstörungsfrei sind, kann die Aufnahme von Messwerten bei dieser Methode bereits während dieser definierten Ruhephase nach der Vorscherbehandung durchgeführt werden. Aus der zeitabhängigen Entwicklung des Phasenwinkels δ während dieser 15 Minuten dauernden Ruhephase kann die Geschwindigkeit, mit der sich die Mischstruktur nach dieser Belastung wieder neu formiert, erfasst werden. In Abbildung 5.35 ist die Steigung aus dem Zusammenhang beider Variablen als Geschwindigkeit des Texturwiederaufbaus für Proben mit verschiedener Herstellungsgeschichte beschrieben. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Druckstufen 20 MPa und 40 MPa nicht aufgetragen; sie liegen in der Streubreite der bei 30 bzw. 50 MPa erhaltenen Werte. Auch mit diesem Messverfahren ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 5.34. Die höchsten Messwerte, also der erfolgreiche Aufbau zu einem schwachen Netzwerk, werden bei Prozessbedingungen von über 130 °C und unter 40 MPa Druck beobachtet.

Zugehörige Partikelgrößenmessungen in Abbildung 5.36 bestätigen, dass die Proteincluster bei Systemen mit einer Fähigkeit zu schneller Rekonstitution einen größeren Durchmesser aufweisen. Da die Sensorik des Magermilch-Carrageenan-Mischsystems mit Vollmich (also inkl. Milchfett,

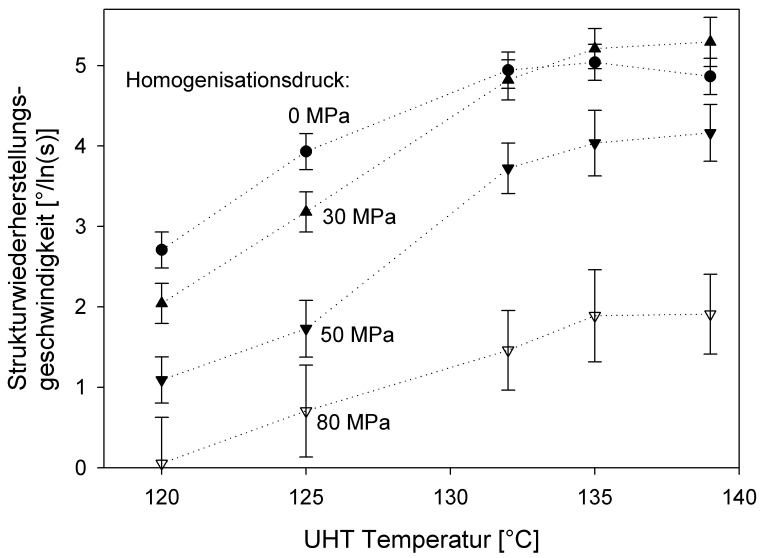

Abb. 5.35: Geschwindigkeit des Strukturwiederaufbaus nach definierter Vorscherung am Anfang der rheologischen Analyse von Milchmischungen mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von UHT-Temperatur und Homogenisationsdruck während der Herstellung der Biopolymermischungen.

aber ohne Carrageenan) vergleichbar ist, sollen im Folgenden einige physikalische Zusammenhänge aus der Verarbeitung von Vollmilch aufgezeigt werden, die möglicherweise auch zur Erklärung des Einflusses der Proteinclustergröße im Carrageenan-Magermilchmischsystem von Bedeutung sein könnten.

Aus der Milchwissenschaft ist bekannt, dass durch eine Homogenisierung der Fettkügelchen auf Durchmesser kleiner als 700 nm eine Entmischung der Vollmilch während der Lagerung verhindert wird (KESSLER, 1996). Begründet wird dies mit dem quadratischen Einfluss der Partikelgröße auf die aus Widerstands- und Schwerkraft resultierende Partikelgeschwindigkeit (Archimedisches Prinzip kombiniert mit Stokes). Diese fällt bei kleineren Partikeln geringer aus, so dass im Beispielsystem "Vollmilch" keine Entmischung der Fettphase während der Lagerzeit sichtbar wird.

Im Carrageenan-Magermilchmischsystem ist dagegen eine möglichst schnelle Proteinteilchenbewegung zurück zu den während der Vorscherung auseinandergerissenen Proteinbrückensegmentstellen erwünscht. Auffällig ist bei einer Gegenüberstellung der Abbildungen 5.35 und 5.36, dass größere Proteinpartikelmittelwerte zu hoher Strukturwiederherstellungsgeschwindigkeit führen, wie z.B. die Cluster mit einer mittleren Größe bis zu Werten von 1000 nm, die bei einer Erhitzung auf 139 °C und Homogenisationsdrücken unter 40 MPa entstehen. Unabhängig von der treibenden Kraft für die Proteinclusterbewegung während der Ruhephase nach der Vorscherung (Archimedisches Prinzip, molekulare Wechselwirkungen etc.) gilt, dass auch bei einer langsamen Partikelbewegung die inneren Reibungskräfte im Fluid zu überwinden sind (HAMMER ET AL., 1988). Der Betrag dieser inneren Reibungskräfte in der Flüssigkeitsmatrix wird durch die Gleichung von Stokes beschrieben, in die ebenfalls der Partikeldurchmesser eingeht. Damit ergibt sich in der Lösungsmittelmatrix grund-

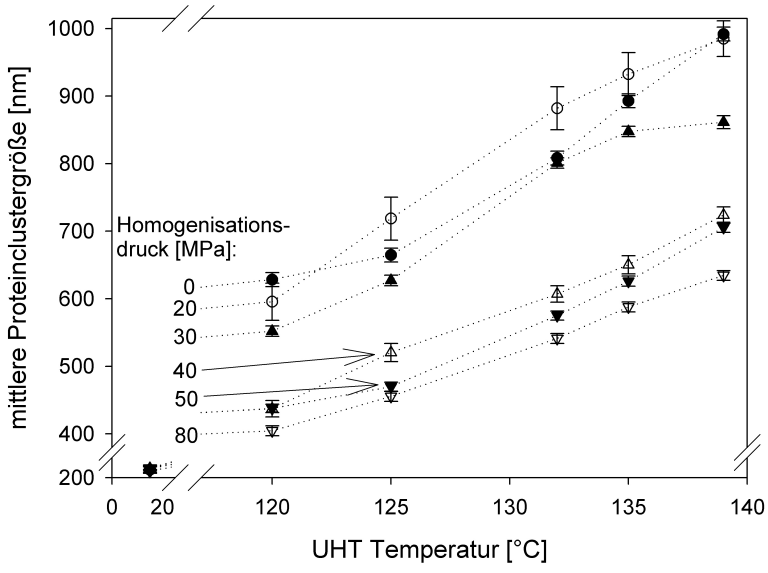

Abb. 5.36: Proteinclustergröße von Milchmischungen mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von UHT-Temperatur und Homogenisationsdruck.

sätzlich eine geringere Widerstandskraft (= bei einer Bewegung zu überwindende Reibung) für kleine Proteincluster, wie sie bei hohen Homogenisationsdrücken entstehen. Aufgrund des Einflusses des Partikeldurchmessers beim Ansatz von Archimedes liegen an größeren Partikeln jedoch die übrigen Kraftvektoren auf höherem Niveau. Bei Herstellungsbedingungen, welche große Proteincluster verursachen, fällt die Strukturwiederaufbaugeschwindigkeit höher aus. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Schnelligkeit der Partikelbewegung allein nicht die einzige Möglichkeit zur Verbesserung des Strukturwiederaufbaus nach einer Überscherung darstellt. Ausschlaggebend ist vielmehr die Proteinclustergröße an und für sich und damit die Fähigkeit, größere Distanzen zwischen benachbarten Carrageenansträngen zu überbrücken.

Relativ große Proteincluster finden sich in Abbildung 5.36 nach Erhitzungen über 130 °C und Drücken unter 40 MPa. Zwar steigen die mittleren Partikelgrößen auch bei höheren Homogenisationsdrücken in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzung an, erreichen aber nicht mehr Werte über 800 nm. Diese mittlere Clustergröße besitzen nur Systeme, welche eine rheologisch erfassbare Beteiligung der Proteincluster an den Textureigenschaften des Mischsystems zeigen (Abb. 5.33-5.36). Zieht man nun ein Resümee aus den messbaren Auswirkungen der Kombination von UHT-Erhitzung und Homogenisation auf die Biopolymermischung, so wird Folgendes deutlich:

Die Zusammensetzung des untersuchten Mischsystems bei Standardbedingungen ("System B") war so gewählt, dass sie im Grenzbereich zu schwach gelierten Systemen mit einer Einbindung der Proteincluster liegt (SCHORSCH ET AL., 2000). Die durch die Variation der Prozessparameter hervorgerufenen deutlichen Unterschiede der Textureigenschaften von Mischungen gleicher Biopolymerzusammensetzung machen die Auswirkungen einer Beteiligung des Milchproteins für ein durchgehendes, zusammengesetztes Netzwerk deutlich. Die Beteiligung der Proteincluster an der carrageenanbasierten Helixstruktur kann je nach Prozessbedingungen verstärkt oder vermindert werden. Durch die Verschiebung im Ionengleichgewicht bei hohen UHT-Temperaturen zeigt sich ein strukturstabilisierender Effekt mit Auswirkung auf die Vernetzung der Milchproteine (O'CONNELL ET AL., 1999; SCHREIBER, 2001; BULCA ET AL., 2004). Auf Carrageenan wirkt sich die UHT-Temperatur dagegen nicht so deutlich aus. Unabhängig von der Temperaturhöhe in diesem Bereich wird das Polysaccharid vollständig hydratisiert. Damit steuert zunächst die UHT-Erhitzung in erster Linie die Größe der Proteincluster und deren aktive Beteiligung an einer Mischstruktur. Dies beeinflusst nicht nur die Strukturstabilität (Abb. 5.33), sondern wirkt sich auch in einer verbesserten Fähigkeit zum Strukturwiederaufbau nach Scherbelastungen während der Mischgellagerung aus (Abb. 5.35).

Werden jedoch im Herstellungsprozess nach der UHT-Erhitzung höhere Drücke als 30 MPa angewendet, so nimmt die den Milchproteinclustern zugeschriebene Texturverstärkung aufgrund der erfahrenen Scherkraftbelastung wieder ab. Der Hintergrund für diese Strukturschwächung wird durch die Ergebnisse der Partikelmessung deutlich. Hier zeichnet sich ein Aufbrechen von Proteinclustern in kleinere Einheiten ab (Abb. 5.36). Mit diesen geringeren Ausmaßen verlieren die Cluster offenbar ihre Fähigkeit zur Brückenbildung zu benachbarten Carrageenanhelices. Damit entfällt die aktive Beteiligung von Milchproteinen in der Strukturbildung. Dies zeigt das Ausbleiben eines plötzlichen Viskositätsabfalls bei einem Überdehnen des Netzwerks (Abb. 5.34). Die Carrageenstränge selbst besitzen aufgrund verschiedener, aus ihrer Einbindung in das Grundgerüst des Strangnetzwerks resultierender sterischer Hinderungen und aufgrund elektrosta-

tischer oder sonstiger Abstossungskräfte zwischen funktionellen Molekülabschnitten nicht weitere Möglichkeiten zur Makromolekülkettenassoziation.

Einfluss von Scherkräften auf eine Struktur aus Proteinclustern und Carrageenanhelices

Deuten die bisherigen Messergebnisse in erster Linie an, dass hohe Scherkräfte während der Herstellung vor allem die Beteiligung der Proteincluster als Verbindungspunkte im carrageenanbasierten Netzwerk beeinträchtigen, so soll im nächsten Abschnitt auch noch eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden, da noch eine Erklärung für den Einfluss dieser Prozessbedingungen auf die im Grundlagenteil vorgestellten spezifischen Wechselwirkungen zwischen Carrageenan und Protein fehlt. Ansonsten wären die beobachteten Effekte ausschließlich auf die Änderung der Partikelgröße zurückzuführen, und spezifische Wechselwirkungen würden nur eine Nebenrolle spielen.

Allgemein wird in der Literatur eine starke spezifische Wechselwirkung zwischen Casein und Carrageenan aufgrund einer höheren Ladungsdichte nur Carrageenan in der Helixform zugeschrieben (Morris et al., 1980; Augustin et al., 1999). Bei dem hier vorgestellten Experiment wird der Homogenisationsschritt aber bei 62 °C durchgeführt. Diese Temperatur ist damit höher als die Coil-Helix-Übergangstemperatur. Carrageenan liegt also während der definierten Scherbelastung als ungeordnetes Knäuel vor. Zwei Ansätze sind zur Erklärung des molekularen Verhaltens möglich:

a) Die Proteincluster werden aufgrund der mit der vollständigen Hydratation des Polysaccharids im Erhitzungsschritt induzierten Mikrophasenseparation zunächst vollständig ausgebildet. Während der Homogenisation im nächsten Prozessschritt werden sie jedoch in einer Weise so beeinträchtigt, dass sie bei einer weiteren Temperaturabsenkung zwar an Carrageenanhelices assoziiert werden, die Fähigkeit zu einer Brückenbildung zwischen benachbarten Polysaccharidsträngen jedoch nicht besitzen, da sie den Zwischenraum nicht mehr ausfüllen können.
b) Es treten aufgrund der starken Elektronegativität der Sulphatgruppen auch schon bei höheren Temperaturen Wechselwirkungen zwischen den Biopolymeren auf. Dadurch besteht die Möglichkeit einer emulgatorähnlichen Anlagerung von Coil-Carrageenan an der Caseinmicellenoberfläche. In diesem Fall kann ein zu hoher Homogenisationsdruck auch bedeuten, dass mit der verstärkt auftretenden Kavitation im Homogenisationsspalt diese Anlagerung verloren geht und damit Ausgangspunkte (ähnlich wie bei einer Kristallisation) für eine Brückenbildung durch aneinandergelagerte Caseincluster bei tiefen Temperaturen fehlen.

Zur Klärung, welche Schlussfolgerung zutrifft, ist ein differenziertes Bild des Scherkrafteinflusses nötig. Dies soll in Ergänzung zu den bisher gezeigten Experimenten gewonnen werden. System E entspricht in Zusammensetzung und Herstellungsablauf System B, mit der Ausnahme, dass vor der Homogenisation stärker heruntergekühlt wird, so dass diese bei 10 °C stattfindet (Abb. 5.37). Eine Absenkung der Homogenisationstemperatur von 62 auf 10 °C bedeutet, dass Carrageenan bei der Scherbelastungsspitze nicht mehr in Form ungeordneter, flexibler Knäuel vorliegt, sondern in länglichen, unflexiblen Helixsträngen (Abb. 5.38).

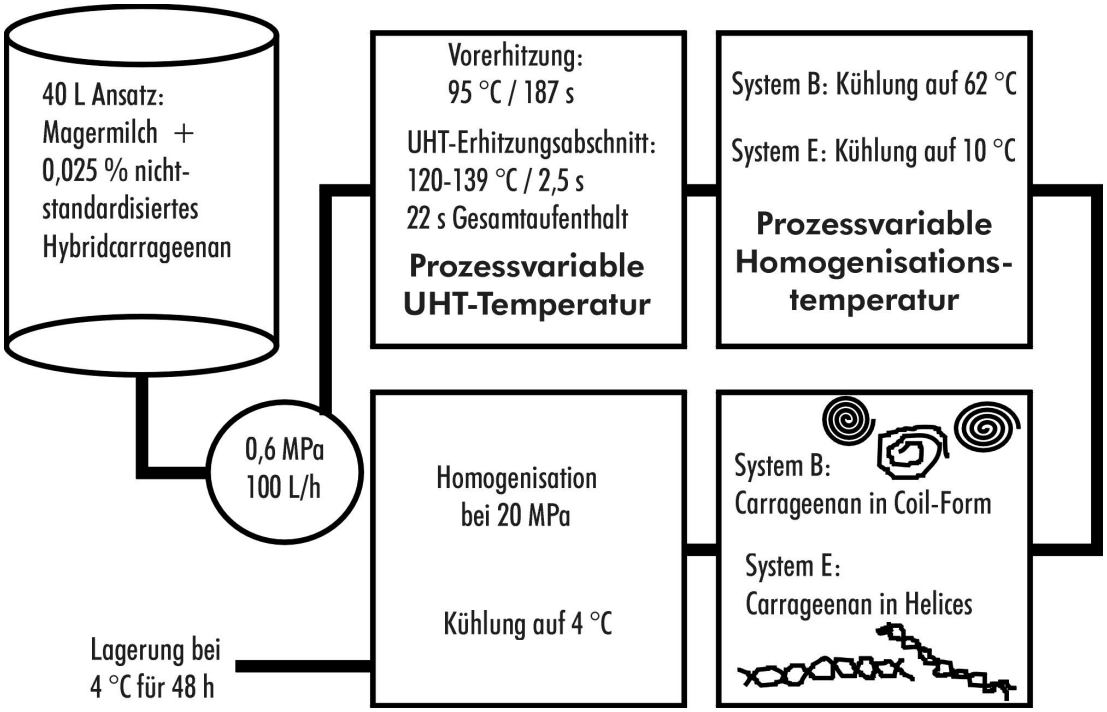

Abb. 5.37: Prozessschema zur Herstellung der Carrageenan-Milchproteinmischsysteme. Unter Experiment Nr.7 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Temperatur und Temperatur der Homogenisation.

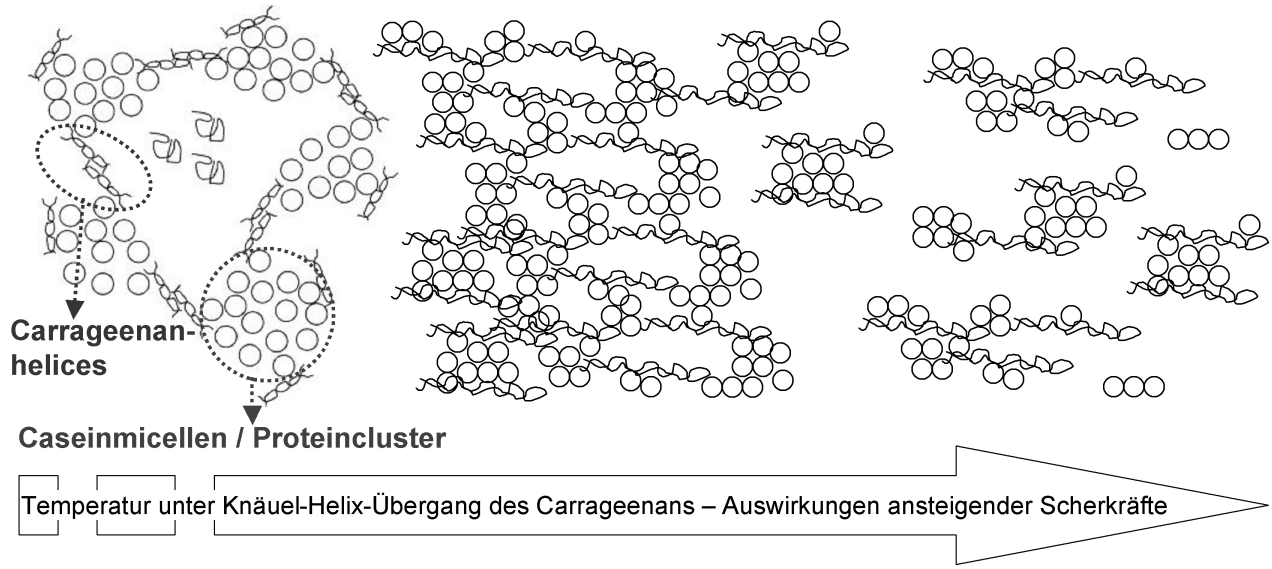

Abb. 5.38: Schematische Darstellung der Mikrostruktur zu Auswirkungen von Scherkräften bei Temperaturen unterhalb des Knäuel-Helix-Übergangs von Carrageenan während der Herstellung der Mischsysteme.

Abbildung 5.39 zeigt den Viskositätsabfall der Systeme B und E in Abhängigkeit von der Temperatur im UHT-Abschnitt. Die beiden Systeme unterscheiden sich lediglich in der Homogenisationstemperatur, die Mischungszusammensetzung selbst ist gleich. Die Gegenüberstellung dieser rheologischen Eigenschaft von System B und E verdeutlicht, dass beim System E mit einer Absenkung der Homogenisationstemperatur die Beteiligung von Proteinclusterbrücken, welche durch die Erhitzung mit 132, 135 oder 139 °C im vorangegangenen UHT-Abschnitt induziert werden, wieder verschwindet. Dies zeigt sich durch die überlappenden Signifikanzintervalle (Fisher's LSD) der bei 10 °C homogenisierten Proben von System E. Für den Mischgelaufbau bedeutet dies, dass unter solchen Herstellungsbedingungen die Verstärkung durch die Beteiligung der

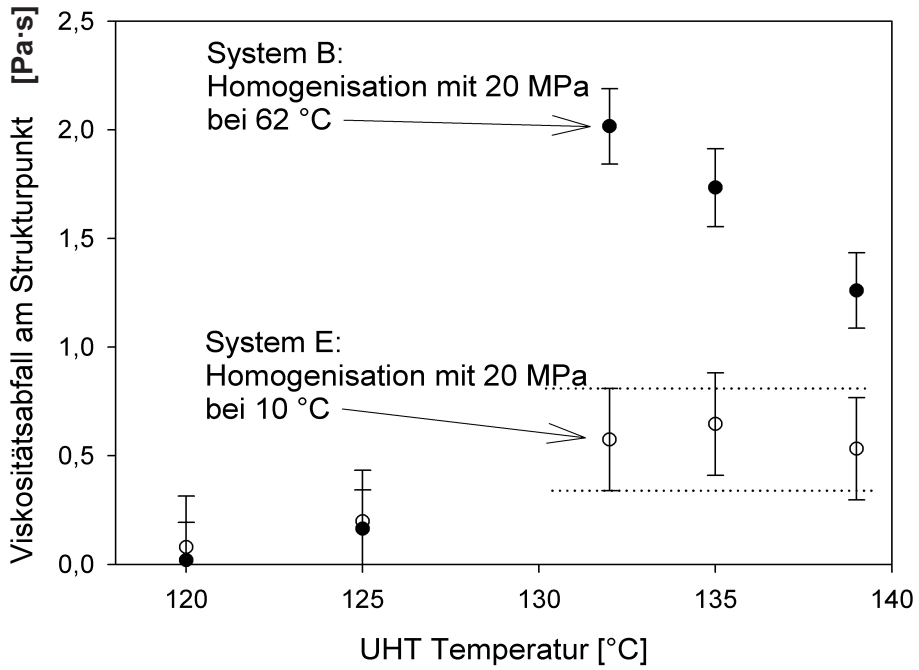

Abb. 5.39: Viskositätsabfall am Strukturpunkt für zwei unterschiedlich hergestellte Milchmischungen mit 0,025 % nicht-standardisierten Carrageenan in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur. Details zum Herstellungsprozess sind in Abbildung 5.37 beschrieben.

Proteincluster als Brücken zwischen benachbarten Helices nicht erfolgt.

Die Ergebnisse zugehöriger Partikelmessungen spiegeln den Hintergrund für dieses Verhalten wider. Abbildung 5.40 zeigt die mittlere Partikelgröße der Proteincluster der Systeme B und E über der UHT-Temperatur. Das bei 10 °C homogenisierte System E weist unabhängig von der UHT-

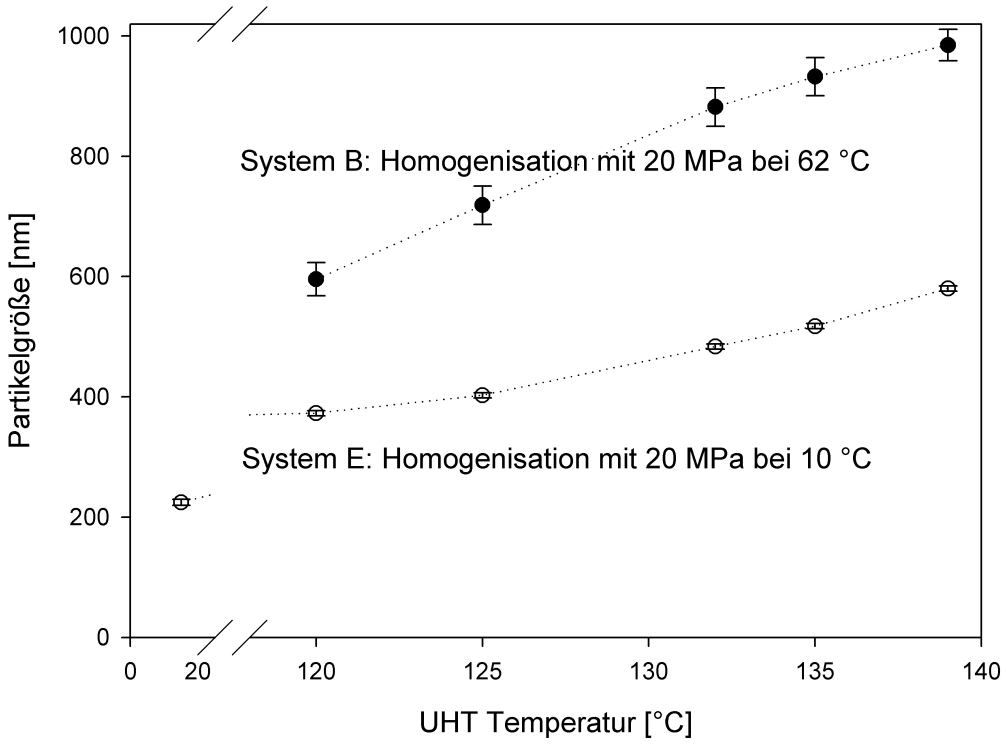

Abb. 5.40: Proteinclustergröße in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur für unterschiedlich hergestellte Milchmischungen mit nicht-standardisierten Carrageenan. Details zum Herstellungsprozess sind in der Abbildung beschrieben.

Behandlung niedrigere Mittelwerte der Proteinclustergröße im Vergleich zu dem bei 62 °C homogenisierten System B auf. Nimmt man Abbildung 5.36 als Erklärungsgrundlage für den Prozesseinfluss auf die Proteincluster, so wird in einer Gegenüberstellung zu Abbildung 5.40 deutlich, dass die Auswirkungen hoher Scherkräfte auf die Partikelgröße bei Helix-Carrageenan-Milchprotein-Mischungen deutlich höher ausfallen als bei gleichen Mischungen mit Carrageenan in der Coil-Form.

Zur Erklärung müssen zwei mögliche Antworten auf ihre Richtigkeit geprüft werden:

a) In Folge der Scherkräfte ergibt sich ein komplettes Aufbrechen und Abtrennen der Proteincluster von ihren Assoziationsstellen an den Polysaccharidketten.

b) Die Ursache liegt in einer scherkraftbedingten Verminderung des Molekulargewichts des Carrageenans mit der Konsequenz, dass die thermodynamischen Kräfte für eine Mikrophasenseparation mit der entsprechenden Aggregation von Proteinclustern abnehmen.

Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wird durch das Heranziehen weiterer rheologischer Kennzahlen ermöglicht, da sich so eine detailliertere Beschreibung der Vorgänge auf molekularer Ebene ergibt. Auffällig ist insbesondere, dass im Gegensatz zur Höhe des Viskositätsabfalls am Strukturpunkt (Abb. 5.39) die Strukturstabilität für Systeme mit 0,025 % Carrageenan und 20 MPa Homogenisationsdruck nicht durch die Homogenisationstemperatur beeinflusst wird (Abb. 5.41). In Abbildung 5.41 wird dies durch die fehlenden Unterschiede in den Mindestsignifikanzintervallen der einzelnen Ergebnisse deutlich. Es lassen sich lediglich unabhängig von der Homogenisationstemperatur zwei Gruppen bilden: zum einen die Proben, die eine UHT-Erhitzung von 120-125 °C erfahren hatten, und zum anderen diejenigen, welche bei 132, 135 oder 139 °C erhitzt wurden.

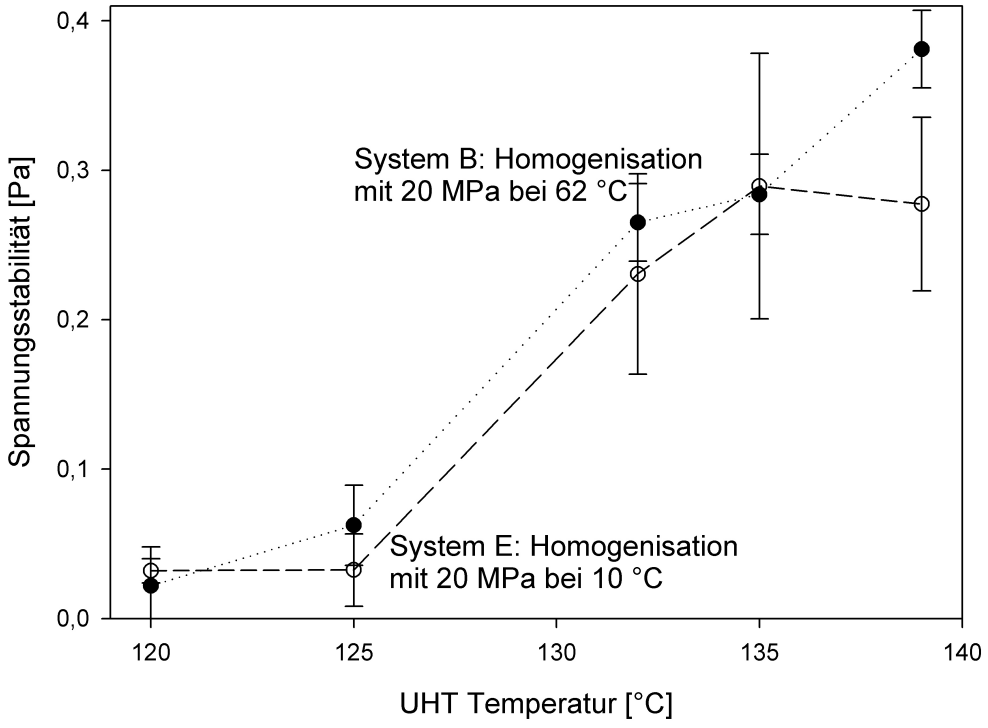

Abb. 5.41: Spannungsstabilität (=Schubspannungsstabilität bzw. Strukturstabilität) in Abhängigkeit von der UHT-Temperatur für unterschiedlich hergestellte Milchmischungen mit nicht-standardisiertem Carrageenan.

Aus den vorangegangenen Ergebnissen ist bekannt, dass die Strukturstabilität bei dem bei 62 °C homogenisierten System B von der Beteiligung der Proteincluster bestimmt wird. Deren aktive Rolle an der Mischgelstruktur spiegelt sich mit steigender UHT-Temperatur immer deutlicher sowohl in der Spannungsstabilität wie auch im Viskositätsabfall wider. Bei einer Homogenisierung bei 10 °C geht die Beteiligung der Proteincluster zwar verloren, trotzdem kann die Mischung unverändert eine Widerstandskraft gegenüber einer angelegten Schubspannung aufbauen. Eine Erklärung dieser Beobachtung ergibt sich aus folgender Diskussion:

Ein Vorteil des hier verwendeten κ-/ι-Hybridcarrageenans gegenüber stärker κ-dominierten Carrageenantypen besteht in seiner Fähigkeit, in Ruhephasen Verletzungen der Gelstruktur durch calciumvermittelte Assoziationen von ι-dominierten Abschnitten benachbarter Makromoleküle wieder ausgleichen zu können (SEDLMEYER ET AL., 2003). Dies kann bedeuten, dass diese Calciumbrücken zwischen benachbarten ι-Abschnitten prozessbedingt ausgefallene Proteinclusterbrücken ersetzen können. In diesem Fall vermindert zwar eine Homogenisation bei 10 °C die Beteiligung von caseindominierten Proteinclustern an einer zusammengesetzten Netzwerkstruktur. Die makroskopischen Struktureigenschaften bleiben jedoch unverändert, wenn die für die Spannungsstabilität entscheidende Anzahl an Verknüpfungspunkten im carrageenandominierten Netzwerk durch calciumvermittelte Assoziationen von Helixsträngen ausgeglichen wird.

Einem solchen Verhalten würden aber bestimmte Ergebnisse des am Strukturpunkt gemessenen Viskositätsabfalls widersprechen, insbesondere eine nur ganz allmählich mit steigender Schubspannung abnehmende Viskosität. Wenn der Viskositätsabfall am Strukturpunkt nur relativ gering ausfällt, so liegt beim Überschreiten einer bestimmten Spannungsbelastung nicht gleichzeitiges, schlagartiges Abreißen des schwächeren Netzwerkbausteins, der Proteinclusterbrücken, vor. Das hier beobachtete rheologische Verhalten der bei 10 °C homogenisierten Mischung spricht deshalb für ein Verhalten gegenüber ansteigender Schubspannung, das typisch ist für Partikelgele. In diesem Fall brechen Partikelaggregate nach und nach in kleinere, von Serum umhüllte Einheiten auf.

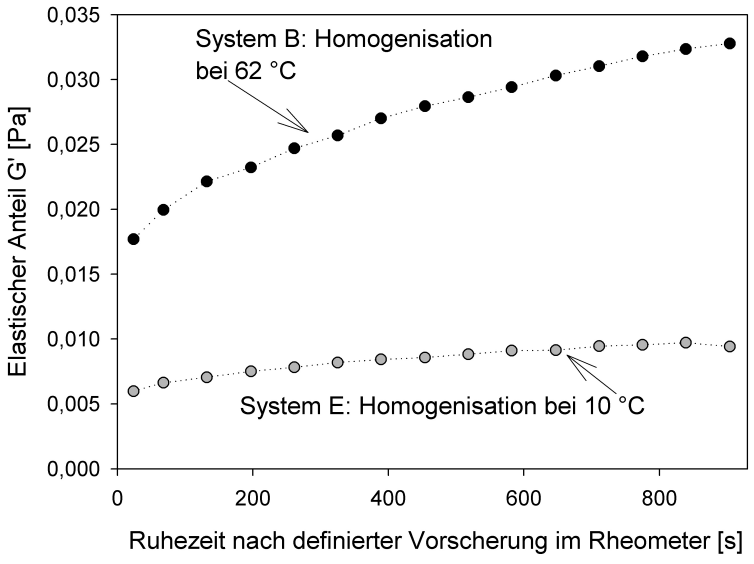

Abb. 5.42: Entwicklung des elastischen Anteils beim Strukturwiederaufbau innerhalb von 15 min nach definierter Vorscherung am Anfang der rheologischen Messprozedur. Details zu den Herstellungsbedinungen von System B und System E in der Abbildung.

Unterstützt wird diese These durch die Ergebnisse der zerstörungsfreien, oszillierenden rheologischen Methode. Abbildung 5.42 zeigt die Messkurven des elastischen Anteils in der Textur von zwei bei unterschiedlichen Temperaturen homogenisierten Mischungen gleicher Zusammensetzung in den ersten 15 Minuten Ruhephase nach einer definierten Scherbelastung von 6 Pa. In diesem Vergleich wird deutlich, dass der Biopolymermischung durch eine Homogenisierung bei 10 °C die Fähigkeit verloren geht, während dieser Ruhephase nach der Scherbelastung die zusammengesetzte Mischgelstruktur

wiederaufzubauen. Auf industrielle Anwendungen übertragen bedeutet dies, dass die Struktur ihr Selbstreparaturvermögen zum Ausbessern von Netzwerkschäden nach relativ niedrigen Scherbelastungen während einer Lagerung oder dem Transport verliert.

Es ist sehr wichtig, dass Rückschlüsse aus rheologischen Kennzahlen auf die Mikrostruktur eines Mischsystems immer im Gesamtbild, das aus verschiedenen Messmethoden resultiert, gesehen werden. So ergibt sich die Strukturstabilität (= Spannungsstabilität) aus der als Strukturpunkt bezeichneten Anomalie der Viskositätswerte, welche das Mischsystem als Gegenkraft im Sinne einer inneren Zähigkeit gegenüber der steigenden, angelegten Schubspannung aufbringt. Der Strukturpunkt steht daher mit einer relativen Änderung der Viskosität in Beziehung, nicht aber mit dem absoluten Wert dieser Produkteigenschaft. Entscheidend ist, bei welcher Schubspannung ein überproportionaler Abriss von strukturbestimmenden Bindungen auftritt.

Der Widerstand gegenüber der angelegten Schubspannung kann nämlich auf unterschiedlichen mechanischen, grundlegenden Strukturelementen beruhen. So kann sich eine große Anzahl schwach verbundener kleinerer Einheiten in der Gesamtheit zu einem ähnlichen Stabilitätsniveau aufsummieren wie eine Struktur aus einer geringeren Anzahl größerer, jedoch fester verbundener Einheiten. Die Spannung, bei der deutliche Viskositätsänderungen unabhängig vom Viskositätsniveau auftreten, kann daher auch in einem ähnlichen Wertebereich liegen, wie er sich hier bei der Variation der Homogenisationstemperatur ergibt. In Kombination mit den Auswirkungen bezüglich Stärke und Ausgeprägtheit des relativen Viskositätsabfalls bei einer Überdehnung der Struktur ergibt sich erst, inwieweit diese Stabilität auf einer Beteiligung der Proteincluster an der Mischgelstruktur beruht.

Bei dieser Carrageenan-Milchproteinmischung bedeutet das, dass der niedrige Viskositätsabfall und die geringe Größe des in einer Ruhephase aufgebauten elastischen Moduls definitiv auf eine fehlende Beteiligung von Proteinclustern an der Struktur bzw. die fehlende Aggregation von Proteineinheiten zu Clustern hindeuten.

Die bisherige Diskussion konnte als ersten Teilaspekt die Frage beantworten, inwieweit die Beteiligung der Proteincluster an einem gemeinsamen Netzwerk durch die Homogenisationsbedingungen gestört wird. Die fehlende Beteiligung einer Biopolymerkomponente muss jedoch nicht automatisch zu einer Instabilität und Entmischung des Mischsystems führen. Als entscheidende Wirkungsmechanismen und treibende Kräfte für diese Strukturstabilisierung gilt neben dem elektrostatischen Ausgleich vor allem eine für die Gesamtentropie günstigere Verteilung der Lösungsmittelmoleküle durch Aggregation hydrophober Oberflächen mit entsprechender Freisetzung des vorher fixierten bzw. eingeschlossenen Serums. Für eine vollständige Betrachtung der Mischsystemstabilität muss daher geprüft werden, ob dieser Mechanismus durch eine Homogenisation bei 10 °C verloren geht. Dies wird durch die nachfolgend beschriebene Versuchsreihe (Experiment Nr. 8) realisiert.

Einfluss von Scherkräften auf Mischungen mit hoher Packungsdichte

Der Bedarf nach freier Entfaltung im Raum und entsprechender Optimierung von für Makromolküle unzugänglichen bzw. von einzelnen Komponenten eingeschlossenen Volumina

besteht grundsätzlich in allen Biopolymersystemen (ANTONOV ET AL., 1979). Die Ausprägung bzw. Stärke der Phasentrennung (wie z.B. zu mikroskopischen Proteinclustern) hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zu nennen sind hier beispielsweise Konzentration, Flexibilität und Molekulargewichtsverteilung der Makromoleküle (ATKINS, 1990). Durch Homogenisation bei Temperaturen unterhalb des Polysaccharid-Coil-Helix-Übergangs geht die Fähigkeit der Mischung zu einer Mikrophasentrennung, d.h. dem Vorliegen zweier mikroskopisch unterscheidbarer Phasen und dem Aufbau einer gewissen Größe von Proteinaggregaten verloren. Dieses durch Scherkräfte verursachte Verhalten deutet auf eine Veränderung in der Molekulargewichtsverteilung des phasentrennungverursachenden Carrageenans hin. Daraus ist zu schließen, dass die Scherkraftspitze die relativ steifen Carrageenanhelices stärker beeinträchtigt als die flexibleren, ungeordneten Knäuel des Carrageenans.

Bei Mischungen mit einer Zusammensetzung, bei der ein Strukturaufbau von der Beteiligung der Proteincluster abhängt, sind die Konsequenzen von verkürzten Carrageenanhelices sehr gut sichtbar. Als Gegenstück müssen daher auch carrageenandominierte Systeme in die Untersuchung des Scherkrafteinflusses einbezogen werden. Bei diesen Mischungen wäre vorstellbar, dass ein gewisser Überschuss an Polysaccharidsträngen eine scherkraftbedingte Verminderung im Molekulargewicht der Biopolymereinheiten ausgleicht. Dazu wird folgendes Experiment durchgeführt:

Die Textur einer Mischung mit 3,4 % Milchprotein und 0,040 % Carrageenan gilt als carrageenandominiert (System F). Für einen Vergleich mit den bereits vorgestellten Systemen B und E wird System F bei entsprechenden Druckstufen und Temperaturen homogenisiert (Abb. 5.43).

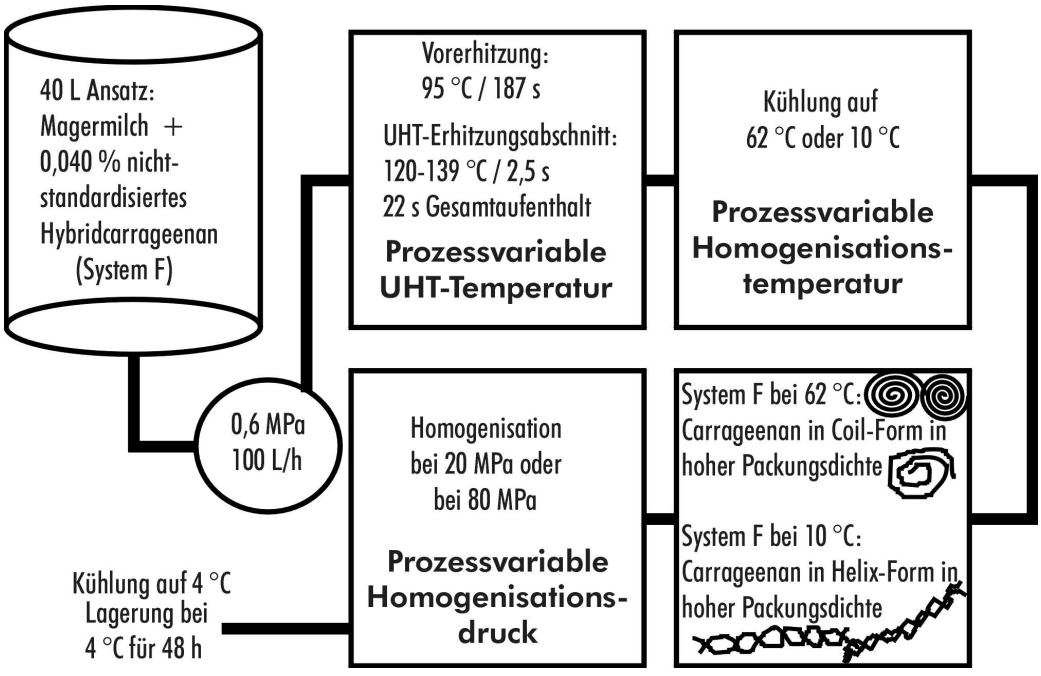

Abb. 5.43: Prozessschema zu System F. Unter Experiment Nr.8 werden folgende Prozessparameter variiert: UHT-Temperatur, Druckhöhe und Temperatur im Homogenisationsschritt.

Die Abbildungen 5.44 und 5.45 geben bei System F die Auswirkungen der verschiedenen Prozessbedingungen auf die mittlere Partikelgröße (Abb. 5.44) bzw. auf die Spannungsstabilität (Abb. 5.45) wieder. System F wurde dabei vier Prozessvariationen unterzogen, einer niedrigen Druckbelastung bei 20 MPa und einer höheren bei 80 MPa, mit jeweils zwei verschiedenen Ho-

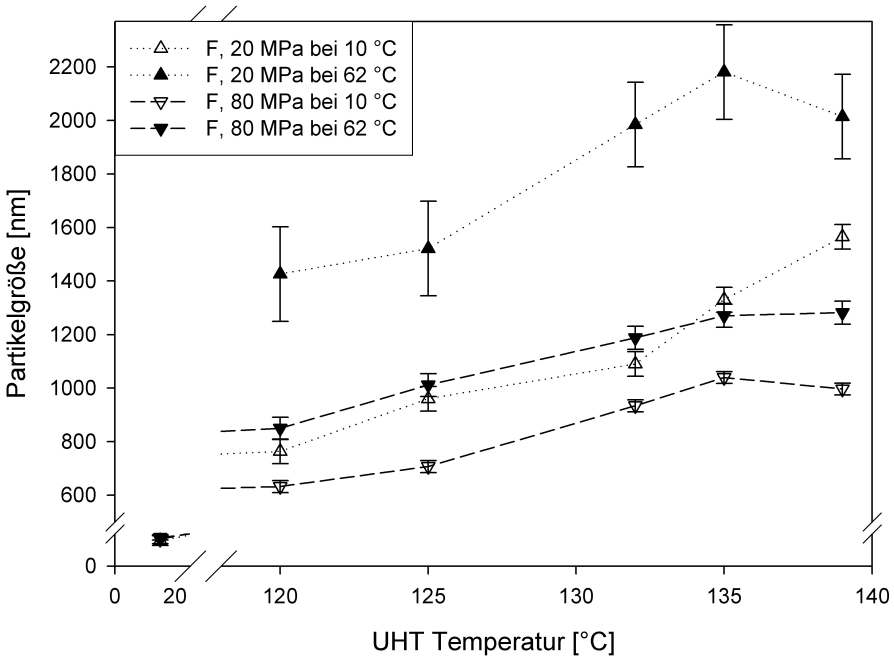

Abb. 5.44 Mittlere Partikelgröße von System F bei verschiedenen Prozessvariationen.

mogenisationstemperaturen von 60 bzw. 10 °C. Auffällig ist bei einem Vergleich des Prozesseinflusses in den Abbildungen 5.44 und 5.45, dass bei einem höheren Druckniveau von 80 MPa die Spannungsstabilität mit sinkender Homogenisationstemperatur zunimmt, obwohl die zugehörige Clustergröße abnimmt.

Bei einem Homogenisationsdruck von 20 MPa nimmt dagegen mit sinkender Homogenisationstemperatur die Spannungsstabilität analog zu der sinkenden Clustergröße ab. Die Ergebnisse von System F zeigen damit, dass bei einem hohen Homogenisationsdruck, wie z.B. 80 MPa, bei einer Carrageenankonzentration von 0,040 % ein ähnlicher Homogenisationstemperatureinfluss vorliegt wie bei dem Vergleich des Temperatureinflusses von 60 bzw. 10 °C auf System B bzw. E mit 0,025% Carrageenan während einer Homogenisation bei 20 MPa Druck. Auch bei diesen Systemen (B und E) wirkt sich ein mit sinkender Homogenisationstemperatur abnehmender Partikelgrößenmittelwert nicht in einer deutlichen Abnahme der Spannungsstabilität (=Strukturstabilität) aus (Abb. 5.40 und 5.41).

Wie in Kapitel 2.1.1 erläutert, besteht ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht des Polysaccharids und der Mischungsentropie bzw. den daraus entstehenden phasenseparierenden Kräften und im Fall des hier behandelten Beispielsystems der dadurch resultierenden Größe der Proteincluster. Im Gegensatz zu kurzen Makromolekülen verstärken lange Makromolekülketten aufgrund ihrer beschränkten Anordnungsmöglichkeiten im Mischsystemvolumen die Notwendigkeit, Proteineinheiten gemäß dem “depletion”-Mechanismus zu Aggregaten zusammenzulagern. Kurze Makromoleküle besitzen dagegen selbst die Möglichkeit, zur Maximierung der

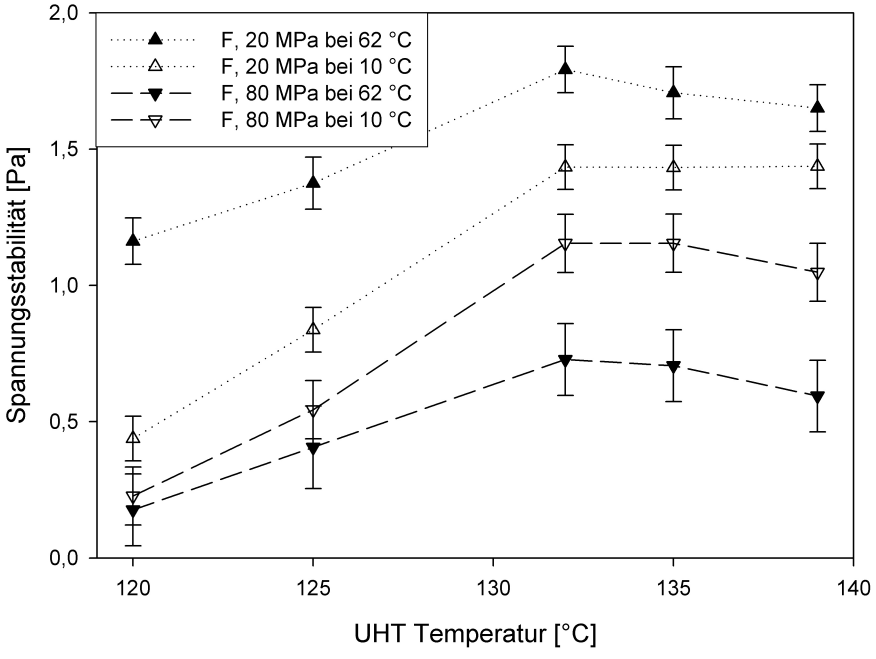

Abb. 5.45 Spannungsstabilität von System F bei verschiedenen Prozessvariationen.

Entropie verschiedene Anordnungen im Raum einzunehmen, so dass die Optimierung im Sinne der Entropie nicht über den "excluded volume"-Effekt durch eine verstärkte Aggregation zu großen Proteinclustern vorgenommen werden muss. Umgekehrt lässt daher das Auftreten einer geringen Proteinclustergröße nach einer bestimmten Prozessvariation auch auf die Möglichkeit einer prozessbedingten Abnahme des Molekulargewichts des Carrageenan schliessen. Vor einer solchen Schlussfolgerung muss jedoch immer auch das Gesamtbild betrachtet werden. Beispielsweise kann bereits die Kopplung der Strukturstabilität an die relative Viskositätsänderung bei niedrigen Carrageenankonzentrationen (System E: 0,025 %) dazu führen, dass dieser Effekt nicht zwingend auch in einer erhöhten Strukturstabilität des Gesamtsystems sichtbar wird. Vielmehr ist entscheidend, bei welcher Schubspannung ein überproportionaler Abriss von strukturbestimmenden Bindungen auftritt. Das kann auf unterschiedlichen mechanischen Strukturelementen beruhen. Dies bedeutet, dass der gleiche Stabilitätslevel z.B. sowohl von einer großen Anzahl schwach verbundener kleinerer Einheiten erreicht werden kann als auch von einer kleineren Anzahl stark verbundener großer Einheiten.

Bei höheren Carrageenankonzentrationen sind die entropiegetriebenen Kräfte zur Aneinanderlagerung der Proteineinheiten und damit der Mikrophasenseparation größer. Dies spiegelt sich im Niveau der Proteinclustergröße wider (vgl. z.B. auch Abb. 5.15). In Abbildung 5.44 zeigt der Vergleich der Partikelgrößenwerte von System F, dass diese unabhängig von der Homogenisationstemperatur bei 80 MPa deutlich niedriger ausfallen, als wenn nur bei einer Druckhöhe von 20 MPa Scherkräfte appliziert werden. Damit kann aufgrund der o.g. Zusammenhänge im Mischsystem indirekt geschlossen werden, dass auch bei carrageenandominierten Mischsystemen eine Beeinträchtigung des Carrageenanmolekulargewichts bei höherem Homogenisationsdruck (80 MPa) auftritt. Die Abnahme der Carrageenankettenlänge in diesem carrageenandominierten System ermöglicht in dem Fall eine optimalere Verteilung von stabilitätsfördernden Berührungspunkten, da sich bei dieser höheren Carrageenankonzentration kürzere Makromoleküle optimaler in ein Gesamtnetzwerk aus Carrageenansträngen einordnen lassen.

Die Untersuchung von System F ergibt damit weitere Erkenntnisse, die sich zu folgendem Gesamtbild zusammenfügen: Bei einer Homogenisierung bei Temperaturen unterhalb des Coil-Helix-Übergangs des Polysaccharids werden zunächst die Proteincluster selbst und ab bestimmten Kombinationen von Druckniveau und Polysaccharidpackungsdichte auch die Carrageenanstränge in Mitleidenschaft gezogen. Damit ist der Einfluss von Scherkräften auf die einzelnen am Netzwerkaufbau beteiligten Biopolymere geklärt. Im nächsten Abschnitt soll daher der Fokus auf die Interaktionsstellen zwischen beiden Biopolymeren gelegt werden.

Einfluss der Wechselwirkungskapazität von Carrageenan

Für eine abschließende Betrachtung der diskutierten Ergebnisse des Scherkrafteinflusses ist noch offen, ob die Proteincluster während hoher Scherbelastungen nur aufgebrochen werden, also ein Proteinrest in Wechselwirkung mit dem Polysaccharid verbleibt. Eine andere Möglichkeit wäre eine vollständige Trennung von den Interaktionsstellen.

Eine Realisation dieser Möglichkeit würde bedeuten, dass die spezifische elektrostatische

Interaktion zwischen Carrageenan und Caseinen sich bei bestimmten Bedingungen anderen Wechselwirkungen unterordnen kann. Das für die Interpretation der Prozesseinflüsse relevante Wechselspiel der Biopolymerwechselwirkungen lässt sich durch gezielte Modifikation des Standardsystems B abschätzen. Indem die Wechselwirkungskapazität von Carrageenan durch einen zusätzlichen Inhaltsstoff verändert wird, kann durch einen Vergleich ausgewählter Mischungen überprüft werden, ob die elektrostatische Wechselwirkung allein das thermodynamische Verhalten und die Interaktion der beiden Biopolymere dominiert. Die modifizierten Systeme werden unter Zugabe von dem aus dem Endosperm von *Cassia tora* bzw. *Cassia obtusifolia* gewonnenen Polysaccharid Cassia bei den Standardprozessbedingungen (UHT-Erhitzung bei 120-139 °C für 2,5 s; Homogenisation bei 20 MPa und 62 °C) hergestellt (Abb. 5.46).

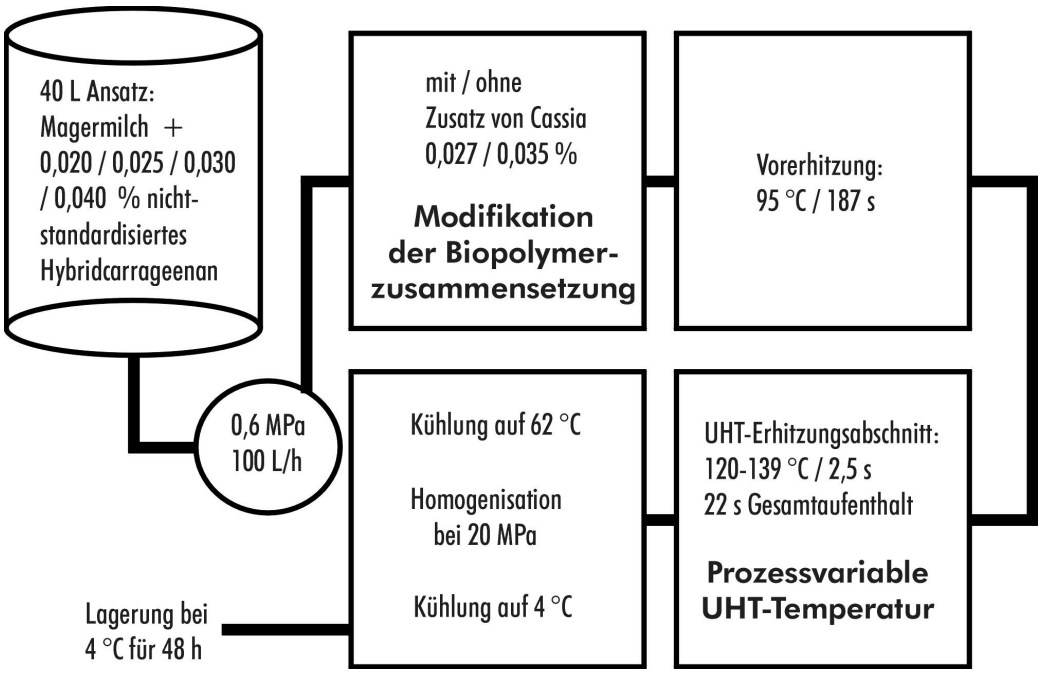

Abb. 5.46: Prozessschema zur Untersuchung von Biopolymermischsystemen mit Cassiazusatz. In Experiment Nr.9 werden die Biopolymerzusammensetzung und die UHT-Temperatur variiert.

Das Polysaccharid Cassia gehört wie Guar und Johannisbrotkernmehl zu der Gruppe der Galactomannane. Der Hauptunterschied zu letzteren ist die breitere Relation von Mannose- zu Galactoseeinheiten in der Polysaccharidkette. Diese Eigenschaft im Makromolekülaufbau bestimmt die Möglichkeiten zu Synergieeffekten in der Strukturbildung bei Mischungen von Galactomannanen und Carrageenan. So ermöglicht das Verhältnis von 4 Mannoseeinheiten pro Galactoseeinheit bei Johannisbrotkernmehl eine Anlagerung an Carrageenanstränge mit der Folge eines synergistischen Anstiegs der Gelstärke (Tako, 1998). Bei Cassia liegt die Anzahl von Mannoseeinheiten bei 5 bis 6 pro Galactosemolekül. Damit ist die Kontaktfläche zur Anlagerung an Carrageenan noch größer, so dass in diesem Fall mit noch stärkeren Interaktionskräften gerechnet werden kann.

Da diese auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, hat eine Beimischung von Cassia zum Milchprotein-Carrageenan-System als Konsequenz eine Konkurrenzsituation um die wechselseitige Assoziation hydrophober Oberflächen. Als Möglichkeiten für wechselseitige hydrophobe Anlagerungen sind hier Cassia-Carrageenan-Wechselwirkungen und die Abdeckung von hydrophoben Oberflächen in der Coil-Form des Carrageenans zu nennen. So können sich

Carrageenanknäuel im Sinne einer Emulgatorschicht an Caseinmicellen anlagern - ein Vorgang, der durch das Maximum hydrophober Wechselwirkungen bei ca. 60 °C begünstigt wird (WALSTRA, 2003).

Abbildung 5.47 zeigt die mittlere Proteinclustergröße in Mischungen von Milchprotein, Carrageenan und Cassia im Vergleich zu Milchproteinsystemen mit verschiedenen Carrageenankonzentrationen. Wie bereits in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt, wird die Proteinclustergröße bei Mischungen ohne Cassia neben der UHT-Erhitzung ebenso durch die Carrageenankonzentration beeinflusst. Vergleicht man diese Mischungen mit Proben, welche zusätzlich eine Zugabe von Cassia enthalten, wirkt sich jedoch der nun höhere Gesamtpolysaccharidgehalt nicht in einer Zunahme des Proteinclusterdurchmessers aus.

Ein höherer Gesamtbiopolymergehalt bzw. eine höhere Packungsdichte kettenförmiger Makromoleküle sollte, thermodynamisch gesehen, zu einer forcierten Mikrophasentrennung und so zur Freisetzung von eingeschlossenem Serumvolumen führen. Diese Serumfreisetzung äußert sich indirekt in einem Anstieg der Proteinclustergröße.

Dies ist jedoch bei Carrageenanmischungen mit Cassiaanteil nicht der Fall. Deutlich wird dies im Vergleich mit Systemen, in denen die Carrageenanmenge allein der Polysaccharidgesamtmenge von Carrageenan und Cassia entspricht. Die mittlere Proteinclustergröße als Indikator für die Mikrophasentrennung liegt bei einer Zugabe von Cassia in etwa im Verhältnis von Carrageenan zu Cassia entsprechend niedriger. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf hydrophobe Assoziationen zwischen beiden Polysacchariden. Eine derartige Verminderung der hydrophoben Gesamtoberfläche mit der entsprechenden Auflösung von Lösungsmittelbereichen mit hohem Ordnungsgrad äußert

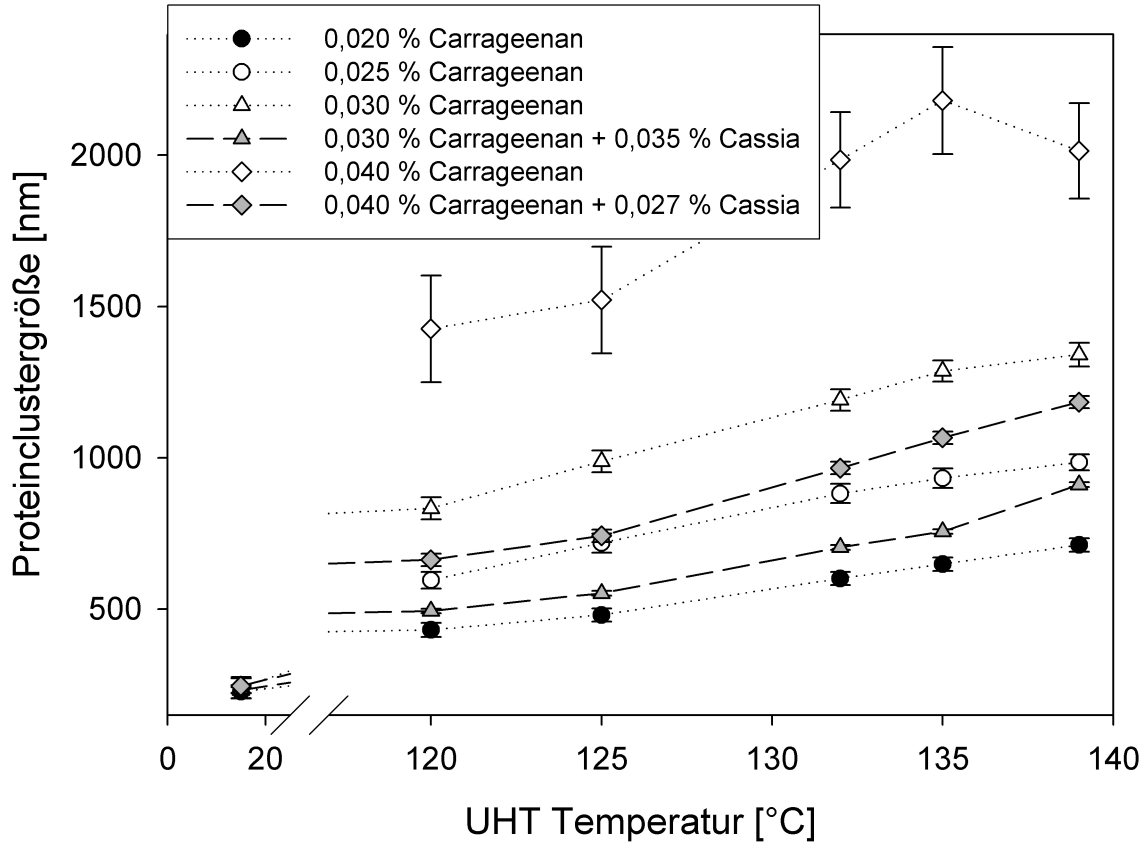

Abb. 5.47: Mittlere Proteinclustergröße von Milchmischsystemen mit Polysaccharidzusatz in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzung bei der Herstellung. Die Polysaccharidzusammensetzung ist in der Legende aufgelistet. Die Fehlerbalken zeigen das Signifikantsintervall nach Fisher (Fisher's LSD).

sich entsprechend in einer verminderten Kraft zur Mikrophasentrennung, da nun die Entropie nicht mehr durch Aneinanderlagerung von Proteineinheiten erhöht werden muss.

Diese Auswirkung einer Cassiazugabe spiegelt sich auch in den rheologischen Eigenschaften des zusammengesetzten schwachen Gelnetzwerks in diesen Biopolymermischungen wider. Abbildung 5.48 zeigt die Auswirkungen der Mischungszusammensetzung auf die Messung des elastischen Moduls über ein breites Frequenzspektrum. Dabei entspricht ein höherer Wert der Steigung von G' über der Frequenz einem niedrigeren Vernetzungsgrad, da das System dann mehr unabhängige Resonanzfrequenzen aufweist. Dies ist erwartungsgemäß der Fall bei einer niedrigen Carrageenanpackungsdichte wie z.B. bei Mischungen mit 0,020 % Carrageenan und 3,4 % Milchprotein. Es fällt auf, dass sich bei Systemen mit Cassiazugabe trotz der hohen Gesamtpolysaccharidmenge ebenfalls nur ein relativ niedriger Vernetzungsgrad findet.

Das Gesamtbild, welches sich im Vergleich der verschiedenen Mischungen mit und ohne Cassia ergibt, deutet an, dass die Stärke der Mikrophasenseparation bzw. die Proteinaggregation (Abb. 5.47) nicht nur durch die Carrageenangesamtmenge selbst bestimmt wird, sondern dass auch die Gesamtoberfläche der exponierten hydrophoben Gruppen ein entscheidender Faktor ist. Wie bekannt, sind hydrophobe Abschnitte der Polysaccharidgruppen aufgrund ihrer Grenzflächeneigenschaften nicht kompatibel mit einer Serumanordnung, die einen Austausch einzelner Wassermoleküle untereinander erlaubt. Damit wird die Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten bzw. die Entropie vermindert, da sich vor diesen hydrophoben Oberflächen die benachbarten Wassermoleküle in einem kristallin-ähnlichen Aufbau ausrichten und damit hochstrukturierte und unbewegliche Bereiche bilden (SINGH ET AL., 1998). Dementsprechend beeinflusst die hydrophobe Gesamtoberfläche auch die verfügbare Menge an freiem Wasser und Volumen, die den übrigen

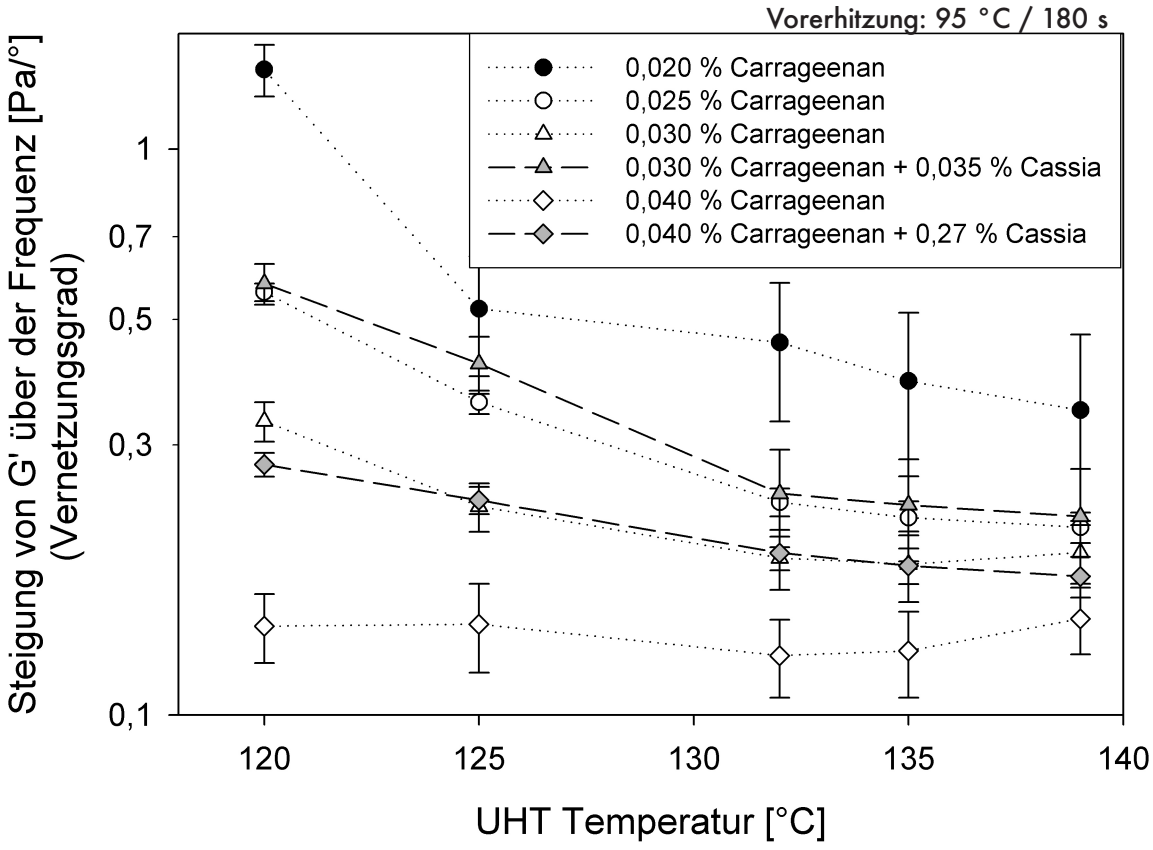

Abb. 5.48: Steigung des elastischen Anteils G‘ über der Messfrequenz als Interaktionsmaß in Milchmischsystemen mit Polysaccharidzusatz in Abhängigkeit von der UHT-Erhitzung bei der Herstellung.

Makromolekülen zur Verfügung steht. Das thermodynamische Verhalten von Biopolymermischungen ist daher davon bestimmt, eine Anordnung zu finden, in welcher die Verteilung der Mischungspartner wie auch der Serummoleküle im Sinne der thermodynamischen Gesetze optimiert ist. Die Zielgrößen sind damit die Minimierung der freien Enthalpie wie auch eine Maximierung der Entropie, also der Konformationsmöglichkeiten.

Bei den hier untersuchten Carrageenansystemen bedeutet dies konkret, dass bei einer Zugabe von Cassia eine großflächige Assoziation hydrophober Abschnitte beider Polysaccharide mit der Auflösung dieser wasserkristallähnlichen Bereiche im Serum eine große Anzahl an Wassermolekülen freisetzt. Dieser Abbau von kristallin-fixierten Hydrathüllenschichten hat zur Folge, dass sich die Beweglichkeit der Polysaccharidketten erhöht (Caram-Lelham et al., 1997; Singh et al., 1998). Aufgrund des deutlichen Entropieanstiegs wird daher in diesen Mischungen eine Anlagerung von Cassia an Carrageenanketten bevorzugt. Eine der Konsequenzen des Anstiegs flexibler Serummoleküle ist die Reduktion des Umfangs der Mikrophasentrennung, d.h. der Clusterbildung der Proteineinheiten (Abb.5.49).

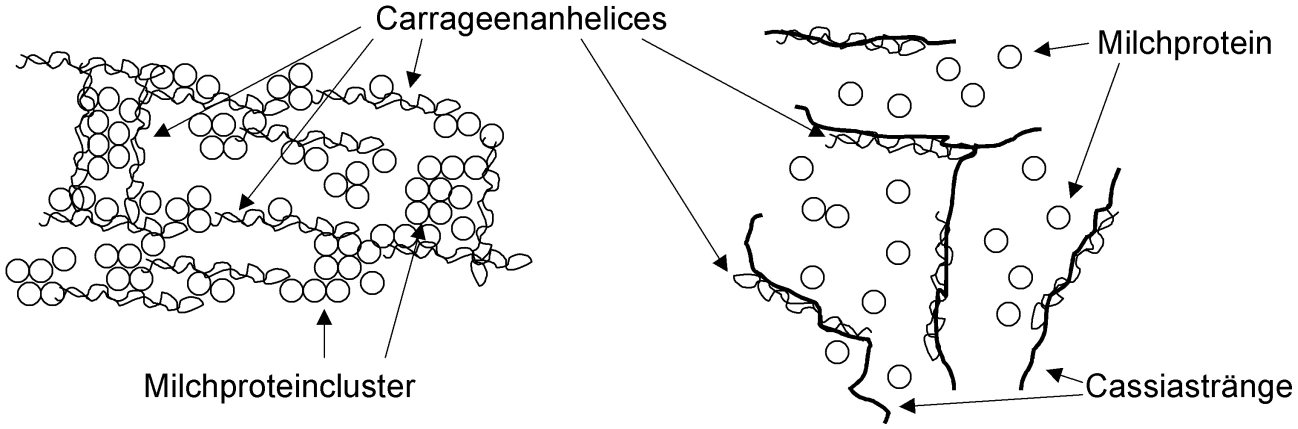

Abb. 5.49: Schematische Darstellung der Mikrostruktur zu den Auswirkungen einer Zugabe von Cassia zu Milchmisch-Carrageenansystemen.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit Cassiazusatz lässt sich das Gesamtbild der Auswirkungen verschiedener Prozessschritte folgendermaßen vervollständigen:

1.) Aufgrund der Auflösung innermolekularer Assoziationen von Carrageenan in der Coil-Form während der Erhitzungsschritte induziert der wachsende Bedarf nach Hydrathüllen eine Mikrophasentrennung und als Folge die Aggregation von Proteinclustern (Langendorff et al., 2000; Schorsch et al., 2000; Spagnuolo et al., 2005). Diese Proteincluster sind für eine verstärkte Wechselwirkung mit dem Polysaccharid in Helixform im Sinne eines kompatiblen Zusammenwirkens in einer gemeinsamen Netzwerkstruktur vorteilhaft.

2.) Aufbau und Mikrostruktur dieser Proteinmikrodomänen werden von den Erhitzungsbedingungen beeinflusst. Die Proteincluster bleiben gegenüber Homogenisationsdrücken bis 30 MPa in den nachfolgenden Prozessschritten stabil, solange die Coil-Helix-Übergangstemperatur nicht unterschritten wird, also bei 60 °C statt bei 10 °C homogenisiert wird. Unter diesen Bedingungen entstehen mikrophasenseparierte Proteinaggregate, die einen deutlich erkennbaren Beitrag zu den Textureigenschaften der Biopolymermischungen liefern.

3.) Der Grenzbereich zwischen mikrophasengetrennten Systemen, welche ein gemeinsames schwaches Netzwerk aufbauen, und einphasigen Mischungen wird bei einer Homogenisation bei 62 °C und Drücken von 40 MPa und höher überschritten. Bei solchen Prozessbedingungen hängt die Strukturstabilität nicht mehr entscheidend von den UHT-Bedingungen ab (SEDLMEYER ET AL., 2006b). Da aber grundsätzlich eine Abhängigkeit von der UHT-Erhitzung hauptsächlich mit einer Beteiligung von Proteinclustern in Verbindung gebracht wird, bedeutet eine intensive Homogenisation in erster Linie den Aufbruch der Proteincluster in kleinere Einheiten, welche die Fähigkeit zur Brückenbildung zwischen benachbarten Carrageenansträngen verloren haben.

4.) Zeigen unter hohen Homogenisationsdrücken hergestellte Carrageenan-Milchproteinmischungen am Strukturpunkt relativ niedrige Viskositätsunterschiede auf einem niedrigen Werteniveau, ist eine emulsionsähnliche Verteilung der tropfenähnlichen Proteincluster an den Carrageenanhelices gegeben.

5.) Eine Absenkung der Homogenisationstemperatur führt zu einer Minderung des Molekulargewichts des Polysaccharids, da die Steifigkeit von Carrageenan in der Helixform zunimmt und es daher durch Scherkraftspitzen stärker beeinträchtigt wird. Durch ein sinkendes Molekulargewicht reduziert sich der Einfluss von thermodynamischen Mechanismen (z.B. der Effekt des “excluded volume”) zur Phasentrennung. Dies wiederum spiegelt sich in einem ungenügenden Aufbau von Proteinclustern wider.

6.) Neben der Menge bzw. Kettenlängenverteilung des Polysaccharids erweist sich auch die exponierte hydrophobe Gesamtfläche aufgrund ihrer Auswirkungen auf Entropie und Lösungsmittelverteilung als bestimmender Faktor für die Mikrophasentrennung. Dies bestätigt sich im Vergleich von Systemen mit und ohne zusätzliche Zugabe von Cassia zu Carrageenan-Milchproteinmischungen. Hier setzt eine Minimierung der hydrophoben Gesamtoberfläche aufgrund der Zusammenlagerung der beiden Polysaccharide ein Serumvolumen frei, welches vorher in kristallin-ähnlichen Strukturen assoziiert war.

7.) Das Zusammenspiel thermodynamischer Kräfte beim Aufbau einer bestimmten Größe von mikrophasengetrennten Proteinclustern und die Wechselwirkung dieser Proteincluster mit Carrageenansträngen führen zu einer Verstärkung des zusammengesetzten Netzwerks, wie sie nicht mit einem inerten Füllmaterial erreicht werden kann. Konkret bedeutet dies, dass der Bedarf an Serummolekülen bei der vollständigen Hydratation von Polysacchariden die Aggregation von Proteinteilchen fördert. Dadurch erreichen die Proteineinheiten einen Umfang, der eine aktive Beteiligung beim Aufbau einer gemeinsamen Netzwerkstruktur ermöglicht. Die Anlagerung der Proteincluster an Carrageenanhelices basiert auf spezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen.

8.) Durch die zugrunde liegenden thermodynamischen Gesetze wird eine größtmögliche Auflösung der hochgeordneten fixierten Lösungsmittelaggregate an hydrophoben Oberflächen forciert, bevor sonstige mögliche Wechselwirkungen zwischen Sulphatgruppen des Carrageenans mit Milchproteinclustern eingegangen werden. Es liegt damit nahe, dass bei diesen Biopolymermischungen mit relativ niedriger Trockenmasse das thermodynamische Verhalten vorwiegend von einer Maximierung der Entropie bestimmt wird. Diese Maximierung ergibt sich durch die große Anzahl der freibeweglichen kleinen Lösungsmittelmoleküle.

5.1.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zu Carrageenan und Milchprotein

Nach Voruntersuchungen zur Abgrenzung von Bereichen im Phasendiagramm mit deutlichem Prozesseinfluss auf die Mischgeleigenschaften wurde für eine systematische Untersuchung gradueller Unterschiede in der Mikrostruktur von Biopolymermischungen mit micellaren Casein, Molkenproteinen und Polysacchariden als Bezugssystem folgendes Mischungssystem ausgewählt:

Basis: entrahmtes Rohmilchsystem mit 3,4 % Protein.

Hydrokolloidzusatz: 0,025 % nicht-standardisiertes Carrageenan von *Sarcothalia crispata*.

Eine Standardisierung mit Dextrose der bei dieser Arbeit verwendeten Pulvercharge erhöht den Massenanteil des Polysaccharidzusatzes entsprechend auf 0,04 %. Um Sekundäreffekte durch einen Dextrosezusatz sicher ausschließen zu können, wurden für die systematische Variation der Prozessparameter Mischungen mit unstandardisierten Carrageenan aus nur einer Produktcharge verwendet.

Nachfolgende Gründe sprechen dafür, dass bei diesem Beispielsystem deutliche Prozesseinflüsse zu erwarten waren:

1.) Werden als Basis für das thermodynamische Verhalten dieser komplexen Mischung Ergebnisse von Modellsystemen aus der Grundlagenforschung herangezogen, so liegt diese Biopolymerzusammensetzung im Grenzbereich von homogen-flüssigen zu instabilen Systemen (SCHORSCH ET AL., 2000).

2.) Prinzipiell ist eine Grundvoraussetzung für ein homogenes Erscheinungsbild und eine Langzeitstabilität bei diesen Biopolymermischungen die Integration aller Makromoleküle in einen selbsttragenden Verbund, wie z.B. in einer schwachen, aber durchgehenden Netzwerkstruktur.

3.) Bei Carrageenanmengen, die knapp unterhalb der Mindestkonzentration für den Aufbau einer kontinuierlichen Netzwerkstruktur im gegebenen Volumen liegen, ist eine Beteiligung von Proteinclustern als zusätzliche Verknüpfungspunkte zwischen Carrageenansträngen zwingend notwendig. Anderenfalls werden nur unzusammenhängende Polymergelflocken ausgebildet, mit der Folge von Sedimentation und Ausbildung sichtbarer Inhomogenitäten.

4.) Eine Integration beider Biopolymere über gegenseitige Brückenbindungen beruht bei entsprechenden Modellsystemen auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen Sulphatgruppen des Polysaccharids und positiven Partialladungsabschnitten auf der Caseinmicellenoberfläche (SNOEREN ET AL., 1975). Weiterhin sind für Milchproteinlösungen verschiedene prozessabhängige Modifikationen und Komplexierungsreaktionen an der Micellenoberfläche bekannt. Im Zusammenhang mit der tragenden Rolle der Proteinclusterbrücken für einen erfolgreichen Aufbau einer durchgehenden zusammengesetzten Netzwerkstruktur hat sich gezeigt, dass sich die bekannten prozessinduzierten Veränderungen des Proteinpartners auf seine aktive Rolle im Strukturaufbau der Biopolymermischung auswirken.

Auf dieser Basis wurden folgende Experimente konzipiert und durchgeführt:

Grundsätzliche Prüfung auf messbare Mischgelveränderungen aufgrund der Temperaturführung im Herstellungsprozess

In Experiment Nr. 1 (Kap.5.1.2) wurde festgestellt, dass eine Variation der Temperatur im UHT-Abschnitt und der Kühlungsendtemperatur sich deutlich auf rheologische Eigenschaften des Standardmischsystems auswirkt. Weiterhin wurde der Nachweis erbracht, dass das Verhalten von Mischungen mit nicht-standardisiertem Carrageenan grundsätzlich auch auf Systeme mit für industriellen Einsatz standardisiertem Carrageenan gleichen Typs übertragbar sind.

Detaillierte Erfassung des Einflusses der UHT-Temperatur auf die Mischsystemeigenschaften anhand ausgewählter Kennzahlen verschiedener, auch zerstörungsfreier, rheologischer Methoden.

Eine Abstufung der Carrageenankonzentration in 4 Stufen ermöglicht eine differenzierte Betrachtung gradueller Strukturunterschiede im zusammengesetzten Biopolymernetzwerk. Als Prozessparameter wird nach wie vor die UHT-Temperatur variiert, um die Ergebnisse aus den vorangegangen Experimenten als Interpretationsgrundlage verwenden zu können.

Hierzu zeigen die Ergebnisse von Experiment Nr. 2 (Kap.5.1.3), dass ein deutlicher Prozesseinfluss der UHT-Temperatur auf verschiedene rheologische Eigenschaften nur bei Mischungen im Grenzbereich zur Phasengrenze besteht (z.B. bei 0,025 % unstandardisiertes Carrageenan in Milchsystemen).

Dies stärkt die These, dass erhitzungsbedingte Modifikationen an Milchproteinen zu Beeinträchtigungen der Brückenfunktion von Proteinclustern in einer carrageenanhelicesbasierten Mischstruktur führen. Sichtbar wird dies jedoch nur bei Mischungen, bei denen der Aufbau eines durchgehenden Netzwerks von einer aktiven Beteiligung dieser Proteinclusterbrücken abhängt. Dies ist bei dem hier untersuchten Beispielsystem bei 3,4 % Proteingehalt bei einer Polysaccharidkonzentration von 0,025 % unstandardisierten Carrageenan bzw. 0,04 % standardisierten Carrageenan der Fall. Bestätigt wird die entscheidende Rolle der Proteincluster zur Verknüpfung von benachbarten Carrageenanhelices durch die Ergebnisse von Partikelgrößenmessungen. Das Ausmaß der Proteincluster steigt mit einer Erhöhung der UHT-Temperatur ab 132 °C exponentiell an. Diese Größenzunahme lässt sich auf erhitzungsbedingte Veränderungen der Caseinmicellen zurückführen. Beispielsweise fördert die Verschiebung des Calciumphosphatgleichgewichts calciumvermittelte Aggregationen in der Biopolymerstruktur.

Der Einsatz von nicht-standardisiertem, also reinem Carrageenan ohne Dextrosezusatz hat den Vorteil, dass die Polysaccharidmenge in der Mischung genau bekannt ist. Die Messergebnisse zeigen, dass bei 3,4 % Milchprotein nur im relativ schmalen Konzentrationsbereich von 0,025 bis 0,030 % unstandardisierten (dextrosefreien) Carrageenan eine prozessinduzierte Beteiligung der Proteincluster deutliche Auswirkung auf die Mischstruktureigenschaften hat. Eine Analyse der in zerstörungsfreien Messungen erfassten rheologischen Frequenzspektren der einzelnen Systeme mit unterschiedlichem Carrageenanzusatz bestätigt die vermuteten Auswirkungen des Prozessparameters UHT-Temperatur auf die Mikrostruktur des Biopolymermischsystems. Für einen erfolgreichen Aufbau einer durchgehenden dreidimensionalen Netzwerkstruktur sind Knickstellen in den zugrunde liegenden Carrageenanhelixbasiselementen notwendig, da damit die Wahrscheinlichkeit für erfolgreich geknüpfte Verbindungen in allen drei Dimensionen steigt und

nicht nur eine “collection of isolated chain pairs” vorliegt (REES, 1972).

Die Anzahl dieser Brückenpunkte kann durch eine Erhöhung der Carrageenankonzentration im Systemvolumen gesteigert werden. Eine höhere Einsatzmenge des Polysaccharids kann jedoch auch durch die prozessabhängige Proteinclustermodifikation ersetzt werden, da hier die Proteinbrücken die fehlende Anzahl an carrageenaneigenen Verzweigungen im Mischsystem ersetzen. Zudem werden damit beide Biopolymere aktiv in eine gemeinsame Struktur integriert, ein Vorteil, der bei stärker carrageenandominierten Systemen nicht vorliegt.

Variation der Vorerhitzung und Einfluss der Molkenproteinfraktion auf den Strukturaufbau

Mit einer zweistufigen Variation der Vorerhitzungsdauer wird die Rolle der Molkenproteine beim Strukturaufbau geprüft. Mit einer Temperatur von 95 °C kommt es in diesem Prozessschritt nur bei der Molkenproteinfraktion zu prozessabhängigen Veränderungen wie Auffaltung und Denaturierung dieser globulären Proteine. Da es bei dieser Temperatur zu keinen Caseinmodifikationen kommt und der Molkenproteindenaturierungsgrad von der Vorerhitzungsdauer abhängt, können Effekte durch diese Prozessparametervariation eindeutig dem Molkenproteinanteil zugerechnet werden.

Hierbei wird in Experiment Nr. 3 (Kap. 5.1.4) deutlich, dass ein höherer Denaturierungsgrad der Molkenproteine bei einer gemeinsamen Vorerhitzung aller Biopolymere die Strukturstabilität verstärkt, da die Caseineinheiten durch die Komplexbildung mit denaturierten Molkenproteinen vergrößert werden. Dieser prozessinduzierte Effekt erfolgt additiv zur UHT-temperaturabhängigen Verbesserung der Netzwerkbrückenfähigkeit der caseindominierten Proteincluster.

Aufgrund dieser Erkenntnis wird die Vorerhitzungsdauer genauer betrachtet und um eine weitere Stufe variiert. Folgende Fälle werden bei Mischungen gleicher Zusammensetzung untersucht:

a) Getrennte Vorerhitzung der Milchproteine

b) Gemeinsame Erhitzung von Milchproteinen und Carrageenan

Eine getrennte Vorerhitzung der Milchproteine ohne Carrageenan führt zu einer deutlichen Abnahme der Mischsystemstabilität (Exp.Nr. 4, Kap. 5.1.4). Dies zeigt deutlich das Vorliegen einer Konkurrenzsituation zwischen der elektrostatischen Wechselwirkung von Carrageenan mit der Caseinmicellenoberfläche und der Komplexbildung denaturierter Molkenproteine mit der Caseinfraktion. Die Ergebnisse einer zusätzlichen Verlängerung der Vorerhitzungszeit (=maximaler Molkenproteindenaturierungsgrad am Ende des Vorerhitzungsschritts) bestätigen, dass die Strukturveränderungen im UHT-Bereich auf Caseinmodifikationen zurückzuführen sind.

Variation der UHT-Bedingungen zur Berechnung der Aktivierungsenergie (Arrheniusauftragung)

Für ein vollständiges Bild der Auswirkung von UHT-Bedingungen auf die Proteinclusterbrückenbindungen in der zusammengesetzten Netzwerkstruktur wird additiv zur Höhe der UHT-Temperatur auch die Heißhaltezeit des UHT-Abschnitts schrittweise erhöht.

In Experiment Nr. 5 (Kap. 5.1.5) ergibt sich aus der Arrheniusauftragung der Versuchsdaten eine Aktivierungsenergie in einem Bereich, der auf eine starke Beteiligung von im Serum induzierten Dipolstrukturen hinweist. Damit wird ein multifaktorieller Mechanismus des prozessinduzierten Betrags zum Strukturaufbau deutlich.

Verschiebungen im Calciumphosphatgleichgewicht führen zu einer Veränderung der micellaren Struktur der Caseine. Dies beinhaltet eine Veränderung der hydrophoben Gesamtoberfläche. In der Mischung verursachen diese Oberflächenänderungen aufgrund der thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten Umstrukturierungen in der Anordnung der Inhaltsstoffe. Dabei kommt es vor allem zu Änderungen in der Serumstruktur. Diese Neuanordnung der Wasserdipole ist sehr ausschlaggebend für das thermodynamische Verhalten der Biopolymermischung, da der Serumanteil bei Mischungen mit geringer Trockenmasse aufgrund der hohen Anzahl kleiner Lösungsmittelteilchen die Entropie stark beeinflusst.

Auswirkungen von Scherkräften auf die Carrageenan-Milchproteinmischstruktur

Nachdem die tragende Rolle der erhitzungsinduzierten Proteinclusterbrücken für den Aufbau eines durchgehenden schwachen Netzwerks deutlich wurde, werden als zusätzliche prozessabhängige Faktoren die Auswirkungen von Scherkräften während der Herstellung der Mischsysteme untersucht. Dies erfolgt durch eine Homogenisierung mit verschiedenen Druckstufen und Temperaturen nach der UHT-Erhitzung der Mischung.

Der deutliche Einbruch der Mischstrukturstabilität bei einer Homogenisation mit Drücken über 30 MPa bei 62 °C lässt sich auf den Verlust der Brückenbildungsfähigkeit der Proteincluster zurückführen (Experiment Nr. 6; Kap. 5.1.6). Für diese Funktion benötigen die Proteincluster eine Mindestgröße, die aber bei hohen Scherkräften verloren geht. Zwar wird dieser Durchmesser auch bei geeigneten UHT-Temperaturen erreicht, die dabei entstandenen Aggregate sind jedoch nur bis zu einem gewissen Grad scherstabil.

Eine höhere Scherstabilität besitzt Carrageenan, wenn es in flexiblen Knäuelstrukturen vorliegt, wie es bei einer Homogenisationstemperatur von 62 °C der Fall ist. Bei Temperaturen unterhalb von 35 °C erfolgt jedoch eine Konformationsänderung des Polysaccharids zu steifen Helices, die weniger scherstabil sind (Wang et al., 2005).

In Experiment Nr. 7 zeigt sich, dass eine Homogenisierung unterhalb der Konformationsänderungstemperatur des Carrageenans bereits bei niedrigen Homogenisationsdrücken zu einem Verlust der Netzwerkstruktur führt. Aus dem dabei messbaren Verlust der Rekonstitutionsfähigkeit der Mischstruktur nach geringen Scherbelastungen ergibt sich die Frage, ob nicht nur die Proteincluster durch die kalte Homogenisierung irreversibel geschädigt sind, sondern auch die Polysaccharidstränge selbst.

Aus diesem Grund wurden Versuche unter Druck- und Homogenisationstemperaturvariation an carrageenandominierten Mischungen mit höherer Packungsdichte durchgeführt, da in diesen Systemen das Polysaccharid durch Scherkräfte stärker beansprucht wird.

In diesem Fall kann Carrageenan Scherkräfte nicht mehr durch flexible Umformungen ausgleichen (Experiment Nr. 8; Kap. 5.1.6). Bei einer Homogenisation bei 10 °C ist die Folge eine deutliche Veränderung der Molekulargewichtsverteilung des Polysaccharids, mit dem Verlust der Fähigkeit zum Aufbau einer Mischgelstruktur.

Da sich die Veränderungen der Molekulargewichtsverteilung nur indirekt über die Änderungen in der Mikrophasenseparation und damit in den Partikelclustergrößen zeigen lassen, ist zur Bestätigung dieses Gesamtbilds eine Gegenüberstellung der Rolle von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen nötig. Denn die o.g. Schlußfolgerungen basieren auf der These, dass

hydrophobe Oberflächen die Mikrophasenseparation und damit die Clusterbildung verstärken. Zu prüfen war in diesem Zusammenhang jedoch noch, ob die starken elektrostatischen Wechselwirkungen der Sulphatgruppen nicht die Hauptrolle in der Biopolymerinteraktion spielen.

Durch einen Cassiazusatz modifzierte Biopolymermischungen machen deutlich, dass die Minimierung der hydrophoben Gesamtoberfläche eine Priorität vor der spezifischen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Caseinmicellen und Sulphatgruppen des Carrageenans besitzt (Experiment Nr. 9; Kap. 5.1.6). Werden die hydrophoben Abschnitte der Carrageenanketten durch alternative Biopolymermischungsinhaltsstoffe gegenüber der Kontaktfläche des umgebenden Serums abgeschirmt, so wird die Mikrophasenseparation stark vermindert. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass in wässrigen Biopolymermischungen, wie in den hier untersuchten Systemen, die Anordnung der Serummoleküle als dominierender Bestandteil der Matrix die Hauptrolle für das thermodynamische Verhalten des Gesamtsystems spielt. Das Serum wird in diesem Fall jedoch weniger von spezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren beeinflusst als durch deren Interaktionsflächen mit dem Serum.

Als Gesamtbild wird aus den verschiedenen Versuchen deutlich, dass mit der Variation einzelner Prozessparameter verschiedene Werkzeuge zur Feinabstimmung von Textureigenschaften von Mischungen an einem Phasenübergang zur Verfügung stehen, die sich aber auch als Störfaktoren bei falscher Wahl der Bedingungen erweisen können. Im ausgewählten Standardbeispielsystem führt eine Beteiligung der Milchproteincluster durch ihre Funktionalität als zusätzliche Brücken zwischen benachbarten Carrageenanhelices zu einem durchgehenden Netzwerk. Diese Funktionalität kann durch Auswahl der Erhitzungsbedingungen gefördert wie auch reguliert werden. Dabei müssen die einzelnen prozessparameterabhängigen Effekte jedoch immer im Zusammenhang mit den übrigen Prozessbedingungen gesehen werden. Am Beispiel der Homogenisationsbedingungen wird deutlich, inwieweit Strukturen, die in einem Prozessschritt aufgebaut werden, durch unvorteilhafte Bedingungen im nächsten Herstellungsabschnitt wieder beeinträchtigt werden können.

Die Kenntnis der einzelnen prozessabhängigen Effekte ermöglicht eine optimale Anpassung der Mischungszusammensetzung zum Aufbau einer durchgehenden, über das ganze Volumen homogenen Struktur.

Abbildung 5.50 gibt eine Übersicht über die Verschiebung der rheologisch erfassbaren Phasengrenze zwischen unzusammenhängenden Mischgelflocken ($\delta>45°$) und einer durchgehenden schwachen Netzwerkstruktur ($\delta<45°$). Eingangsgrößen sind dabei die Konzentrationen der beiden Biopolymere, die das Mischungsverhältnis bestimmen. Als Prozessparameter ist die UHT-Temperatur aufgetragen, oberhalb der Linien befindet sich jeweils das stabile Gebiet mit abnehmendem δ. Da jede Linie die gleiche Mindestbedingung für eine homogene Langzeitstabilität repräsentiert ($\delta=45°$), zeigen die Untersuchungen am ersten Beispielsystem deutlich die wichtige Rolle der Herstellungsbedingungen bei Mischungen im Phasengrenzbereich. Die Auswahl geeigneter Prozessparameter ermöglicht damit, Anpassungen in der Zusammensetzung von Biopolymersystemen bei gleichbleibenden Textureigenschaften vorzunehmen. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 5.50 mit einem gestrichelten Pfeil verdeutlicht: Geht man von einem bekannten Proteingehalt wie z.B. 3,3 % einer milchbasierten Mischung aus, so ermöglichen die hier vorgeleg-

ten Untersuchungsergebnisse, nach Auswahl des realisierbaren Prozessparameters die notwendige Carrageenanmenge abzuschätzen. Der eingezeichnete gestrichelte Pfeil ergibt für das Beispiel mit einem Proteingehalt von 3,3 % bei einer Erhitzung von 132 °C eine Mindesteinsatzmenge von 0,023 % Carrageenan für eine durchgehende Netzwerkstruktur (Abb. 5.50).

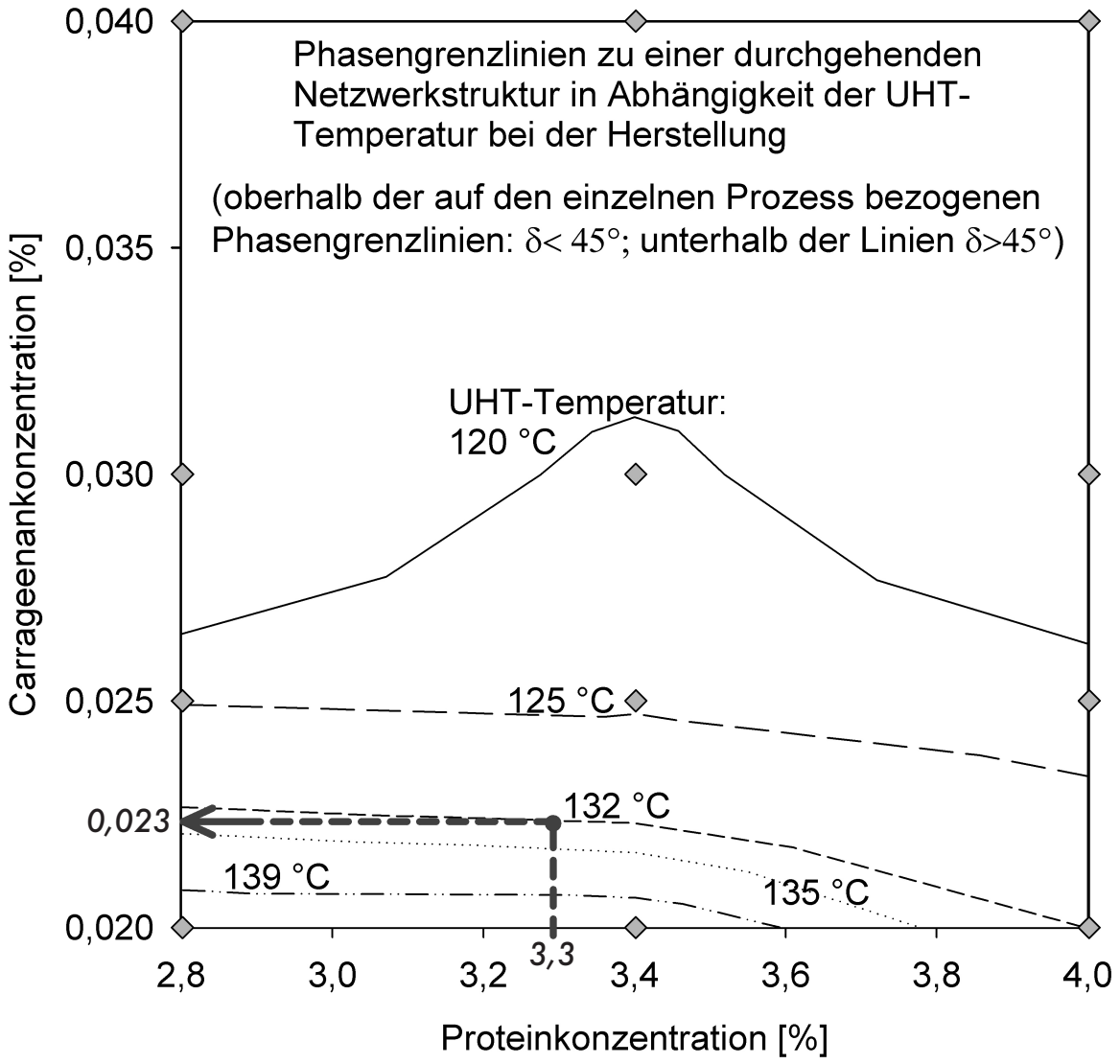

Abb. 5.50: Grenzlinie zu einer rheologisch erfassbaren durchgehenden schwachen Netzwerkstruktur in Abhängigkeit von Mischgelzusammensetzung & UHT-Temperatur. Die Linien wurden mit Sigmaplot interpoliert (mod. nach SEDLMEYER ET AL., 2007).

5.2 Pektin-Milchproteinmischung im sauren pH-Bereich

5.2.1 Vorüberlegungen und Auswahl des Beispielsystems

Aufgrund der deutlichen Änderungen, welche die Caseinmicelle bei sinkenden pH-Werten erfährt, wird als zweites Beispielsystem eine Polysaccharid-Milchproteinmischung unterhalb des isoelektrischen Punkts (IEP) der Caseine gewählt. Casein weist bei pH-Werten unter 4,6 eine positive Gesamtladung auf. Damit stehen die Proteinpartikel grundsätzlich für den Ladungsausgleich von negativ geladenen Seitengruppen anderer Biopolymere zur Verfügung.

Neben den bereits von Carrageenan her bekannten Sulphatgruppen sind hier auch Carboxylgruppen zu nennen, wie sie z.B. im Pektinmakromolekül vorkommen. Da die Carboxylgruppe im Vergleich zu Sulphatgruppen eine etwas geringere Elektronegativität aufweist, sind auch die Kräfte zur Komplexbildung etwas schwächer. In gesäuerten Mischungen von hochverestertem Pektin mit Milchprotein läßt sich durch Erwärmung und Pektinüberschuß eine Gleichgewichtsreaktion hin zum Aufbau von elektrostatischen Komplexen aus beiden Biopolymeren verschieben. Dieser Grundbaustein aus einer kugelförmigen Proteineinheit, von der sich Polysaccharidstränge verzweigen, zeigt im Aufbau eine gewisse Analogie zu dem vorangegangenen Carrageenan-Milchprotein-Beispielsystem. In dem jetzt betrachteten System fügen sich diese Einheiten abhängig von Mischungsverhältnis und Prozessbedingungen zu einem schwachen, gemischten Netzwerk zusammen (Abb. 5.51).

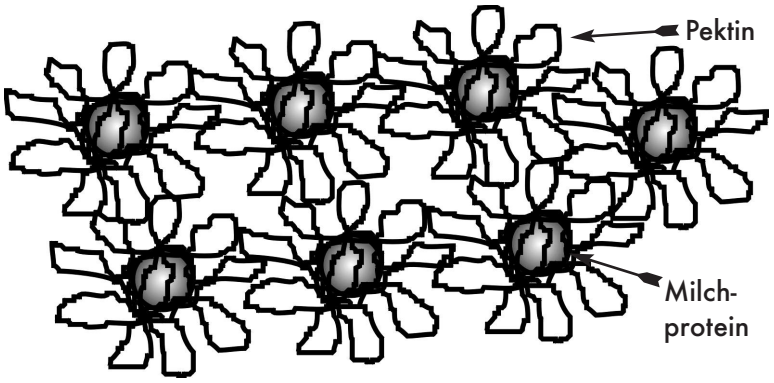

Abb. 5.51: Schematische Darstellung des Netzwerkaufbaus des gesäuerten Mischsystems (modifiziert nach DICKINSON, 1998).

Im sauren pH-Bereich findet sich so ein analoger Aufbau zu einer schwachen, durchgehenden Struktur bei dem gewählten Pektin-Milchproteinsystem. Hier setzt sich der Stabilisierungsmechanismus aus zwei Stufen zusammen. Zunächst verhindert die elektrostatische Assoziation von Pektin an die Proteinpartikel eine Aggregation zu Caseinpartikelaggregaten, was eine Destabilisierung und Entmischung des Milchproteinsystems bewirken würde. Die erste Stufe des Stabilisierungsmechanismus beruht auf abstehenden, schlaufenförmigen Abschnitten des größtenteils elektrostatisch an der Oberfläche adsorbierten Pektins (Abb. 5.52). Sie bewirken eine sterische Verhinderung des Aufbaus zu großer Proteinpartikelaggregate.

Die Protein-Pektin-Partikel befinden sich zunächst als unabhängige Einheiten in Schwebe. Ohne weitere Verbindung untereinander würden diese mit längerer Lagerdauer aufgrund der Schwerkraft herabsinken, so dass ein Dichteunterschied in der Mischung deutlich sichtbar wird. Dieses Entmischungsphänomen wird nun durch die zweite Stufe des Stabilisierungsmechanismus verhin-

dert. Verantwortlich dafür sind hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den abstehenden Pektinschlaufen der Pektin-Milchprotein-Komplexe (Abb 5.53). Damit entsteht ein durchgehendes, schwaches Netzwerk, welches ähnlich wie im ersten Beispielsystem aus einem Zusammenspiel von Proteinpartikeln und Polysaccharidsträngen aufgebaut ist.

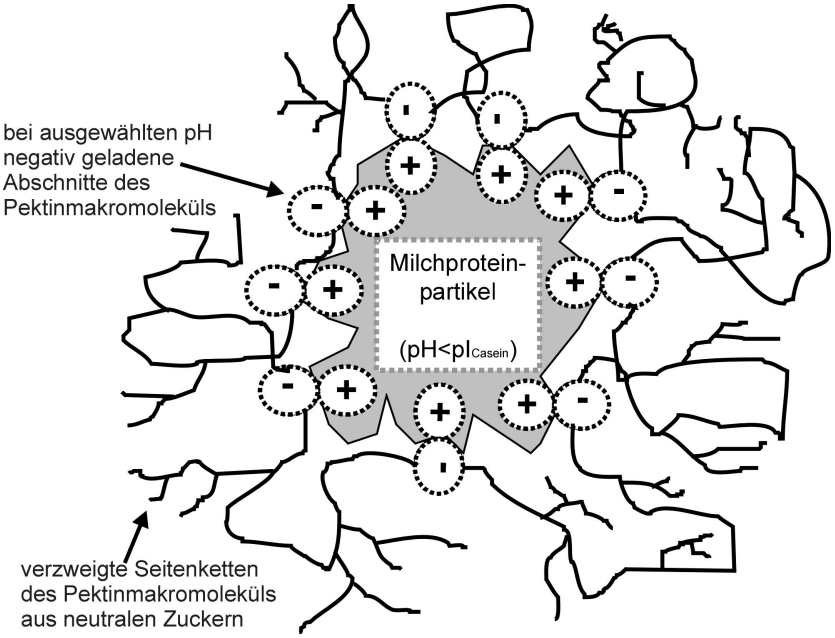

Abb. 5.52: Elektrostatische Wechselwirkung als erste Stufe des Stabilisierungsmechanismus.

Der Stabilisierungsmechanismus beruht auch hier auf verschiedenen Biopolymerinteraktionen, wie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen oder auch Wasserstoffbrückenbindungen. Wie erwähnt, weisen Carboxylgruppen jedoch eine geringere Elektronegativität im Vergleich zu Sulphatgruppen in Carrageenan auf. Dementsprechend fällt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Pektin und Casein etwas geringer aus und ist damit stärker vom pH-Wert abhängig. Auch beruht der Aufbau des Polysaccharidstrangnetzwerks nicht auf ionenstabilisierten Doppelhelices, sondern auf schwächeren hydrophoben bzw. durch Wasserstoffbrückenbindungen gestützten Wechselwirkungen der Pektinketten. Eine gewisse zusätzliche Stabilisierung im Strangnetzwerk liegt durch die Anlagerung von niedermolekularen Kohlenhydraten an diese Verknüpfungspunkte vor.

Praktische Anwendung findet die Beimischung von hochverestertem Pektin bei verschiedenen

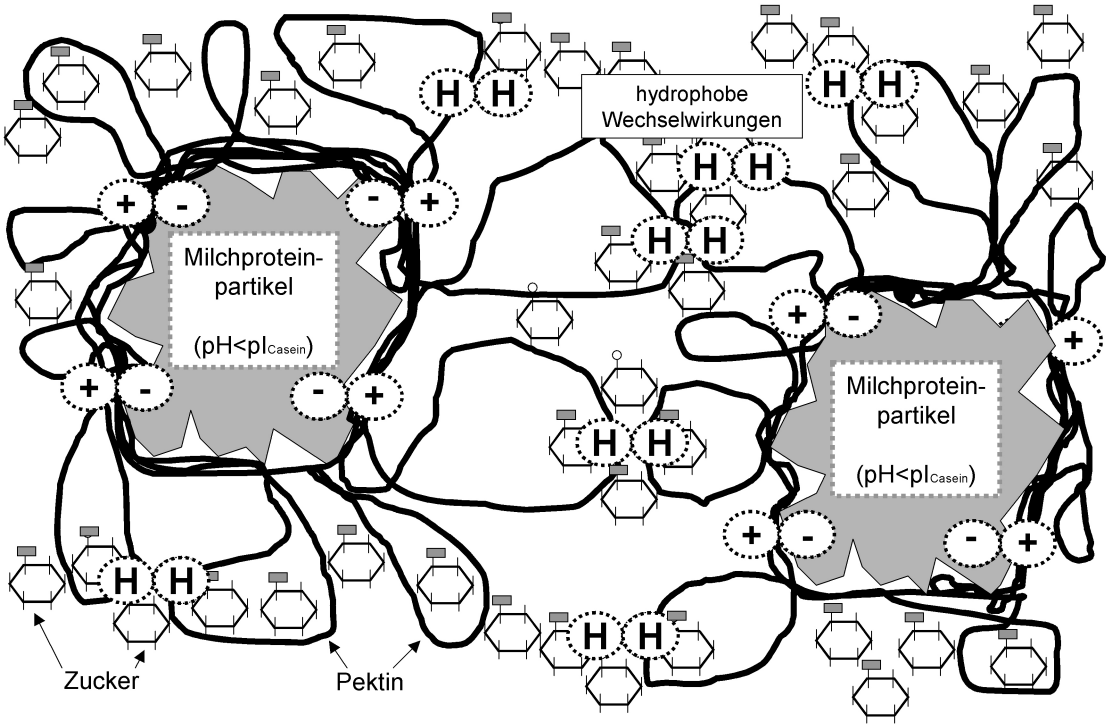

Abb. 5.53: Schematische Darstellung des zweistufigen Stabilisierungsmechanismus in gesäuerten Milchproteinsystemen mit Pektinzusatz.

gesäuerten Milchgetränken, wie beispielsweise Trinkjoghurts oder Mischungen von Molke, Frucht und Milchproteinen. Im Vergleich zu dem bereits untersuchten Carrageenan-Proteinsystem ergeben sich dabei aufgrund der Unterschiede im Produktsystem bei niedrigerem pH-Wert signifikante Differenzen in der Funktionalität in einem Pektin-Proteinsystem. Andererseits legen Ähnlichkeiten im Aufbau nahe, dass auch übertragbare Erkenntnisse bzw. prozessinduzierte Effekte zwischen beiden Polymersystemen bestehen. Eine gewisse Übertragbarkeit in Aufbau und zugrundeliegenden Wechselwirkungen macht damit die Mischung aus hochverestertem Pektin und Milchproteinen als zweiten Untersuchungsgegenstand geeignet. Der zweistufige Stabilisierungsmechanismus in Abhängigkeit von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen und die Natur der gemischten schwachen Netzwerkstruktur lassen einen Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Mischsystemeigenschaften erwarten.

5.2.2 Einfluss von Scherkräften auf Pektin-Milchprotein-Mischsysteme

Bei einer industriellen Anwendung von hochverestertem Pektin zur Stabilisierung von sauren Milchproteinsystemen sind üblicherweise zwei Prozessschritte erforderlich, eine Homogenisierung für eine intensive Vermischung beider Biopolymere und eine nachfolgende Erhitzung, mit der die Komplexbildung induziert und fixiert wird (GLAHN, 1982; PARKER ET AL. 1997; BAKE, 2003; BOULENGUER ET AL., 2003). Der Grund für dieses Vorgehen liegt in der Bildung eines Koagulums durch das Casein bei pH-Werten, die den IEP dieser Proteinfraktion entsprechen. Dieses Koagulum muss durch die Homogenisierung für die Wechselwirkung mit den Pektinmolekülen vorbereitet werden. Die Pektinstränge können dann nach der Zerkleinerung dieser Proteinmatrix in Proteinpartikel deren kolloidale Stabilisierung übernehmen. Da in der Homogenisierung die Voraussetzungen für die spätere Ausbildung des elektrostatischen Biopolymerkomplexes geschaffen werden, wird in einem ersten Schritt der Einfluss des Homogenisationsdrucks als Schlüsselparameter in diesem Prozessschritt untersucht.

Für eine erfolgreiche Stabilisierung der Proteinpartikel ist ein bestimmtes Verhältnis zwischen Proteingesamtoberfläche und Pektinmenge ausschlaggebend. Ist dieses Verhältnis zu groß, reicht die Pektinmenge nicht mehr zur vollständigen Bedeckung aller Proteinpartikel aus. Die Folge ist eine teilweise Anlagerung von Pektinsträngen an mehreren Proteinpartikeln gleichzeitig. Diese Brückenfunktion ("bridging") des Polysaccharids führt zu Aggregatflocken und in letzter Konsequenz zu einem zur Entmischung neigenden, instabilen System. Als besonders kritisch wird eine Pektinmenge angesehen, welche nur 50 % der Proteinpartikel bedecken kann, da in diesen Systemen im Vergleich zu anderen Mischungsverhältnissen beider Biopolymere der maximale Partikelgrößenanstieg verzeichnet wird (MAROZIENE ET AL., 2000). Prozesstechnisch lässt sich die zu bedeckende Proteinpartikelgesamtoberfläche durch eine Homogenisation am Prozessanfang beeinflussen. Die Auswirkungen von hohen Scherkräften während des Homogenisationsschritts werden bisher widersprüchlich bewertet. So zeigte bei einer Untersuchung von gesäuerten Milchprotein-Pektinsystemen ein Homogenisationsdruck zwischen 10 bis 20 MPa keine nennenswerte Auswirkung auf die Mischungseigenschaften (LESKAUSKAITE ET AL., 1998). Andere Autoren weisen jedoch auf die Auswirkungen von hohen Drücken auf die Proteinpartikelgrößenverteilung in Milchsystemen hin und postulieren bei hohen Druckstufen einen steigenden Pektinbedarf aufgrund des steigenden Anteils kleiner Proteinpartikel (GLAHN, 1982; RENNER, 1982). Für ein detailliertes Bild des Zusammenspiels von Milchproteinen und Pektin wird daher im folgenden Experiment die Auswirkung des Homogenisationsdrucks auf Mischungen verschiedener Zusammensetzungen untersucht.

Eine gleichzeitige Variation der Mischsystemzusammensetzung und des Homogenisationsdrucks beantwortet die Frage, inwieweit sich die Auswirkungen von verschiedenen Mischungsverhältnissen einerseits und prozessbedingte Modifikationen der Gesamtoberfläche der Proteinpartikel anderseits entsprechen. Aus der Verarbeitung von fetthaltigen Milchprodukten ist bekannt, dass ein steigender Anteil kleiner (Milchfett-)Partikel sich grundsätzlich positiv auf die Lagerstabilität auswirkt, da die Entmischungsgeschwindigkeit in diesen Systemen quadratisch von

der Partikelgröße abhängt (Kombination der Ansätze von Archimedes und Stokes). Beispielsweise wird durch eine Homogenisierung der Fettkügelchen auf Durchmesser kleiner als 700 nm eine Entmischung der Vollmilch während der Lagerung verhindert (KESSLER, 1996). Die Sensorik (Mundgefühl) der hier untersuchten Mischungen von gesäuerter Magermilch und Pektin entspricht abhängig vom Proteingehalt in etwa Produkten von Vollmilch bis Kaffeesahne. Die Dichte der Proteinpartikel ist jedoch im Vergleich zu dem o.g. Beispiel mit Milchfettkügelchen höher, so dass mit einem Absinken der Milchproteinpartikel innerhalb der Zeitspanne bis zur Ausbildung einer schwachen netzwerkähnlichen Ruhestruktur gerechnet werden muss. Bis zu diesem Zeitpunkt können grundlegende physikalische Gesetzmässigkeiten, wie Schwer- und Auftriebskraft als treibende Kräfte des Archimedischen Prinzips und die Gleichung von Stokes zur Beschreibung der inneren Reibungskräfte im Fluid, eine Hilfestellung zur Abschätzung des Systemverhaltens geben (HAMMER ET AL., 1988). Denn die Abläufe bis zur Integration der Proteinpartikel in ein schwaches Gelnetzwerk sind ausschlaggebend im zweistufigen Stabilisierungsmechanismus von gesäuerten Milchprotein-Pektinsystemen, um ein lagerbeständiges, homogenes Biopolymersystem zu erreichen. Entsprechend kann die These vertreten werden, dass nur bei einer mehr als ausreichenden Pektinmenge eine prozessinduzierte Steigerung des Feinpartikelanteils erhalten bleibt. Nur bei einem (auf die Proteingesamtoberfläche bezogenen) Überschuss an Pektin ist genügend Stabilisationsvermögen vorhanden, um eine Reassoziierung von zerscherten Proteinpartikeln zu größeren Aggregaten zu verhindern.

Abbildung 5.54 zeigt das Prozessschema und die Variablen des folgenden Experiments. Nach Vorerhitzung zur Denaturierung der Molkenproteine und der Bildung von entsprechenden Komplexen mit Caseinmicellen wird das Milchsystem auf einen pH-Wert von 4,0 gesäuert und mit verschiedenen Pektin-Zucker-Ansätzen vermischt. Es werden drei unterschiedliche

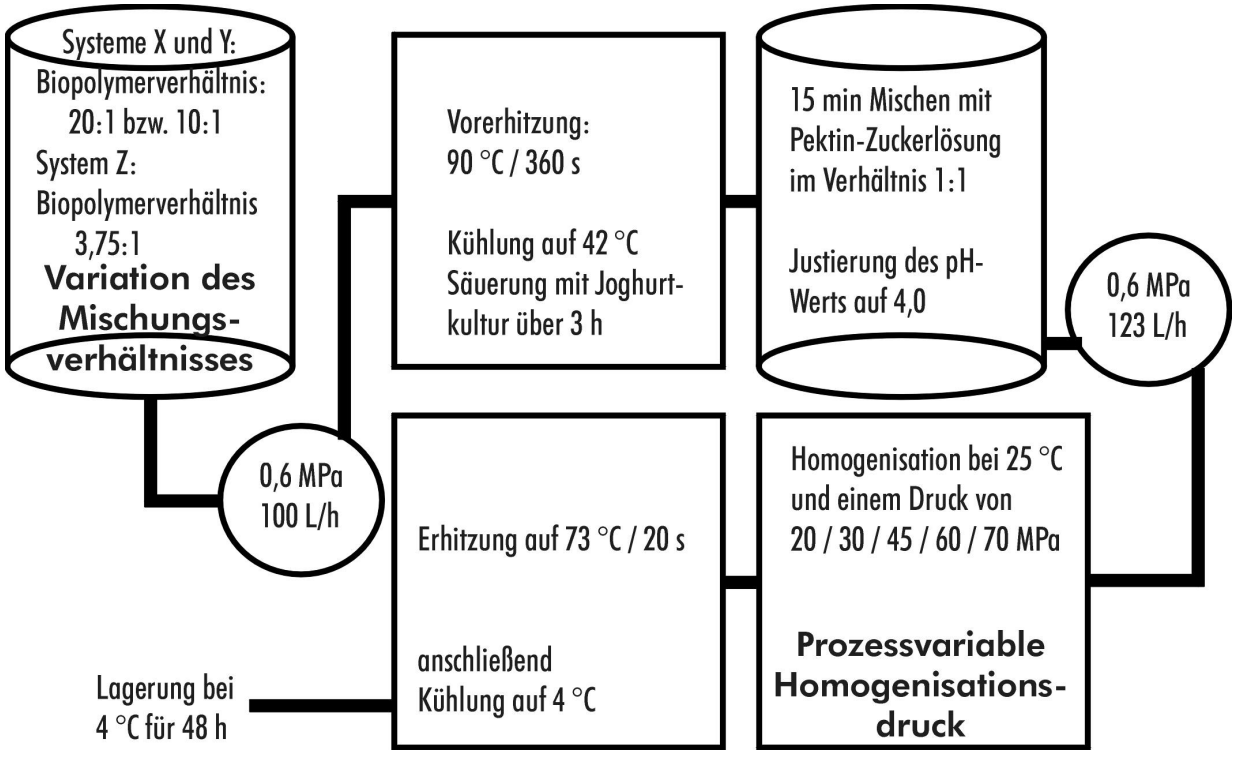

Abb. 5.54: Prozessschema zur Herstellung von gesäuerten Milchproteinsystemen mit Pektinzusatz. In Experiment Nr.10 werden der Homogenisationsdruck und das Biopolymerverhältnis variiert.

Mischungsverhältnisse von Milchprotein zu Pektin untersucht:

System X: 3,2 % Milchprotein + 0,16 % Pektin (Biopolymerverhältnis 20:1)
System Y: 3,2 % Milchprotein + 0,32 % Pektin (Biopolymerverhältnis 10:1)
System Z: 1,2 % Milchprotein + 0,32 % Pektin (Biopolymerverhältnis 3,75:1)

Die Mischungen werden bei fünf Druckstufen (20, 30, 45, 60, 70 MPa) bei 25 °C homogenisiert. Anschließend durchlaufen sie die finale Erhitzungsstufe (73 °C für 20 s) und werden abschließend auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt und gelagert.

Abbildung 5.55 zeigt die Auswirkungen des Prozessparameters Homogenisationsdruck auf die Partikelclustergröße der drei Biopolymersysteme. Die Mischung mit dem am weitesten auseinanderliegenden Milchprotein-Pektin-Verhältnis (System X) zeigt gegenüber den übrigen Systemen Y und Z eine deutlich höhere Clustergröße. Offenbar ist hier die Pektinmenge insgesamt zu knapp, so dass nicht einmal die relativ niedrige Proteinpartikelgesamtoberfläche bei niedrigen Homogenisationsdrücken stabilisiert werden kann (Abb. 5.55; System X). Ein steigender Homogenisationsdruck führt zu einem weiteren Anstieg des Durchmessers von nicht stabilisierten Partikelaggregaten. Die Systeme Y und Z zeigen bei niedrigen Homogenisationsdrücken im Bereich von 20 MPa untereinander eine ähnliche Clustergröße, die in etwa 1/4 des Werts von System X entspricht.

Ein steigender Homogenisationsdruck führt jedoch bei den Mischungen X und Z zu unterschiedlichen Entwicklungen. Während das Protein:Pektin-Verhältnis bei X noch bei 10:1 liegt, ist bei

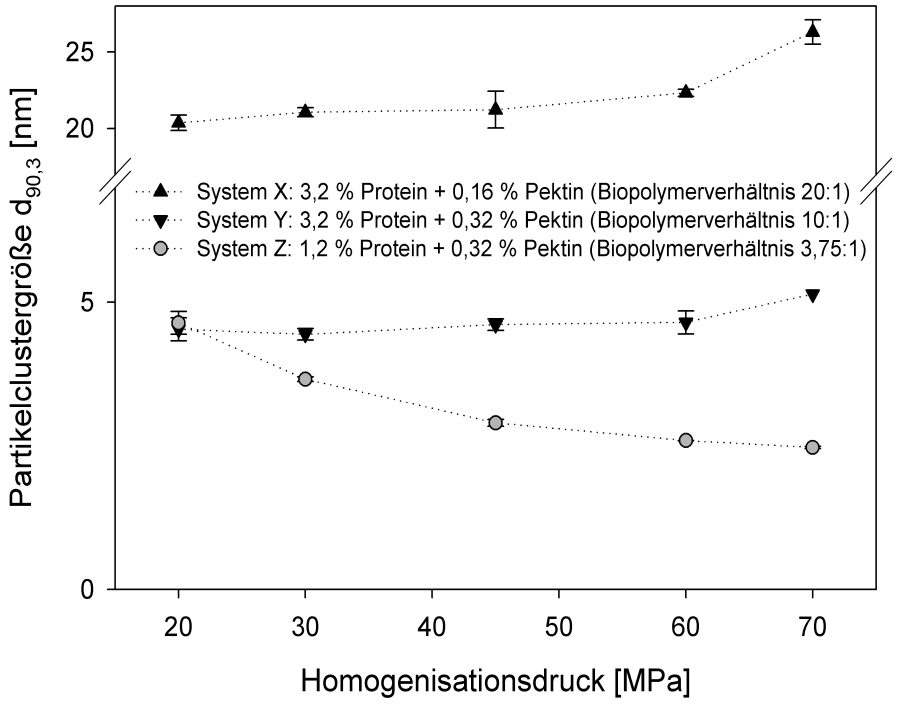

Abb. 5.55: Partikelclustergrößen von gesäuerten Milchprotein-Pektinmischungen mit verschiedenen Biopolymerverhältnissen in Abhängigkeit des Homogenisationsdrucks. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

System Z mit einem Biopolymerverhältnis von 3,75:1 eine in der Relation deutlich höhere Pektinmenge zur Stabilisierung der Proteinpartikel vorhanden. Dies spiegelt sich auch in der Auswirkung einer intensiveren Homogenisation wider. Die starken Scherkräfte bei hohen Druckstufen bewirken eine deutlich höhere Anzahl an kleinen Partikeln. Entsprechend verschiebt dieser Anstieg der Feinpartikelfraktion die Proteinpartikelgrößenverteilung und die Gesamtproteinpartikeloberfläche. Damit steigt jedoch die zu stabilisierende Proteingesamtoberfläche exponentiell.

Der Homogenisationsdruck bestimmt damit die Proteinpartikelgrößenverteilung und die vom Pektin zu bedeckende Gesamtoberfläche. Die Reaggregierung dieser Feinpartikelfraktion zu destabilisierenden Clustern kann in Mischung Y bei einer Herstellung mit hohen Homogenisationsdrücken noch weitgehend, aber nicht mehr vollständig verhindert werden. Dagegen wird sie bei einem deutlichen Überschuß von Pektin, wie er in System Z gegeben ist, verhindert. Die prozessbedingt niedrigen Clustergrößen bleiben erhalten und wirken sich positiv auf die Stabilität der Biopolymermischung aus, wie sowohl der niedrigere Anteil abzentrifugierbaren Sediments wie auch die sinkende Sedimentationsgeschwindigkeit verdeutlichen (Abb. 5.56).

Die Ergebnisse stützen die These, dass nur bei einem (auf die Proteinoberfläche bezogenenen) Pektinüberschuss eine prozessinduzierte Steigerung des Feinpartikelanteils erhalten bleibt. Es muß also eine ausreichende Pektinmenge in der Mischung vorhanden sein, um eine Reassoziierung von zerscherrten Proteinpartikeln zu größeren Aggregaten zu verhindern. Dies ist bei System Z mit einem Verhältnis von 3,75:1 im gewünschten Sinn gegeben.

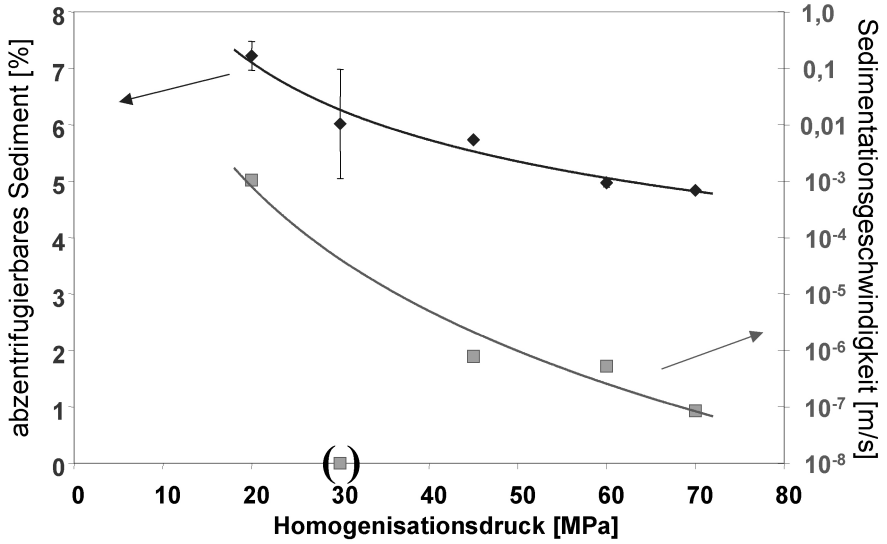

Abb. 5.56: Abzentrifugierbares Serum und Sedimentationsgeschwindigkeit von System Z in Abhängigkeit des Homogenisationsdrucks. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5.2.3 Einfluss der Kombination von Scherkräften und minoren Komponenten

Wie gezeigt, liegt System Y damit an der Grenze zu instabilen Systemen, da bei einer Protein-Pektinrelation von 10:1 kaum Pektinreserven vorhanden sind. Die Proteingesamtoberfläche, welche durch eine Homogenisation bei 20 MPa geschaffen wird, kann gerade noch erfolgreich stabilisiert werden. Daher ist in diesem Fall zu erwarten, dass hier schon relativ geringe Änderungen in der Mischungszusammensetzung deutliche Auswirkungen zeigen.

Abbildung 5.57 führt als Beispiel für dieses Überschreiten der Stabilitätsgrenze die Auswirkungen der Erhöhung der Serumionenkonzentration bei System Y an. Diese Zugabe von minoren Komponenten bedeutet zwar nicht hohe Änderungen bei Massenanteilen. Die Auswirkung dieser Maßnahme auf die abzentrifugierbare Sedimentmenge ist jedoch deutlich. Realisiert wurde die Erhöhung der Ionenstärke in Experiment Nr.11 durch Austausch der Wasserbasis der in Abb. 5.54 genannten Pektin-Zuckerlösung durch Milchserum. Wie bereits gezeigt, spiegelt die in Abbildung 5.57 aufgetragene Messgröße "Anteil abzentrifugierbaren Sediments" die Stabilität der Biopolymermischung wider. Die Zunahme des Sediments bei Erhöhung der Serumionenkonzentration läßt sich auf eine Kompression der in Kapitel 2.1.2 beschriebenen elektrischen Doppelschicht zurückführen. Analog zu einem "Aussalzeffekt" verschiebt sich gemäß der DLVO-Theorie die Nettointeraktionsenergie in Richtung Moleküloberfläche, und Partikelaggregationen werden erleichtert (Abb. 5.57 rechts).

Dieser größeren Tendenz zur Flockenbildung in System Y steht in System Z ein nicht zur Biopolymerkomplexbildung herangezogener Pektinüberschuss entgegen, durch den die Viskosität

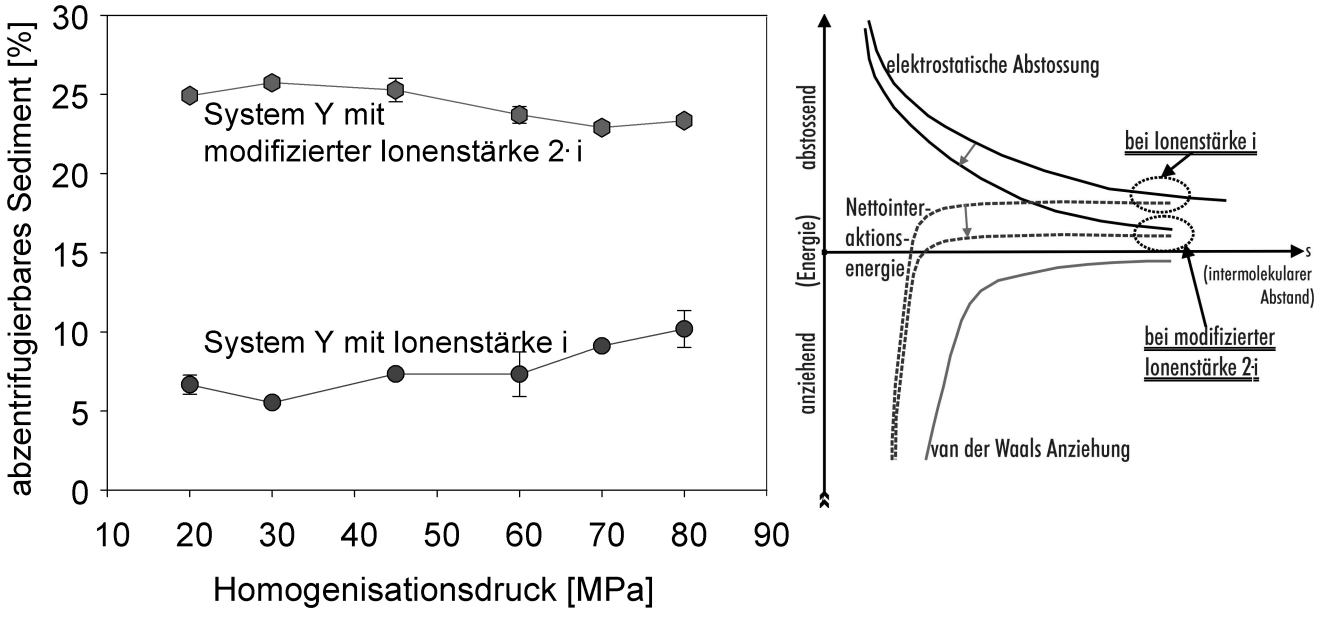

Abb. 5.57: Auswirkung einer Erhöhung der Ionenstärke auf den Anteil abzentrifugierbaren Sediments bei System Y in Experiment Nr.11. Rechts schematische Darstellung der Auswirkungen einer Ionenstärkenerhöhung auf intermolekulare Kräfte. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

des Serums erhöht wird. Dies wirkt sich positiv auf die Mischungsstabilität aus, da die Bewegung einzelner Partikel entsprechend verlangsamt wird. Damit kommt es seltener zum Zusammentreffen von Partikeln und zur Bildung von Aggregaten, bis dies schließlich durch die Etablierung eines schwachen Netzwerks mit der entsprechenden Fixierung der einzelnen Biopolymerpartikel weitestgehend unterbunden wird.

Dagegen erfolgt bei einer Biopolymerzusammensetzung wie in einem auf eine höhere Ionenstärke modifizierten System Y der Aufbau der durchgehenden Gelstruktur jedoch zu langsam und zu unvollständig, um einer Flockenbildung wirksam entgegenzutreten. Es fehlt die Möglichkeit, allein durch die ausreichende Anzahl an Makromolekülen pro Volumen den geringeren Durchmesser der diffusen Doppelschicht der sterisch-interagierenden Molekülabschnitte auszugleichen (Abb. 5.57; Gl. 2.32). Ein auf die zu stabilisierende Gesamtoberfläche bezogener Überschuss an Pektin ist daher im Sinne von praxisrelevanten Biopolymersystemen vorteilhaft, da dadurch die Auswirkungen von Schwankungen in der Zusammensetzung übriger Mischungskomponeten ausgeglichen werden.

5.2.4 Einfluss der Vorerhitzung auf das saure Pektin-Milchproteinsystem

Im o.g. aus der industriellen Praxis abgeleiteten Herstellungsprozess finden sich zwei Erhitzungsschritte. Zum einen ein Vorerhitzungsschritt, der nur die Milchproteinlösung betrifft, zum anderen der eigentliche Erhitzungsschritt der homogenisierten Biopolymermischung. Der Vorerhitzungsschritt und seine Prozessbedingungen sind aus der Joghurtherstellung abgeleitet. Durch diese Vorbehandlung der Milchproteine wird bei Joghurt eine Texturverbesserung im Sinne einer höheren Gelstärke erreicht (KLUPSCH, 1984; DANNENBERG, 1986; KESSLER, 1996). Untersuchungen an gesäuerten Milchgelen zeigen, dass eine Vorerhitzung der Milchproteine den pH-Wertebereich, in dem die Gelbildung beginnt und eine maximale Gelstärke erreicht wird, nach oben verschiebt (HAMMELEHLE, 1994).

Der Hintergrund für dieses Phänomen liegt, wie bereits auch bei dem Carrageenan-Milchprotein-Beispiel erläutert, in der Auffaltung, Denaturierung und irreversiblen Komplexbindung von Molkenproteinen an der Caseinmicellenoberfläche über Disulfidbrücken (KIRCHMEIER, 1987; HORNE, 1998). Auch ein Anstieg der Wasserbindungsfähigkeit wird dem Milchproteinkomplex zugeschrieben (SCHKODA, 1999). Wie aus den physikalischen Grundlagen hervorgeht, kann eine höhere Wasserbindungsfähigkeit grundsätzlich auf eine höhere Ladungsdichte zurückgeführt werden.

In diesem Fall ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass sich Form und Beschaffenheit der Caseinmicellenoberfläche durch die Anlagerung der Molkenproteine verändern. Bei einer darauffolgenden Säuerung zerfallen die Caseinmicellen aufgrund fehlender elektrostatischer Bindungen bei Erreichen des isoelektrostatischen Punkts (IEP). Eine kovalente Bindung von denaturierten Molkenproteinen an der Micellenoberfläche wirkt jedoch einem starken Auseinanderfallen der Caseinmicelle in ihre Fraktionen entgegen. Oberfläche und Partialladungsverhältnisse der Proteinpartikel werden daher je nach Prozessvorgeschichte unterschiedlich ausfallen. Da diese aber einen Ansatz für die elektrostatische Wechselwirkung mit Pektin bilden, sind dementsprechend Auswirkungen auf die Bildung des stabilisierenden Komplexes mit dem Polysaccharid möglich.

Es stellt sich damit die Frage, inwieweit durch diese Proteinmodifikation Eigenschaften verändert werden, die ausschlaggebend sind für einen erfolgreichen Aufbau eines elektrostatischen Komplexes zwischen Milchproteinpartikeln und Pektin. Auch sind die Auswirkungen von Veränderungen der Proteingesamtoberfläche auf eine erfolgreiche Stabilisierung des Mischsystems zu berücksichtigen. Da wie o.g. bei einer kovalenten Vernetzung der Caseinmicellenoberfläche durch Molkenproteine davon ausgegangen werden kann, dass bei einer Säuerung weniger Proteineinheiten entstehen und damit eine entsprechend kleinere Proteingesamtoberfläche von Pektin umhüllt werden muss, kann angenommen werden, dass sich eine Vorerhitzung der Milchproteine vorteilhaft im Sinne einer erfolgreichen Stabilisierung auswirkt. Offen bleibt jedoch, inwieweit dieser Vorteil durch veränderte Ladungsverhältnisse an der Partikeloberfläche aufgrund der Komplexierung der Proteinpartikel wieder aufgehoben wird.

Zum Vergleich werden zwei Systeme herangezogen, System Y mit 3,2 % Protein und System Z mit 1,2 % Protein. Der Ablauf des Herstellungsprozesses ist in Abbildung 5.58 verdeutlicht. Die

Milchproteinlösung der jeweiligen Mischungen Y und Z durchläuft je nach Variation eine Vorerhitzung von 6 Minuten bei 90 °C oder bleibt unbehandelt. Im Homogenisationsschritt wurde der Druck auf 20 MPa eingestellt, Pasteurisation und Kühlung werden anschließend wie bereits bekannt durchgeführt.

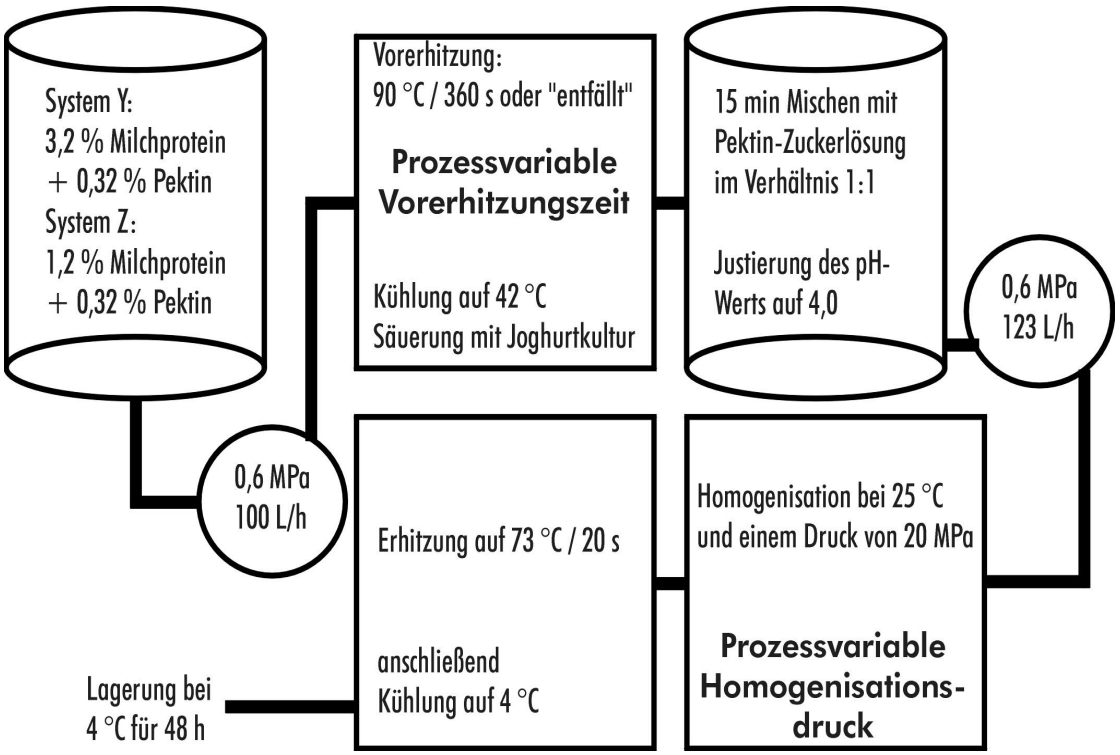

Abb. 5.58: Prozessschema zur Herstellung von gesäuerten Milchproteinsystemen mit Pektinzusatz unter Variation des Vorerhitzungsschritts. Experiment Nr.12 wird mit Biopolymerverhältnissen von 10:1 und 3,75:1 durchgeführt.

Abbildung 5.59 zeigt die Auswirkungen der unterschiedlichen Vorerhitzung auf die Mischungen Y und Z. Unabhängig von dem Biopolymerverhältnis führt eine Vorerhitzung zu kleineren Clustergrößen als bei entsprechenden Mischungen mit nativen Milchproteinen. Eine fehlende Komplexierung der Caseinmicellen mit Molkenproteinen wirkt sich jedoch bei System Y (Protein:Pektin = 10:1) stärker aus als bei System Z (Protein:Pektin = 3,75:1). So liegt bei System Y die Steigerung des Clusterdurchmessers aufgrund der Prozessvariation deutlich höher als bei System Z.

Die signifikant stärkeren Auswirkungen einer fehlenden Caseinmicellenstabilisierung vor der Säuerung der Milchproteine bei System Y mit dem engeren Biopolymerverhältnis stützen die These, dass bei fehlender Komplexierung der Milchproteine die Caseinmicellen am IEP in eine größere Anzahl kleinerer Fragmente mit einer entsprechend größeren Gesamtoberfläche zerfallen.

Dieses Phänomen kann zwar bei Mischung Z durch die höhere Pektinmenge etwas erfolgreicher aufgefangen werden. Aber auch hier wirkt sich eine fehlende Vorerhitzung nachteilig aus. Zu bedenken ist, dass bei einem Prozess ohne Vorerhitzung reaktive SH-Gruppen an den Proteinoberflächen während Homogenisation und Erhitzung exponiert sind und somit auch für Reaktionen mit Teilen der Pektinmakromoleküle zur Verfügung stehen. Prinzipiell sind neben der bereits erwähnten und erwünschten elektrostatischen Komplexbildung zwischen beiden

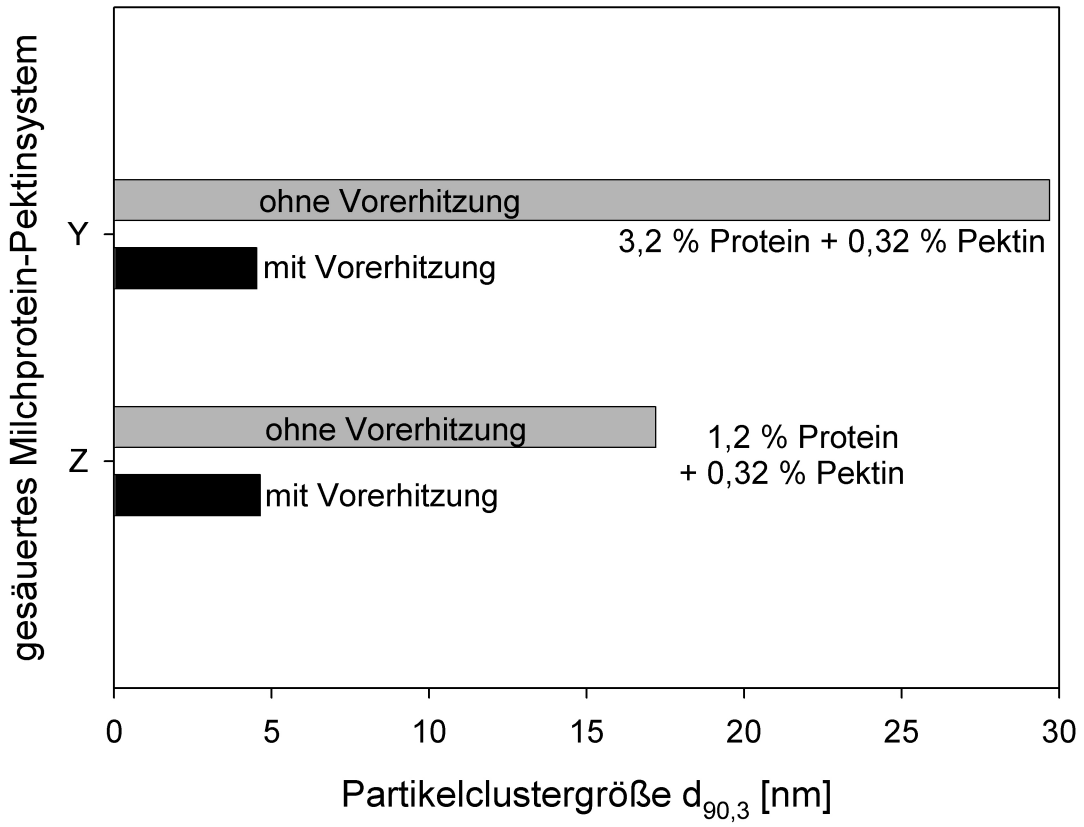

Abb. 5.59: Auswirkung einer Vorerhitzung der Milchproteine auf die Partikelclustergröße von System Y und System Z.

Biopolymeren auch andere Reaktionsmechanismen möglich, wie beispielsweise eine Komplexbildung unter Beteiligung von Pektincarboxylgruppen und Peptidbindungen in den Proteinsträngen (Zaleska et al., 2000). Derartige Wechselwirkungen zwischen Molkenproteinen und Pektin führen letztendlich zu einer Verminderung der Stabilitätskapazität des Polysaccharids. Bei den hier gezeigten Ergebnissen besitzt die Molkenproteinfraktion der Beispielsysteme ohne Vorerhitzung bei der Erhitzung mit Pektin noch die Reaktivität von nativen Molkenproteinen, so dass dieser Mechanismus nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

5.2.5 Einfluss des finalen Erhitzungsschrittes auf saure Pektin-Milchproteinsysteme

Für die folgenden Versuche wird daher die Vorerhitzung der Milchproteine beibehalten und System Z als Standard ausgewählt, da bei dieser Pektinmenge die verschiedenen, durch den Homogenisationsdruck bestimmten Proteinpartikelgrößenverteilungen erhalten bleiben. Damit besteht die Möglichkeit, Prozessparameterauswirkungen des eigentlichen Haupterhitzungsschritts in einem feinabgestuften Spektrum von verschiedenen Pektin-Proteinoberflächen-Verhältnissen zu beobachten. Veränderungen im Vergleich zu Standardbedingungen können damit eindeutig den folgenden Prozessparametervariationen zugeschrieben werden.

Die eigentliche Fixierung der elektrostatischen Komplexe zwischen Proteinpartikeln und Pektin wird dem finalen Erhitzungsschritt nach der Homogenisierung zugeschrieben. Die Bedingungen in diesem Prozessschritt bestimmen die Lage des Gleichgewichts zwischen den nicht-adsorbierten und adsorbierten Pektinfraktionen (Tromp et al., 2004). Die im Vergleich zu Sulphatgruppen schwächere Elektronegativität macht elektrostatische Wechselwirkungen mit Carboxylgruppen sensitiver in Bezug auf pH-Schwankungen. Aufgrund verschiedener Salzgleichgewichte, wie z.B. zwischen kolloidalem und gelöstem Calciumphosphat, können sich Temperaturveränderungen bei Milchsystemen vergleichsweise stark auf den pH-Wert auswirken. Auch ist zu bedenken, dass ein Teil der Bindungskräfte, welche die innere Struktur der Proteinpartikel stabilisieren, Temperaturabhängigkeiten zeigt. Dies ist jedoch nicht Teil dieser Untersuchung, so dass hierzu auf Fachliteratur zurückgegriffen wird. So liegt beispielsweise die maximale Stärke bei hydrophoben Wechselwirkungen bei ca. 60 °C (Walstra, 2003). Vor diesem Hintergrund wird zur nächsten Versuchsreihe als Prozessvariable die Erhitzungstemperatur im eigentlichen Haupterhitzungsschritt am Ende des Herstellungsprozesses gewählt.

Dies ist darin begründet, dass die gewünschte Bildung des elektrostatischen Biopolymerkomplexes nicht nur bei ganz bestimmten, eng definierten thermodynamischen Bedingungen auftritt. Denn beide Biopolymere, Milchprotein wie auch Pektin, weisen aufgrund ihres natürlichen Ursprungs einen gewissen Grad an Polydispersität auf. Vielmehr muss von einem Temperatur- bzw. pH-Bereich ausgegangen werden, in dem - statistisch gesehen - der elektrostatische Milchprotein-Pektinkomplex bevorzugt beibehalten wird.

Bezogen auf den Herstellungsprozess ist jedoch offen, wie begrenzt dieser Bereich eines erfolgreichen Biopolymerkomplexaufbaus im Hinblick auf Temperaturen oberhalb von Pasteurisierungsbedingungen ist. Aufgrund des Maximums von hydrophoben Wechselwirkungen bei 60 °C und damit der Temperaturabhängigkeit von beteiligten intrapartikulären Bindungen der Proteinpartikel kann die These aufgestellt werden, dass eine zu intensive Erhitzung Modifikationen der Reaktionspartner bewirkt, welche den zweistufigen Stabilisierungsmechanismus nachteilig beeinflussen.

Zur Optimierung des technischen Ablaufs auf der verfügbaren Pilotanlage wird die Herstellung der Standardmischung Y leicht modifiziert. Die Vorerhitzungstemperatur wird von 90 auf 95 °C erhöht, gleichzeitig die Heißhaltezeit im Gegenzug verkürzt. Für eine bessere Wiederholbarkeit erfolgt die Säuerung nur mehr in einem Schritt durch Zugabe einer definierten Menge

Citronensäure statt wie in den vorausgegangenen Experimenten durch eine Kombination aus Säuerungskultur und Citronensäure. Der Ablauf ist in Abbildung 5.60 im Detail gezeigt.

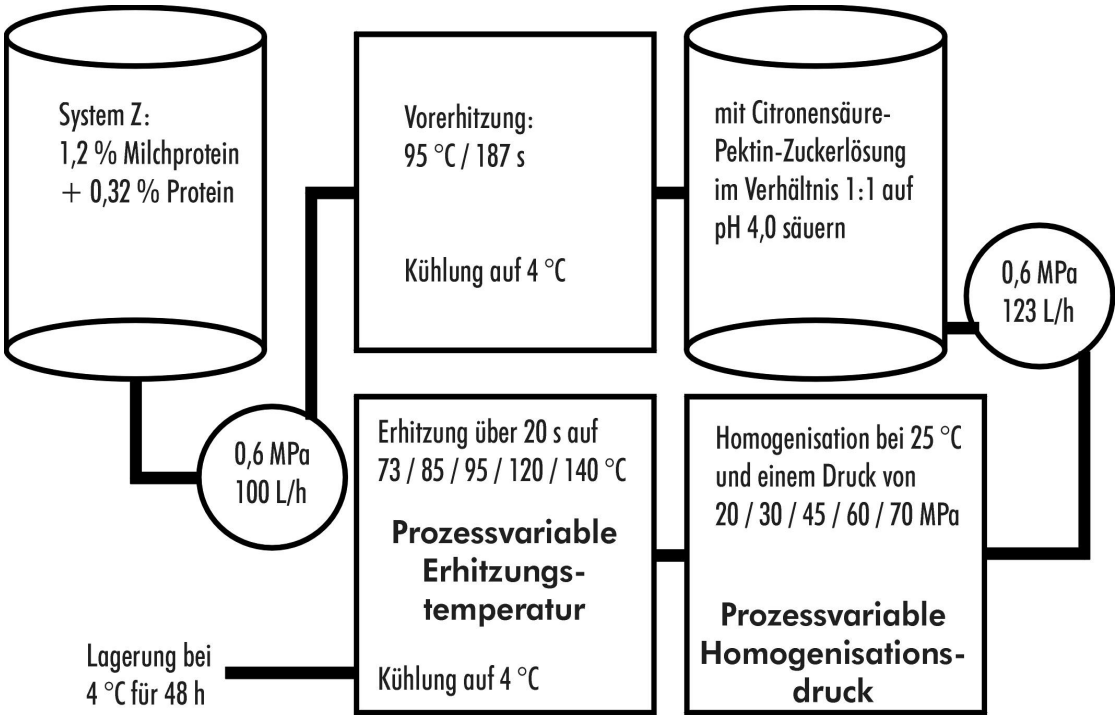

Abb. 5.60: Prozessschema zur Herstellung von gesäuerten Milchproteinsystemen mit Pektinzusatz unter Variation von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur (Experiment Nr.13).

Neben der bereits bekannten Variation des Homogenisationsdrucks (hier in den Stufen 20, 30, 45, 60 oder 80 MPa) wird als zweiter Prozessparameter im Erhitzungsschritt die Temperatur von 73 °C stufenweise auf 140 °C erhöht. Die Mischungen werden nach Abschluss des Erhitzungsschritts für 20 s gekühlt und bei 4 °C bis zur Durchführung der Analysen gelagert. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Messverfahren vorgestellt und diskutiert:

In Abbildung 5.61 ist die durchschnittliche Sedimentationsgeschwindigkeit der Milchprotein-Pektinmischung während 24 h bei 30 °C dargestellt. Zur besseren Übersicht sind nur drei Prozessvariationen der Erhitzungsbedingungen aufgetragen. Mischungen, welche bei 73 °C erhitzt wurden, zeigen keine signifikanten Abweichungen zu dem dargestellten Ergebnis der Prozesseinstellung 85 °C. Bei Ansätzen, welche im Erhitzungsschritt zwischen 73 und 120 °C erwärmt wurden, zeigt die Homogenisationsdruckhöhe einen gleichförmigen Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Werte von Mischungen, welche bei 20 MPa homogenisiert wurden, liegen deutlich höher, mit steigender Druckhöhe pendelt sich der Messwert auf einen jeweiligen Plateauwert ein. Höhere Erhitzungstemperaturen verschieben das Plateau bzw. die Ergebniskurve nach oben. Mischungen, welche bei 140 °C erhitzt wurden, zeigen eine sehr schnelle Entmischung und wurden daher nicht in diese Darstellung aufgenommen.

Mit einer Pektinassoziation wird die Oberfläche der Proteinpartikel in Form und Umfang verändert, der nicht adsorbierte Teil des Pektinmakromoleküls wirkt wie eine haarige Schicht auf der Proteinoberfläche. Der Erfolg des sterischen Stabilisationsmechanismus in dieser Biopolymersuspension hängt eng mit dem Aufbau dieser "Abstandshalter" zusammen. Deren Umfang und Stabi-

lisationskapazität zeigt sich in dem Anstieg der Partikelgesamtoberfläche um dieses schwammartige Pektingewebe, bzw. äquivalent dazu in der Erhöhung der Wasserbindungskapazität bezogen auf den einzelnen Partikel aufgrund der Ausmaße des Schwammgewebes an der Proteinpartikeloberfläche. Das Gesamtausmaß des an Biopolymeroberflächen assoziierten Pektins bestimmt damit auch die Restmenge der unbeteiligten, nicht wechselwirkenden Pektinfraktion, die zwar für die Bildung des Biopolymerkomplexes notwendig ist, später während der Lagerung aber keine aktive Stabilisierungsrolle direkt an den Proteinpartikeln übernimmt (TROMP ET AL., 2004).

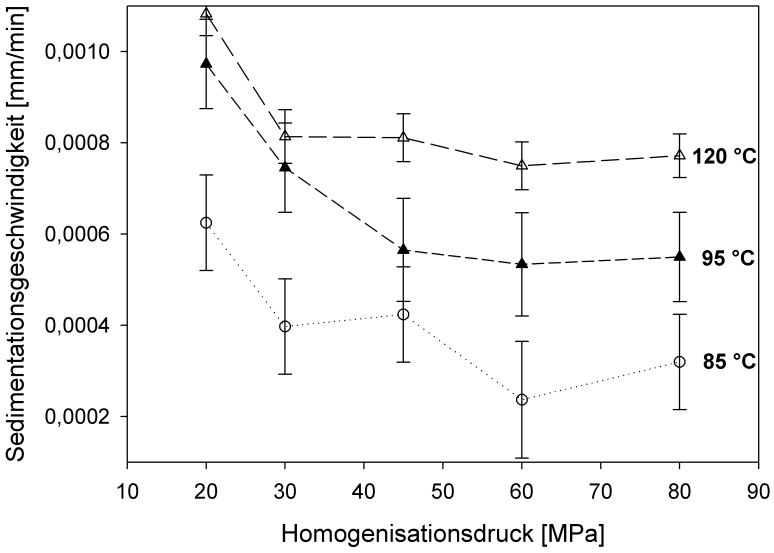

Abb. 5.61: Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur auf die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da sich die Pektinmakromoleküle während des Erhitzungsschrittes voll entfalten, intramolekulare Assoziationen lösen und damit vollständig hydratisiert werden, bestimmt die Restmenge des nicht an Proteinwechselwirkungen beteiligten Pektins aufgrund seines Platzbedarfs über den "excluded volume"-Effekt die Aggregation des unstabilisierten Feinpartikelanteils.

Dieser Effekt kann bei einer Messung der Serumbindungskapazität durch eine definierte Zentrifugalbelastung bestimmt werden (HARWALKAR ET AL., 1981; SCHKODA ET AL., 1999). Der Sedimentgewichtsanteil nach Zentrifugation ist für die verschiedenen Prozessvariationen in Abbildung 5.62 aufgetragen. Die Sedimentsmenge nimmt sowohl mit ansteigender Erhitzungstemperatur im Bereich von 73 bis 120 °C wie auch mit höheren Homogenisationsdrücken ab.

Ein grundsätzlich anderes Verhalten zeigen dagegen Mischungen, die bei 140 °C erhitzt werden. Bei 140 °C führt ein steigender Homogenisationsdruck nicht wie bei den übrigen Proben zu einem Absinken des Messwerts auf ein Plateau von 2 %, sondern er steigert das Sediment ab einer Druckhöhe von 45 MPa auf Werte bis über 7 %. Die Ergebnisse sind konsistent mit den Messwerten eines alternativen Analyseverfahrens, der Bestimmung des Proteingehalts im abzentrifugierbaren Serum (Abb. 5.63). Der steigende Proteingehalt bei höheren Homogenisationsdrücken macht die geringere Aggregation kleinster Proteineinheiten zu abzentrifugierbaren Aggregaten deutlich. Dies bestätigt indirekt eine Verminderung des nicht-wechselwirkenden Pektinanteils bei höheren Homogenisationsdrücken. Auf den Hintergrund zu den durch eine Erhitzung bei 140 °C induzierten Effekten wird später noch im Detail eingegangen.

Geklärt werden muss noch, welcher Mechanismus bei Temperaturen bis 120 °C im Hintergrund steht, wenn mit steigender Erhitzungstemperatur einerseits die Sedimentationsgeschwindigkeit steigt (Abb.5.61), der abzentrifugierbare Sedimentgewichtsanteil aber sinkt (Abb. 5.62). Der nied-

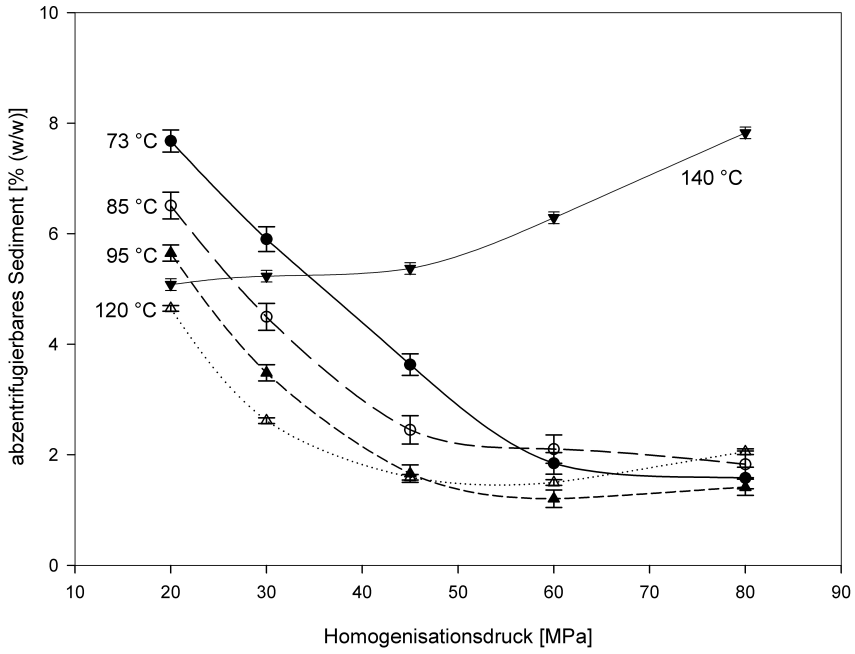

Abb. 5.62: Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur auf den abzentrifugierbaren Sedimentanteil eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

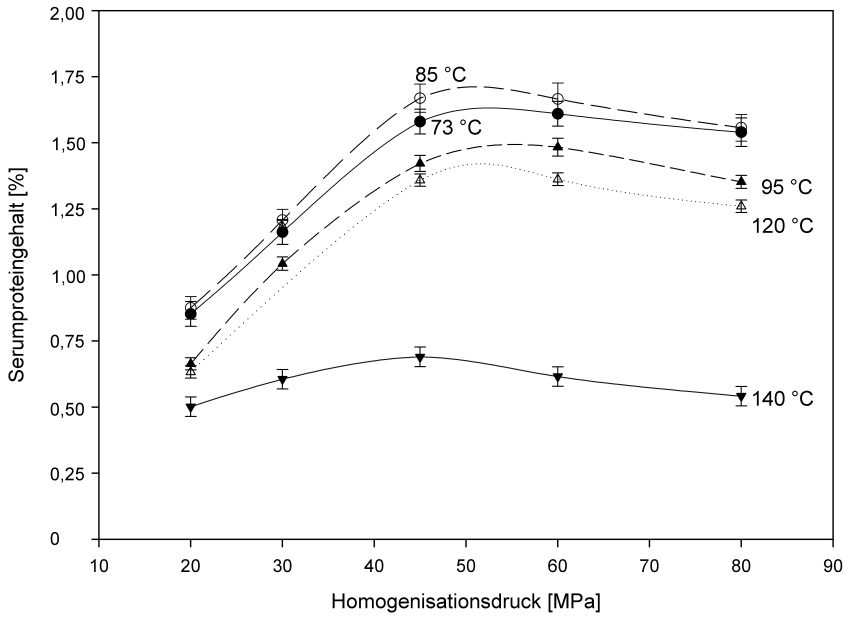

Abb. 5.63: Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur auf den Proteingehalt im abzentrifugierbaren Serum eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

rigere Sedimentgewichtsanteil bei stärker erhitzten Proben beruht auf einer geringeren Wasserbindungskraft des Milchprotein-Pektinkomplexes. Dies deutet auf ein geringeres Ausmaß der haarigen, schwammartigen Pektinschicht auf der Proteinpartikeloberfläche hin. Das geringere Volumen des Biopolymerkomplexes bedeutet einen geringeren Bedarf an Wassermolekülen zum Aufbau von Hydrathüllen. Damit nehmen auch Anzahl und Radius von nichtadsorbierbaren Pektinmakromolekülabschnitten, die in den Raum abstehen und damit Partikelform und -umfang wie auch Aggregationsvermögen bestimmen, ab. Dies kann seine Ursache in einer partiellen Hydrolyse von Teilen der Pektinketten wie z.B. einer Abspaltung der neutralen Zuckerseitenketten an den Rhamnoseverzweigungen haben. Damit steigt die Sedimentationsgeschwindigkeit schon allein aufgrund der veränderten Partikelform. Gleichzeitig führt die Abnahme der Fähigkeit, mit sterischen Mechanismen Partikelaggregationen zu verhindern, zu einer weiteren Erhöhung der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit durch Flockenbildung.

Eine sehr deutliche Entmischung wird bei Mischungen, die auf 140 °C erhitzt wurden, beobachtet. Visuell makroskopisch erkennbar bilden sich sandartige Partikelaggregationen. In diesem Fall erhöht sich die Sedimentmenge mit steigendem Homogenisationsdruck (Abb. 5.62). Der Proteingehalt im abzentrifugierten Serum wird bei einer Erhitzung auf 140 °C dagegen kaum von den Homogenisationsbedingungen beeinflusst (Abb. 5.63, 140 °C). Aufgrund dieser Beobachtung wie auch wegen des sehr niedrigen abso-

luten Analysenwertes lässt sich dieser Proteinanteil der im Serum gelösten Peptid- und Proteinfraktion zuordnen, welche unabhängig von der Stabilisierung in allen Proben vorhanden ist. Herstellungsbedingungen mit einer Erhitzung auf 140 °C führen damit zu Veränderungen der Biopolymere, die über die Auswirkungen einer steigenden Temperatur im Bereich von 73 bis 120 °C hinausgehen.

Die bisher gezeigten Messergebnisse sprechen dafür, dass sich bei steigenden Erhitzungstemperaturen die Form der Partikel verändert und damit Aggregationsphänomene häufiger werden. Abbildung 5.64 zeigt den Einfluss der Prozessgrößen auf die Größe von aggregierten Proteinclustern. Die Ergebnisse der Versuchsreihen bei 85 und 95 °C entsprechen in der Tendenz den Werten, die bei 73 bzw. 120 °C erhalten wurden; sie sind daher zur besseren Lesbarkeit nicht in der Abbildung aufgetragen. Als Maß für die Clustergröße wird der Durchmesser herangezogen, der durch den $d_{90,3}$-Wert in einer volumenbasierten Partikelgrößenverteilung definiert wird (SEDLMEYER ET AL., 2004). Grundsätzlich führt eine Erhöhung des Homogenisationsdrucks von 20 auf 45 MPa bei einer nachfolgenden Erhitzung zwischen 73 und 120 °C zu einer relativen Abnahme der Clustergröße. Bei einer weiteren Erhöhung des Druckes von 45 bis 80 MPa werden druckbedingte Veränderungen vernachlässigbar.

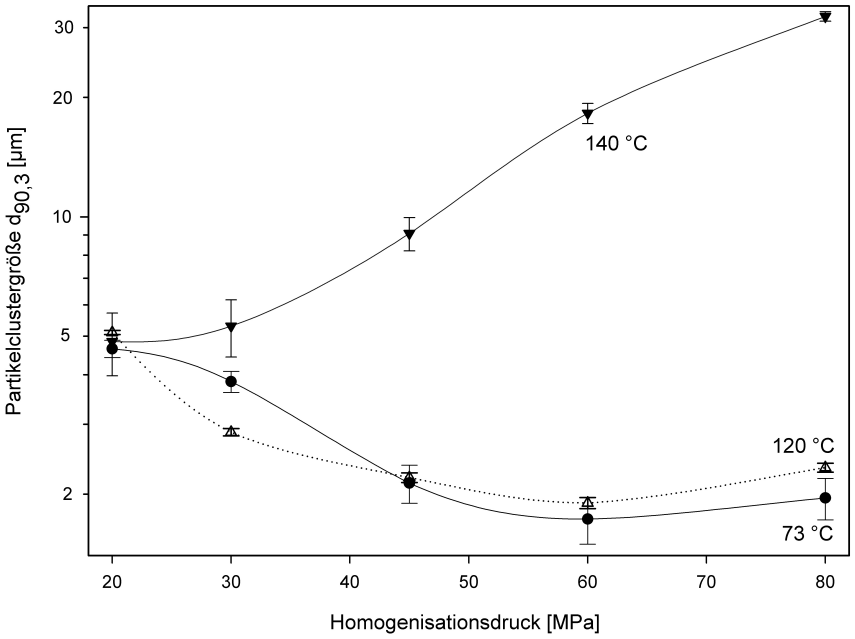

Abb. 5.64: Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur auf die Partikelclustergröße $d_{90,3}$ eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Analog zu den gezeigten Ergebnissen des Sedimentmassenanteils führt eine Erhitzung bei 140 °C zu einem völlig konträren Verhalten im Vergleich zu niedriger erhitzten Proben (Abb. 5.62 und 5.64). Die Proteinclustergröße steigt mit ansteigendem Homogenisationsdruck sehr deutlich, wenn in dem nachfolgenden Prozessschritt eine Temperatur von 140 °C herrscht. Dies deutet auf einen Verlust der Stabilisierungsfähigkeit des Pektins hin. Als Ursache kommt die temperaturbedingte Hydrolyse der Seitenketten aus neutralen Zuckern des Pektinmakromoleküls in Frage (vgl. Aufbau in Abb. 2.34). Dieser chemisch bedingte Vorgang des Auseinanderbrechens der Pektinkette in kürzere Abschnitte ohne funktionelle Eigenschaften kann als Grund für die bereits angesprochenen Veränderungen in Molekülform und Wasserbindungsvermögen des Biopolymerkomplexes angesehen werden. Für diese Annahme spricht besonders, dass durch die relativ lange und hohe Temperaturbelastung bei 140 °C und die daraus resultierenden Verschiebungen in pH-Wert und Salzgleichgewichten (i.S. der Pufferkapazität) die Reaktionsbedingungen für hydrolytische Spaltungen in der Polysaccharidkette vorliegen.

Der erste Schritt im Stabilisierungsmechanismus, der Aufbau eines Milchproteinpartikel-Pektin-

komplexes mit der Fähigkeit, eine weitere Partikelaggregation sterisch zu verhindern, beinhaltet nach der DLVO-Theorie auch, dass der Biopolymerkomplex ein gewisses Oberflächenladungsniveau aufweist. Während Partikelgrößenmessungen eher die Auswirkungen von Prozesseinflüssen auf den Stabilisierungsmechanismus aufzeigen, kann eine Messung der Oberflächenladung der Biopolymerpartikel Einblick in den Hintergrund der prozessinduzierten Destabilisierungsphänomene geben.

Abbildung 5.65 zeigt das zeta-Potential als Maß für die Beschreibung der Ladungsverhältnisse in der diffusen Schicht um die Biopolymerpartikel in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur. Da auf diese Messgröße kein signifikanter Einfluss der Homogenisationstemperatur besteht, wurden zur besseren Übersicht alle Einzelwerte zur Berechnung des dargestellten Mittelwerts herangezogen. Das Ergebnis zeigt zwei signifikant unterschiedliche Gruppen, die sich durch den Einfluss der Temperaturspitze im Herstellungsprozess auf das mittlere zeta-Potential der Biopolymerkomplexe ergeben. Liegt der Betrag des zeta-Potentialmittelwertes nach einer Erhitzung bei 73-95 °C noch bei 14 bis 16 mV, so beträgt er bei Systemen mit einer Herstellungsgeschichte von 120-140 °C nur noch 12 bis 13 mV. Dieser relativ geringe Abfall des Zeta-Potentials genügt nach der DLVO-Theorie allein noch nicht für das beobachtete Aggregationsverhalten. Erst bei einem noch niedrigeren Niveau des zeta-Potentialwerts werden nach diesem theoretischen Ansatz Aggregationen benachbarter Partikel durch van-der-Waals-Kräfte verursacht (Verwey et al., 1948). Der gemessene Wert des zeta-Potentials erklärt damit nicht den Mechanismus für die Instabilitäten der Proben nach einer Erhitzung auf 140 °C.

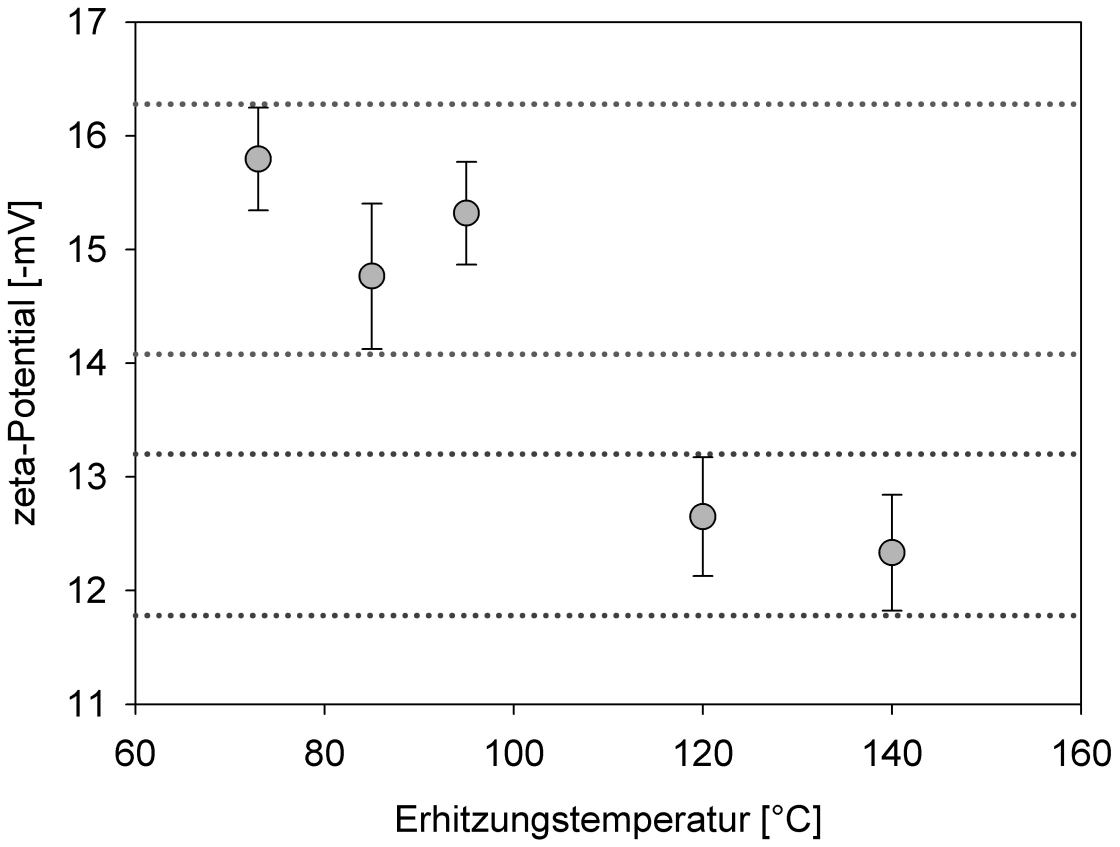

Abb. 5.65: Einfluss der Erhitzungstemperatur auf das zeta-Potential eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z). Fehlerbalken zeigen die Signifikanzintervalle "Fisher's least significant difference" (LSD).

Sichtbare Entmischungen sind jedoch visuell bereits bei einer Erhitzung auf 120 °C in Kombination mit hohen Homogenisationsdrücken feststellbar. Die Auswirkungen eines relativ niedrigen Abfalls des zeta-Potentials gegenüber Erhitzungen bis einschließlich 95 °C werden erst im Zusammenhang mit anderen Messverfahren erkennbar, wenn beispielsweise zusätzlich Sedimentationsgeschwindigkeit und Serumproteingehalt zu einem Gesamtbild herangezogen werden (Abb. 5.61 und 5.63).

Die Ladungsverhältnisse allein in der diffusen Schicht des Sternmodells, wie sie das zeta-Potential beschreibt, können in diesem Fall das elektrostatische Oberflächenpartialladungsmuster nicht vollständig beschreiben. Im Grundlagenteil wurde bereits die Möglichkeit eines doppelten Partialladungsübergangs aufgrund einer Kontaktadsorption des Ladungspartners angesprochen. Der pK_S von C-terminalen Carboxylgruppen beträgt 3,0 bis 3,2 (KIRCHMEIER, 1987). Liegen die noch nicht vollständig protonierten und damit negativ geladenen Säuregruppen bei einem abgespaltenen Pektinkettenfragment in einer Unterzahl gegenüber den methylisierten Galacturonsäureeinheiten vor, so ist eine Kontaktadsorption thermodynamisch vorteilhaft, da dadurch gleichzeitig eine enge Assoziation von hydrophoben Oberflächen, die in enger Nachbarschaft von Ladungsgruppen liegen, ermöglicht wird (Abb. 5.66). Damit verbunden ist die Freisetzung von Serummolekülen mit der Folge einer deutlichen Steigerung der Entropie des Gesamtsystems. Wie im Potentialverlauf der Abbildung 5.66 angezeigt, spiegeln sich die eigentlichen Ladungsverhältnisse in der inneren Helmholtz-Schicht bei einer Kontaktadsorption nicht im diffusen Teil des Sternmodells wider. Nur dieser diffuse Teil wird aber durch die zeta-Potentialmessung erfasst.

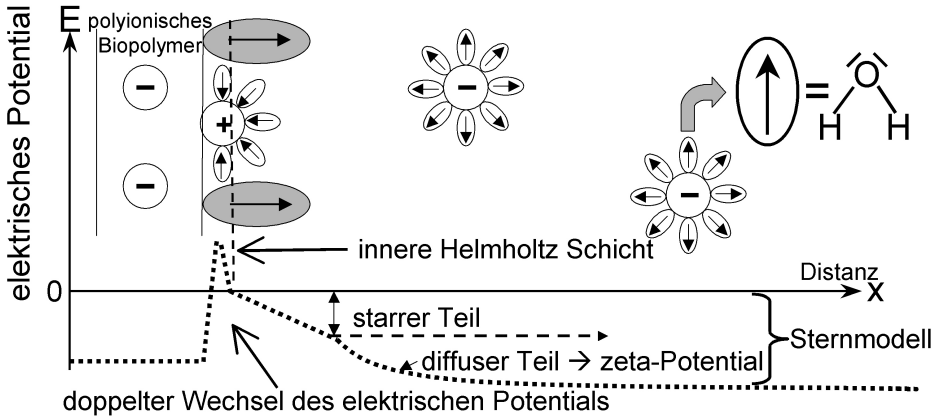

Abb. 5.66: Kontaktadsorbtion an polyionischen Biopolymeren und ihre Auswirkung auf den Verlauf des elektrischen Potentials (modifiziert nach HOLZE, 1998).

Nach dieser Darstellung des Biopolymerkomplexes auf molekularer Ebene muss für eine Gesamtbeurteilung des Prozesseinflusses auf die Stabilität dieser Biopolymermischung als nächstes auch das Umfeld betrachtet werden, in das die Pektin-Milchproteinpartikel eingebettet sind. Denn eine erfolgreiche Stabilisierung von gesäuerten Milchsystemen durch hochverestertes Pektin besteht aus der Kombination zweier Mechanismen, dem Aufbau eines geeignet geformten elektrostatischen Komplexes und der Verbindung dieser Biopolymerkomplexe zu einem schwachen, aber durchgehenden Gelnetzwerk.

Die bisher angewandten Messverfahren haben ihren Schwerpunkt auf Ausbildung und Form des

Biopolymerkomplexes. Die Ausbildung der haarigen, schwammartigen Schicht verhindert eine weitere Partikelaggregatsbildung. Der Aufbau eines schwachen Gelnetzwerks fixiert die Partikel im Verbandsvolumen und steht damit einer Sedimentation entgegen (BOULENGUER ET AL., 2003). Verschiedene schwache Wechselwirkungen, wie beispielsweise gegenseitige Anlagerungen hydrophober Gruppen zur Verkleinerung der exponierten Gesamtoberfläche, binden die proteinpartikelbasierten Biopolymerkomplexe in ein Gesamtsystem ein. Damit besteht - rheologisch gesehen - ein Gesamtnetzwerk mit einer bestimmten Stabilität gegenüber Schubspannungen, die in äußeren Einwirkungen wie z.B. dem Schwerkraftfeld ihre Ursache haben können. Die Stabilität dieser Mischstruktur kann durch den Schubspannungswert, an dem der Strukturpunkt als Indikator für ein Auseinanderreißen der Struktur sichtbar ist, beschrieben werden (=Spannungsstabilität = Strukturstabilität).

Der Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur ist in Form einer statistisch abgesicherten Flächenfunktion in Abbildung 5.67 verdeutlicht. Bei einer Prozessführung mit 73 bis 95 °C im Erhitzungsschritt hat eine Steigerung der Druckhöhe im vorangestellten Homogenisationsschritt einen positiven Effekt auf die Strukturstabilität. Dies kann der homogenisationsbedingten Entstehung einer größeren Proteinpartikelanzahl kleineren Durchmessers zugeschrieben

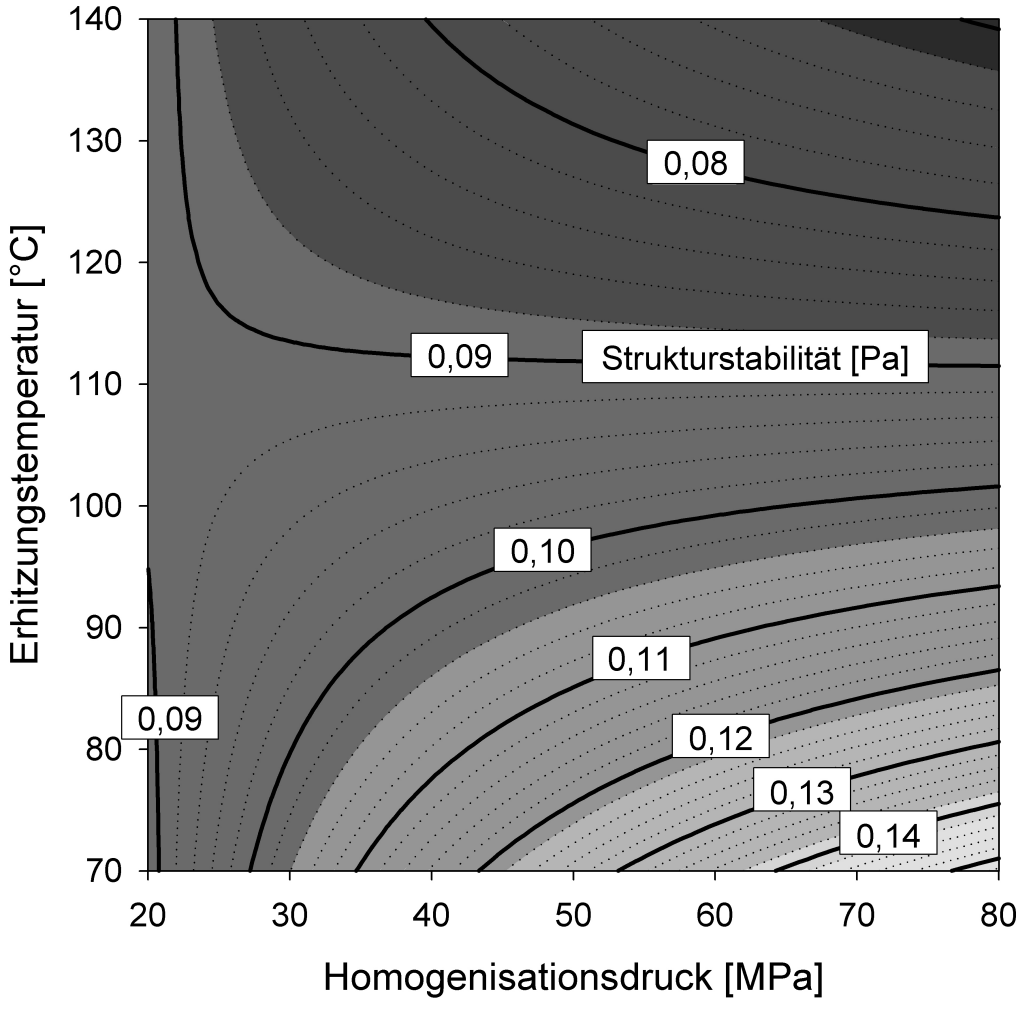

Abb. 5.67: Einfluss von Homogenisationsdruck und Erhitzungstemperatur auf die Strukturstabilität der Gesamtphase eines gesäuerten Mischsystems mit 1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin (System Z).

werden. Damit liegt bei erfolgreicher Umsetzung der elektrostatischen Komplexbildung ein engmaschigeres Netz als Grundlage für die schwache Gelstruktur vor.

Wird die Temperatur nach dem Homogenisationsschritt dagegen auf 120 oder 140 °C angehoben, kann der Vorteil eines höheren Feinpartikelanteils in der Proteinpartikelverteilung bei hohen Homogenisationsdrücken nicht mehr in den Aufbau eines stabileren Netzwerks umgesetzt werden. Das Messergebnis der Strukturstabilität des Gesamtsystems verdeutlicht damit die Beeinflussung von netzwerkbildenden Wechselwirkungen der nicht-adsorbierten Abschnitte der Pektinmakromoleküle untereinander bzw. mit anderen geeigneten Molekülen, wie z.B. den im System enthaltenen niedermolekularen Kohlenhydraten. Als ein Einflussfaktor wird damit die Veränderung von Pektinkettenlänge und Aufbau aufgrund hydrolytischer Spaltungen sehr wahrscheinlich, so dass auf diesen Punkt später noch gesondert eingegangen werden muss.

Resümee aus den bisherigen Ergebnissen zum Einfluss von Homogenisation und Erhitzung

Zunächst soll jedoch aus den gezeigten Ergebnissen ein Gesamtbild abgeleitet werden. Aus den Ergebnissen der Sedimentationsgeschwindigkeit geht hervor, dass die Stabilität der Biopolymermischung sowohl von der Höhe des Homogenisationsdrucks wie auch von der Temperatur im nachfolgenden Erhitzungsschritt beeinflusst wird. Grundsätzlich wird die Partikelgrößenverteilung und damit das Verhältnis zwischen Pektin und Proteinoberfläche durch die Homogenisationsbedingungen bestimmt. Während des Homogenisationsprozessschrittes erfolgt noch keine thermische Belastung, die Proteinpartikelgrößenverteilung hängt allein von den Scherbedingungen ab. Sie ist damit für jede Druckhöhe spezifisch und beeinflusst über die Proteinpartikelgesamtoberfläche den relativen Pektinüberschuß. Hohe Druckstufen erzeugen einen höheren Feinpartikelanteil und bedingen damit die Ausbildung eines dichter geknüpften Netzwerks - jedoch nur unter der Voraussetzung eines optimal ausgebildeten Biopolymerkomplexes (Abb. 5.68).

Bei Erhitzung von 73 °C für 20 s liegt dieser Zusammenhang von optimaler Komplexausbildung

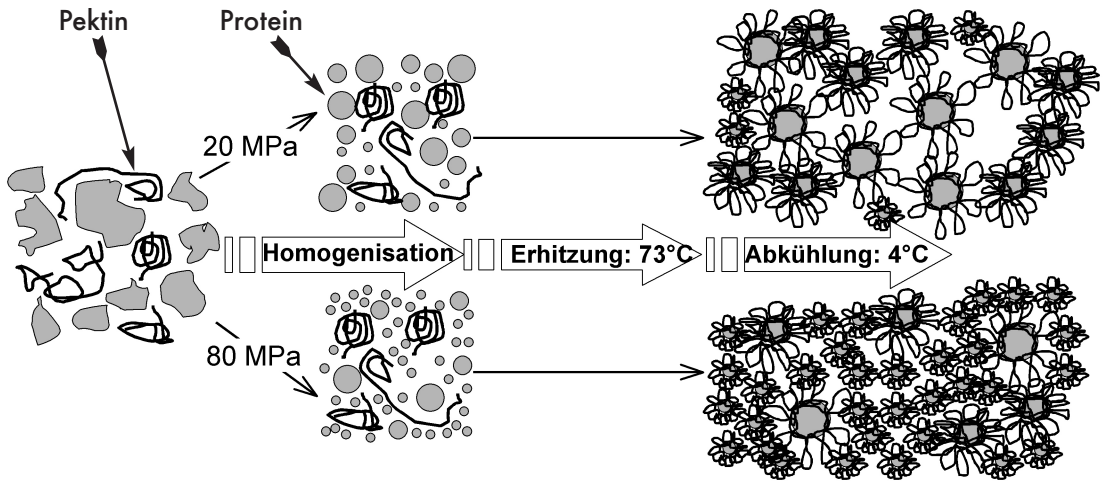

Abb. 5.68: Schematische Darstellung des Prozesseinflusses des Homogenisationsschritts auf gesäuerte Milchprotein-Pektinsysteme.

und relativem Pektinüberschuss vor. Steigerungen im Homogenisationsdruck führen zu kleineren Proteinclustern (dargestellt als $d_{90,3}$ in Abb. 5.64). Da sie bei diesen Erhitzungsbedingungen gut in das Stabilisierungssystem integriert werden, spiegelt sich der homogenisationsdruckabhängige Anstieg des Feinpartikelanteils gemäß dem nicht-linearen Zusammenhang in der Kombination von Archimedischem Prinzip und Stokes'schem Gesetz in kleineren Sedimentationsgeschwindigkeiten wider (Abb. 5.61).

Die Auswirkungen des Homogenisationsdrucks sind zwar grundsätzlich bei allen Mischungsansätzen gleich, können aber bei höheren Temperaturen im Erhitzungsschritt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. In Systemen, die bei 20 bzw. 30 MPa homogenisiert wurden, deutet dabei die fehlende Korrelation zwischen Sedimentationsgeschwindigkeit und Clustergröße bei Erhöhung der Prozesstemperatur an, dass ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren der Grund für die verschiedenen prozessabhängigen Entmischungsphänomene sein dürfte. Bei Homogenisationsdrücken unter 45 MPa zeigt beispielsweise ein bei 95 °C erhitztes System zwar eine größere Clustergröße (Abb. 5.69), gleichzeitig aber auch eine geringere Sedimentationsgeschwindigkeit (5.61) als eine auf 120 °C erhitzte Mischung gleicher Zusammensetzung. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist daher nicht ausschließlich von der Proteinpartikelgrößenverteilung bestimmt, sondern auch von der Partikelform, die sich nach erfolgreichem Aufbau des Proteinpartikel-Pektinkomplexes ergibt. Die Proteinpartikelgrößenverteilung bildet demnach nur die Grundlage, die effektive Partikelform bestimmt sich aber aus den Ausmaßen der haarigen, schwammartigen Pektinhülle um den Milchproteinpartikel.

Das verwendete Verfahren zur Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit erfasst jedoch nur deren Mittelwert und repräsentiert damit nur einen Aspekt der Mischsystemstabilität. Berücksichtigt man den inneren Aufbau der Biopolymerstruktur, so ist ein Netzwerk nur so stabil

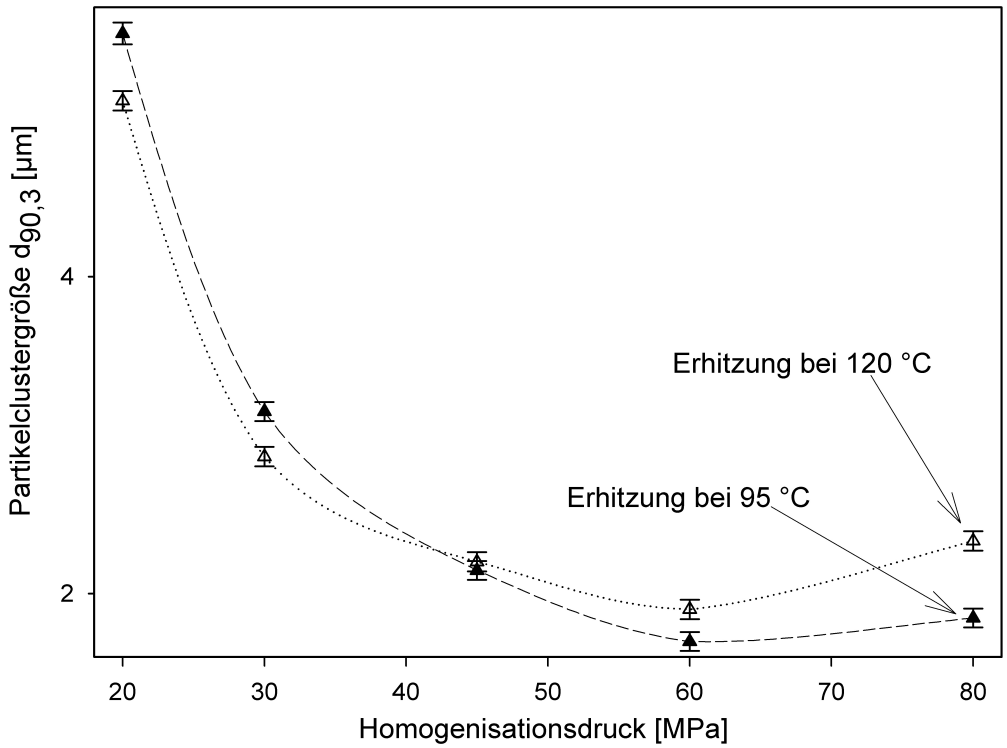

Abb. 5.69: Einfluss von Homogenisationsdruck auf die Partikelclustergröße d90,3 von zwei unterschiedlich erhitzten gesäuerten Mischsystemen gleicher Zusammensetzung (1,2 % Milchprotein und 0,32 % Pektin: System Z). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

wie sein schwächster Partner. Ein gleichmäßiger Aufbau mit einheitlicher Mischung aus kleinen und größeren Einheiten führt damit zu einem stabileren Netzwerk als eine Struktur, die innere Spannungen aufgrund von ungenügend verteilten Komponenten aufweist. Sie befindet sich damit nicht im Zustand einer möglichst niedrigen freien Enthalpie. Diesem Umstand wird im Allgemeinen durch Umlagerungen begegnet. Damit sind weitere Instabilitätsphänomene bzw. Entmischungen möglich.

Die Integration von Proteinclustern und der Aufbau eines ausbalancierten schwachen Mischgels ist jedoch eine der Forderungen, die an eine pektinstabilisierte, gesäuerte Milchproteinsuspension gestellt werden (BOULENGUER ET AL., 2003). So zeigt sich das Unvermögen stark erhitzter Suspensionspartikel zur Integration in den Netzwerkverband in der Abnahme der Strukturstabilität des Gesamtsystems mit steigender Temperatur besonders bei Mischungen, die vorher mit hohen Homogenisationsdrücken behandelt wurden (Abb. 5.67). Zieht man bei dieser Messgröße zum Vergleich Systeme ohne negativen Temperatureinfluss heran (z.B. bei 80 MPa und 73 °C hergestellte Proben), dann werden die Stabilitätssteigerungen, die durch eine gleichmäßigere Verteilung und Einbindung kleinerer Partikel möglich sind, deutlich sichtbar (Abb. 5.67).

Eine der entscheidenden Größen für eine Reaggregation der Partikel nach dem Homogenisationsschritt stellt eine niedrige Oberflächenladung dar. Bei einer Erhöhung der Erhitzungstemperatur von 95 auf 120 °C sinkt das zeta-Potential zwar signifikant ab, bleibt aber nach der DLVO-Theorie auf einem ausreichenden Niveau, um Aggregationen zu verhindern (Abb. 5.65). Das zeta-Potential beschreibt jedoch nicht die Ladungsverhältnisse unmittelbar an der Partikeloberfläche, sondern die der diffusen Schicht des Sternmodells. Wie vorher erwähnt, kann damit der Wert des zeta-Potentials eine Kontaktadsorption von hydrolisierten Pektinabschnitten nicht vollständig widerspiegeln (Abb. 5.66).

Mit dieser Kontaktadsorption und einer möglichen partiellen Hydrolyse von funktionellen Abschnitten des Pektinmakromoleküls geht einer der Pfeiler verloren, auf dem der Stabilisierungsmechanismus gegen eine Flockenbildung beruht. Dies wirkt sich zwar noch nicht unmittelbar auf die rheologischen Eigenschaften aus. Beispielsweise zeigt die Spannungsstabilität von bei 95 und 120 °C erhitzten Proben noch keine deutlichen Unterschiede. Eine weitere Erhöhung auf 140 °C bzw. eine Vergrößerung der zu stabilisierenden Proteinoberfläche durch Applikation höherer Druckstufen, wie 80 MPa, macht jedoch erkennbar, wie angeschlagen der Stabilisierungsmechanismus ist (Abb. 5.67).

Überschreitet die Druckhöhe bei der Homogenisation 45 MPa und wird danach die Probe auf Temperaturen von 120 °C und mehr erhitzt, dann kann der Aufbau größerer Partikelaggregate nicht mehr verhindert werden. Ein Anstieg der Clustergröße $d_{90,3}$ verdeutlicht dies (Abb.5.64). Damit bestätigt sich, dass das Zusammenspiel der verschiedenen stabilisierenden Faktoren dann nicht mehr ausreicht, um eine Reaggregation bei einem weit auseinanderliegenden Proteinoberflächen-Pektin-Verhältnis zu verhindern. Dies macht bei auf 120 °C erhitzten Systemen der erste leichte, aber signifikante Anstieg der Clustergröße bei einer Druckerhöhung von 60 auf 80 MPa deutlich (Abb. 5.69). Eine vollständige, deutlich sichtbare Flockenbildung ist schließlich bei einer Erhitzung auf 140 °C sichtbar (Abb. 5.64). Sie kann als Hinweis auf eine partielle Pektinhydrolyse mit entsprechender Abspaltung stabilisierender Steitengruppen gesehen werden. Diese hätte die Folge, dass Partikelaggregationen nicht mehr sterisch verhindert werden.

5.2.6 Einfluss einer partiellen Hydrolyse des Pektins auf die Mischsystemstabilität

Im vorangegangenen Kapitel wurde im Zwischenresümee deutlich, dass zur Erklärung des Hintergrunds für dieses Instabilitätsphänomen zwei Bereiche interessant sind: zum einen, inwieweit die elektrostatische Wechselwirkung selbst durch hohe Temperaturen beeinflusst wird, zum anderen ein möglicher temperaturabhängiger Zerfall beider Biopolymere. Dies bedeutet einerseits für die Proteinpartikel einen überproportionalen Anstieg ihrer Gesamtoberfläche und andererseits eine Verminderung des Molekulargewichts des Polysaccharids. Damit wird die Pektinkette zu kurz für eine vollständige Bedeckung und verliert mit den abgespaltenen Seitengruppen die Fähigkeit zur sterischen Stabilisierung. Es sollen daher in diesem Kapitel zusätzliche Messungen zum vorangegangenen Experiment Nr. 13 im Detail analysieren, ob das Auftreten von hitzeinduzierten Molekulargewichtsveränderungen der Biopolymere bestätigt werden kann.

Zunächst sollen aber noch einige Hintergrundinformationen, die für die Interpretation der Messergebnisse nützlich sind, kurz dargestellt werden:

Dafür, dass eine der Ursachen in einer temperaturabhängigen Veränderung der elektrostatischen Wechselwirkungen liegt, spricht die temperaturabhängige Verschiebung, die in gesäuerten Milchsystemen zwischen kolloidal gebundenen und gelösten Phosphaten auftritt (Vasiljevic et al., 1999). Dies ist ein Einflussfaktor, der die Differenz zwischen pH und pI vergrößert. Ein großer Unterschied dieser beiden Stoffgrößen fördert brückenbildende Assoziationsphänomene zwischen Biopolymeren (Surh et al., 2006). Von partiell hydrolisiertem Pektin nur unvollständig bedeckte Proteinpartikel stellen in diesem Zusammenhang ein Stabilitätsrisiko und die Grundlage für eine Flockenbildung dar. Dabei ist die Pektinmenge in diesem Mischsystem mit 0,32 % bei 1,2 % Proteingehalt völlig ausreichend bei Erhitzungen bis einschließlich 95 °C, um auch Partikelgrößenverteilungen zu stabilisieren, die durch eine Homogenisation bei 80 MPa entstehen. Weitere Steigerungen der Erhitzungstemperatur können jedoch zur Folge haben, dass die Pektinstränge und Proteinpartikel zerfallen, bevor die Gleichgewichtsreaktion auf die Seite der Komplexbildung mit Pektin verschoben ist. Die zu stabilisierende Gesamtoberfläche steigt damit schlagartig an, gleichzeitig hat die temperatur-/pH-bedingte Veränderung von Aufbau und Molekulargewicht des eingesetzten Pektins negative Auswirkungen auf den sterischen Stabilitätsmechanismus.

Ein Zerfall der Proteinpartikel bewirkt zudem, dass eine höhere Anzahl von hydrophoben Gruppen der Proteinmakromoleküle als Oberfläche exponiert werden. Deren Potential und Ladung stehen über die Lippmann-Gleichung zur Oberflächenspannung in Beziehung (Wedler, 1997). Um den dadurch auftretenden Oberflächenspannungen zu begegnen, können neben den gewünschten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Pektin nun auch hydrophobe Wechselwirkungen dieser dann exponierten hydrophoben Proteinoberflächen mit apolaren Abschnitten im Pektinmakromolekül auftreten (Oakenfull, 1991; Bals, 2002). Dies hat eine grundlegende Veränderung des Umfangs, der Form und der Ladungsverhältnisse des Protein-Pektin-Komplexes zur Folge. Für den zweistufigen Stabilisierungsmechanismus der Biopolymermischung ist aber eine elektrostatische Adsorption ohne doppelten Potentialwechsel allein der

polaren Abschnitte des Pektinmoleküls an der Proteinpartikeloberfläche notwendig. Nur dann stehen apolare Pektinabschnitte schlaufenförmig von dem Partikel ab und entfalten als haarige Schichten ihre volle Funktionalität zur Stabilisierung des Biopolymersystems.

Eine Analyse der gesamten Partikelgrößenverteilung bestätigt diese starke Schwächung des Stabilisierungsmechanismus mit der Folge von Brückenbildungen durch hydrolisierte Pektinabschnitte zwischen benachbarten Proteinpartikeln, Partikelaggregationen und Flockenbildung (Abb. 5.70). Die Brückenbildung durch unvollständig mit Pektin bedeckte Proteinteilchen spiegelt sich in der Verschiebung der Partikelgrößen wider, an denen die Maxima der Streuungskapazität auftreten. Während durch eine Erhitzung bei 95 °C die Verschiebung in der Partikelgrößenverteilung zu klei-

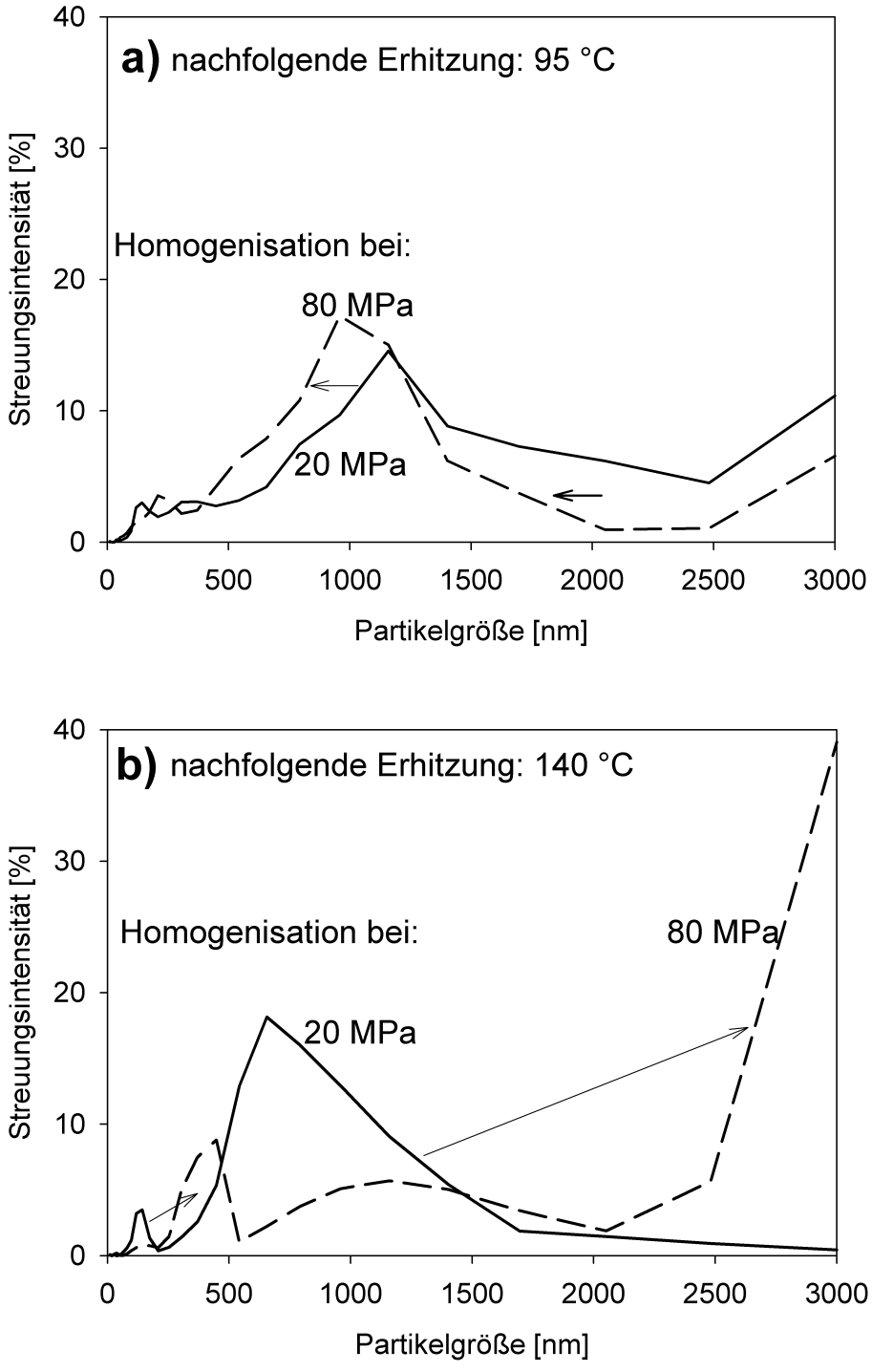

Abb. 5.70: Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Homogenisationsdrücke auf System Z bei unterschiedlichen nachfolgenden Erhitzungstemperaturen.

neren Einheiten erhalten bleibt (Abb. 5.70a), geht diese durch eine Erhitzung bei 140 °C verloren (Abb. 5.70b). Bei dem Vergleich der unter a) und b) dargestellten Partikelgrößenverteilungen in Abbildung 5.70 ist zu bedenken, dass der Unterschied nur auf der unterschiedlichen Erhitzung beruht. Die Ausgangsverteilung, in der beide Biopolymere nach der Homogenisation vorliegen, ist grundsätzlich bei a) und b) nur von der Druckhöhe abhängig. Die deutlichen Abweichungen nach einer Erhitzung bei 140 °C aufgrund von Brückenbildungen zwischen benachbarten Teilchen bestätigt eine Beeinträchtigung des Pektins in seiner Rolle, alle Proteinpartikel vollständig zu bedecken und auf sterischem Weg Reassoziationen zu vermeiden.

Zur Prüfung auf Veränderungen des Molekulargewichts des Polysaccharids wurden daher zusätzliche Versuchsreihen an gesäuerten Milchserumlösungen mit Pektin, aber ohne Milchprotein- und Zuckerzusatz, durchgeführt. Die Pektinsysteme durchliefen die gleiche Prozessbehandlung wie die bereits untersuchten Mischsysteme (Abb. 5.60). Bei der darauf folgenden Bestimmung der inneren Viskosität ermöglicht der fehlende Zucker- und Milchproteinzusatz eine zweifelsfreie Zuordnung der Messergebnisse als innere Viskosität des Pektins. Mit der Einheit "Liter pro Gramm Biopolymer" beschreibt die innere Viskosität das Wasserbindungsvermögen des Polysaccharids, also das von ihm beeinflusste Serumvolumen. Da diese Eigenschaft vom Molekulargewicht des Biopolymers abhängt, wird die innere Viskosität als Maß für das mittlere Molekulargewicht von Makromolekülen angewendet (Mark, 1938; Houwink, 1940; Harding, 1997).

Abbildung 5.71 zeigt den Einfluss ausgewählter Temperatur und Scherbehandlungen auf die innere Viskosität und damit das Molekulargewicht von Pektin in gesäuertem Milchserum. Während

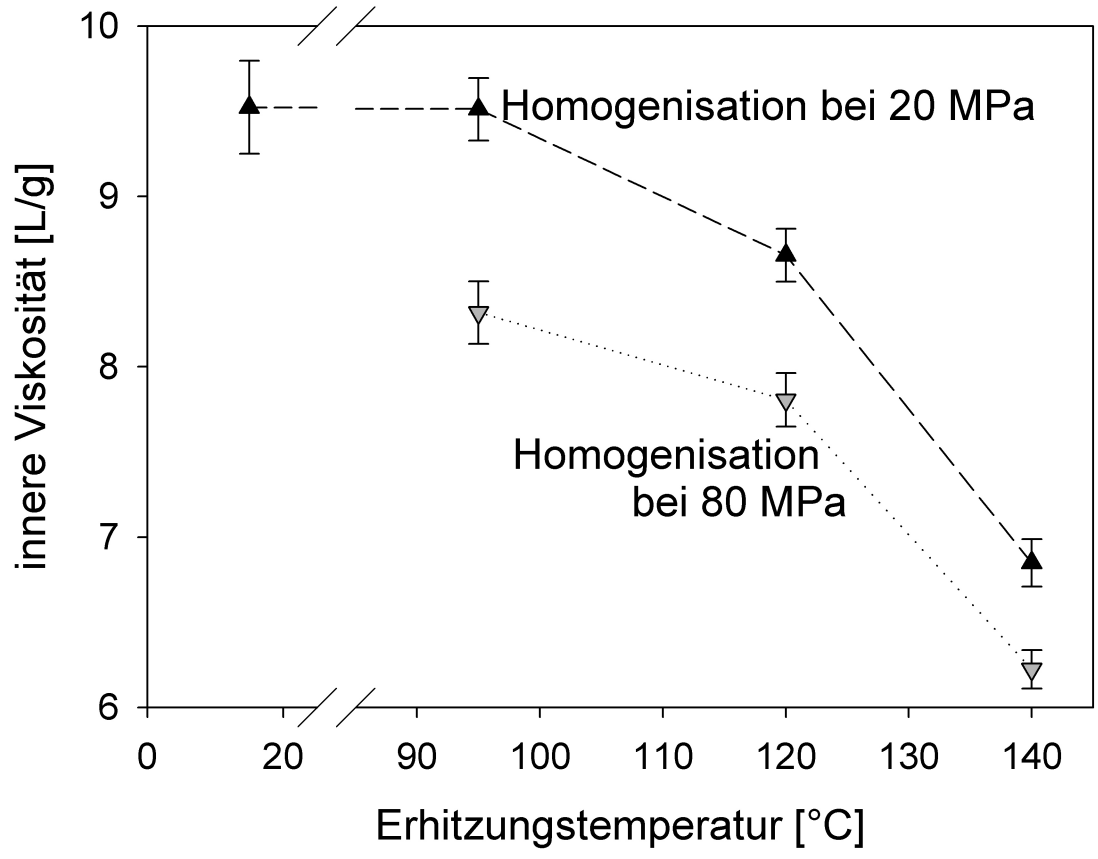

Abb. 5.71: Einfluss von Erhitzungstemperatur und Homogenisationsdruck auf die innere Viskosität von Pektin in gesäuertem Milchserum.

bei 20 MPa homogenisierte und anschließend auf 95 °C erhitzte Proben keine signifikanten Unterschiede zu unerhitzten homogenisierten Proben aufweisen (Abb. 5.71), wird ein deutlicher Abfall der Messwerte sowohl bei einer Homogenisation bei 80 MPa wie auch bei einer Erhitzung auf 120 oder 140 °C beobachtet. Diese reproduzierbare Verminderung der Wasserbindefähigkeit ist ein direkter Nachweis des prozessparameterabhängigen Verlusts der Pektinfunktionalität aufgrund einer verstärkten partiellen Hydrolyse des Makromoleküls. Dies resultiert in einem niedrigeren Molekulargewicht, das bereits als Hauptursache für den Verlust des Stabilisierungsvermögens des Pektins im Mischsystem vermutet wurde.

Mit der von der Wahl der Prozessvariablen abhängigen Verminderung des Molekulargewichts des Pektins ist ein weiterer und entscheidender prozessinduzierter Effekt auf molekularer Ebene mit Auswirkungen auf das Mischungsverhalten des Biopolymersystems identifiziert. Dieses Ergebnis fügt sich stringent in das im vorangegangenen Kapitel aufgebaute Gesamtbild prozessinduzierter Mechanismen ein, die im Zusammenspiel zu einer Phasentrennung des Mischsystems führen.

Zu nennen ist hier beispielsweise der bereits erwähnte doppelte Potentialwechsel an den Biopolymerkomplexeinheiten bei bestimmten Prozessbedingungen. Die Adsorption hydrolisierter, glatter Pektinabschnitte und die damit fehlende elektrostatische Abstoßung ist ein Faktor, wodurch die Flockenbildung bei zu stark erhitzten Mischungen gefördert wird. Mit steigenden Temperaturen sinkt der pH-Wert der ohnehin schon sauren Milchproteinsuspension noch weiter ab. Verschiebungen in Milchsalzgleichgewichten, eine unvollständige Polyionisation der Milchproteine und ein weiterer Zerfall der Proteinpartikel sind die Folgen (WALTER, 1998). Damit erhöht sich einerseits die zu stabilisierende Proteingesamtoberfläche, während andererseits das Stabilisierungsvermögen des Pektins durch Hydrolyse der Hauptkette und Abspaltung von funktionellen Verzweigungen stark vermindert wird. Die Destabilisierung steigt dadurch sozusagen quadratisch an.

Die Stabilität des Mischsystems hängt zwar grundsätzlich von dem Verhältnis von Pektin zur Proteinmenge im Mischsystem ab, wird aber entscheidend durch prozessbedingte Veränderungen im Molekulargewicht bzw. in dem Aufbau der Makromoleküle geprägt, aus dem sich das elektrostatische Ladungsmuster der polyionischen Biopolymere ergibt. Die Art und Ausbildung des Biopolymerkomplexes wird durch diese Ladungsmuster bestimmt und entscheidet über das Mischungsverhalten des Biopolymersystems.

5.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zu Pektin und Milchprotein

Für eine systematische Untersuchung gradueller Unterschiede in der Mikrostruktur von gesäuerten Milchproteinmischsystemen wurde als Hydrokolloidzusatz hochverestertes Pektin ausgewählt. Auch bei diesem Beispielsystem beruht eine erfolgreiche Langzeitstabilität auf der Ausbildung einer durchgehenden, schwachen Netzwerkstruktur. Als Bezugssystem wurde folgende Mischung gewählt:

Basis: auf pH 4,0 gesäuertes Milchsystem mit 1,2 % Protein.

Hydrokolloidzusatz: 0,32 % hochverestertes Pektin.

Aus Untersuchungen an Modellsystemen in der Grundlagenforschung ist bekannt, dass die Stabilisierung bei gesäuerten Milchprotein-Pektinsystemen auf einem zweistufigen Mechanismus beruht. Die erste Stufe des Stabilisierungsmechanismus besteht in einer Elektroadsorption von carboxylierten Abschnitten des Pektinmakromoleküls an die Oberfläche der Proteinpartikel. Schwankungen des pH-Werts haben im Vergleich zum ersten untersuchten System mit Carrageenan bei diesem Mischsystem einen größeren Einfluss auf die elektrostatische Wechselwirkung. Eine Ursache für diesen starken Einfluss des pH-Werts liegt in der schwächeren Elektronegativität der Carboxylgruppen von Pektin. Die Protonierung der Säuregruppen des Makromoleküls entscheidet über die Gesamtladung des Biopolymers.

Die zweite Stufe des Stabilisierungsmechanismus beruht auf der Ausbildung einer durchgehenden, schwachen Netzwerkstruktur. Voraussetzung für eine belastbare, gleichmäßig ausgeformte Netzwerkstruktur ist die Ausbildung von Schlaufen aus neutralen Abschnitten des Pektinmakromoleküls, die in genügender Distanz von den Proteinpartikeln abstehen. Damit wird nicht nur eine Aggregation und Flockenbildung der ausgefällten Milchproteincluster sterisch verhindert, es erfolgt zudem auch eine Einbindung der Biopolymerkomplexe über hydrophobe Anlagerungen mit geeigneten Abschnitten benachbarter Partner in das gewünschte schwache Netzwerk.

Ein ungünstiges Verhältnis der reaktiven Oberflächen von Pektin und Proteinpartikeln fördert dagegen einen unvollständigen Netzwerkaufbau mit unerwünschten Aggregationserscheinungen.

Auf dieser Basis wurden folgende Experimente konzipiert und durchgeführt:

Auswirkungen des Homogenisationsdrucks auf die zu stabilisierende Gesamtoberfläche

Drei Mischungen mit verschiedenen Verhältnissen von Protein- und Pektinmenge dienten als Ausgangspunkt für die Untersuchung des Einflusses von Scherkräften auf das Stabilisierungsvermögen. Durch Variation des Homogenisationsdrucks wurden im ersten Prozessschritt unterschiedliche Proteinpartikelgrößenverteilungen erzielt. Dies ermöglichte eine differenziertere Betrachtung des Mikrostrukturaufbaus für die verschiedenen Biopolymerverhältnisse. Insbesondere graduelle Unterschiede im Grenzbereich zu instabilen Mischungen konnten so verdeutlicht werden, da der Feinpartikelanteil und damit entsprechend die von Pektin zu bedeckende Proteingesamtoberfläche mit steigendem Homogenisationsdruck zunehmen.

Bei hohen Druckwerten während der Homogenisation wurde in Experiment Nr.10 (Kap.5.2.2)

deutlich, dass sich Verschiebungen in der Proteinpartikelgrößenverteilung in Richtung zu einem höheren Feinpartikelanteil ergeben. Diese wirkten sich positiv auf die Stabilität des Mischsystems aus. Der prozessinduzierte Effekt beruht darauf, dass der Partikeldurchmesser bei einer vereinfachten Betrachtung als Kugelmodell in verschiedene grundlegende physikalische Gleichungen eingeht. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass für einen positiven Gesamteffekt im Sinne einer Langzeitstabilisierung dieser Feinpartikelanteil vollständig in das Pektinnetzwerk eingebunden werden muss. Dies gelingt nur bei einem in Bezug auf die zu stabilsierende Proteingesamtoberfläche im Überschuss dosierten Pektin. Grundsätzlich zeigte sich zwar ein Biopolymerverhältnis von 10:1 (Protein zu Pektin; System Y) als ausreichend für den Aufbau des zweistufigen Stabilitätsmechanismus. Jede weitere Erhöhung der Pektindosage (z.B. 3,75:1; System Z) führte zu einer deutlichen Qualitätssteigerung unter der Voraussetzung, dass der Feinpartikelanteil in der gemeinsamen Biopolymerstruktur integriert ist.

Beispiel für Auswirkungen minorer Komponenten auf die Mischungsstabilität

Ein Biopolymerverhältnis von 10:1 (System Y) hatte sich in der vorangegangenen Versuchsreihe zwar als noch ausreichend erwiesen, prozessinduzierte Verbesserungen, wie beispielsweise durch die Erhöhung des Homogenisationsdruckes, konnten damit jedoch nicht mehr realisiert werden. Dies deutete auf fehlende Stabilisierungsreserven dieser Mischung hin. Für die praktische Anwendung bedeutet dies, dass eventuell bereits eine naturstoffbedingte Schwankung der Mischungszusammensetzung nicht mehr ausgeglichen werden kann. Um dies zu klären, wurde an diesem System eine Erhöhung der Ionenstärke durchgeführt, um Schwankungen in der Serumzusammensetzung zu simulieren.

System Y konnte eine Zugabe von minoren Komponenten nicht ausgleichen (Experiment Nr.11; Kap.5.2.3). Die schwächere Ausbildung des Biopolymerkomplexes aufgrund der im Vergleich zur Proteinpartikelgesamtoberfläche knapp bemessenen Pektinmenge machte das System anfälliger auf die Auswirkungen einer höheren Ionenstärke. Diese reduzierte die Dicke der diffusen Doppelschicht und förderte damit nach der DLVO-Theorie Aggregationen aufgrund des Überwiegens der van-der-Waals-Kräfte. Diese wurden nur unzureichend kompensiert, was sich in einem deutlich höheren abzentrifugierbaren Sedimentanteil widerspiegelte.

Einfluss der Vorerhitzung bzw. Molkenproteine

Die Ionenstärke war jedoch nicht der einzige Faktor, der die Ausführung der elektrostatischen Adsorption bestimmt. Auch verschiedene Oberflächenladungsbedingungen der Proteinpartikel in Abhängigkeit der Vorbehandlung der Milchproteine spielten eine Rolle. In der vorerhitzten Variante wurde die Oberfläche von Molkenprotein-Caseinkomplexen beeinflusst, in den nicht vorerhitzten Systemen dagegen vor allem durch die von Caseinen allein. Entsprechend unterschiedliche Partner standen dann den Carboxylgruppen des Pektins zum Aufbau des Biopolymerkomplexes zur Verfügung. Zur Erfassung gradueller Unterschiede beim Erhitzungsschritt wurde wiederum der Homogenisationsdruck stufenweise variiert, und zwar bei den beiden Mischungszusammensetzungen, welche sich im vorangegangenen Experiment als grundsätzlich stabil erwiesen hatten.

In Experiment Nr.12 wurde deutlich, dass eine Vorerhitzung, d.h. eine partielle Bedeckung von

Proteinpartikeloberflächen mit Molkenproteinkomplexen, sich positiv auf die Stabilität des Gesamtsystems auswirkt. Mischungen gleicher Zusammensetzung, die keiner Vorerhitzung unterzogen wurden, zeigten eine höhere Reaggregationsrate, die durch einen deutlich erhöhten Durchmesser des Grobpartikelanteils sichtbar wurde. Neben möglichen Komplexbildungen zwischen Pektin und denaturierten Molkenproteinkomplexen an der Caseinpartikeloberfläche wirkte sich auch der bessere Zusammenhalt der ausgefällten Proteinpartikel durch die kovalenten Bindungen zwischen den Casein- und Molkenproteinfraktionen positiv auf die Stabilität aus. Somit wurde ein erhitzungsbedingtes Auseinanderbrechen der ausgefällten Proteinpartikel in einen zu hohen, nicht stabilisierbaren Feinpartikelanteil verhindert. Bei fehlender Vorerhitzung zerfielen die Proteinpartikel dagegen zu einem hohen Anteil kleiner, von Pektin nur unvollständig bedeckbarer Teilchen. Dies spielt besonders bei unter hohen Drücken homogenisierten Systemen eine Rolle, da in diesem Fall bereits eine große Feinpartikelfraktion vorliegt, die nicht vor einer Stabilisierung weiter zerfallen sollte. Denn bei einer partiellen Bedeckung mit Pektin würde eine Reassoziation zu größeren Flocken gefördert, da sich in diesem Fall freie Abschnitte des Pektinmakromoleküls an mehreren benachbarten Proteinpartikeln anlagern und so wie eine Brücke wirken.

Einfluss des finalen Erhitzungsschrittes auf das gesäuerte Pektin-Milchproteinsystem

Nachdem die Vorbehandlung eines der beiden Partner für die gemeinsame Biopolymermischstruktur bereits makroskopisch sichtbare Stabilitätsunterschiede deutlich gemacht hatte, galt das nächste Experiment dem eigentlichen Erhitzungsschritt nach der Homogenisation. Diesen durchliefen Milchprotein und Pektin gemeinsam. Dazu ist die pH-Wertabhängigkeit der Biopolymerkomplexausbildung einerseits und die Temperaturabhängigkeit des pH-Werts andererseits zu beachten. Aufgrund der Ionenzusammensetzung wirkt sich eine Temperaturerhöhung in der komplexen, milchbasierten Mischung auch auf den pH-Wert aus. Schwankungen im pH können jedoch wegen der niedrigeren Elektronegativität der Carboxylgruppen große Auswirkungen auf die Ausbildung des Biopolymerkomplexes haben. Der real vorliegende pH-Wert kann die Hydrolyse von Teilen des Makromoleküls hervorrufen und damit die Zusammensetzung der Biopolymere beeinflussen. Zudem war grundsätzlich mit einem gewissen Grad an Polydispersität zu rechnen, da alle Inhaltsstoffe im Mischsystem natürlichen Ursprungs waren. Diese Unschärfe in den Mischungseigenschaften hatte zur Folge, dass eine optimale Temperaturführung schwer festzulegen war, da man in der Realität mit einem mehr oder weniger optimalen Temperatur/pH-Bereich arbeitet.

Zur Erfassung gradueller Mikrostrukturunterschiede, die sich aus unterschiedlichen homogenisationsdruckabhängigen Partikelgrößenverteilungen der Milchproteine ergaben, wurde für Experiment Nr.13 die Biopolymermischung mit dem deutlichsten Einfluss des Homogenisationsdrucks ausgewählt (Protein zu Pektin = 3,75:1; System Z). Der Prozessparametereinfluss erfolgte damit in zwei Dimensionen, zum Ersten durch Steigerung des Homogenisationsdrucks und zum Zweiten durch Erhöhung der Temperatur im nachfolgenden Erhitzungsschritt. Da die Stabilitätssteigerung mit steigendem Homogenisationsdruck bei dieser Mischung auf die bessere Integration von Proteinpartikeln mit kleinerem Durchmesser zurückzuführen war, erlaubte diese zweidimensionale Vorgehensweise differenziertere Rückschlüsse auf die Rolle, welche die Temperaturführung bei

der Fixierung des Biopolymerkomplexes spielt.

In Experiment Nr.13 wurde deutlich, dass es bei höherer Erhitzungstemperatur zu Veränderungen in der Qualität der Ausbildung des Biopolymerkomplexes kommt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit stieg mit Erhöhung der Erhitzungstemperatur. Ebenso kam es zu Veränderungen im Sedimentgewicht und in weiteren Mischgeleigenschaften, wie der Clustergröße und der Netzwerkstabilität. Für eine optimale Funktionalität war neben der elektrostatischen Assoziation der Bereiche des Pektinmakromoleküls mit Carboxylgruppen an der Proteinpartikeloberfläche auch die räumliche Verteilung der schlaufenförmig abstehenden, neutralen Abschnitte des Pektins sehr wichtig. Deren Anordnung wird zum einen durch die elektrostatischen Verhältnisse, wie beispielsweise die pH-abhängige Dissoziation von Carboxylgruppen, bestimmt. Zum anderen spielt das Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Oberflächen im Gesamtsystem eine Rolle, da thermodynamisch gesehen die Minimierung exponierter hydrophober Oberflächen in verdünnten Systemen mit einem hohen Anteil an Wassermolekülen durch deren Freisetzung aus quasi-kristallinen Bereichen der Serummatrix die größte Entropiesteigerung bringt.

In der hier verwendeten komplexen Mischung waren zudem die Auswirkungen weiterer temperaturabhängiger Effekte zu berücksichtigen, wie beispielsweise die Rolle des Calciumphosphatgleichgewichts in milchbasierten Systemen. So beeinflussen Verschiebungen im gelösten Anteil der Salze über die Veränderung der Ionenstärke auch die Ausmaße der diffusen Doppelschicht. Zwar hat sich der Abfall des zeta-Potentials nach der DLVO-Theorie als zu gering erwiesen, um allein van-der-Waals-Kräfte für eine Partikelaggregation verantwortlich zu machen. Ein doppelter Potentialwechsel direkt an der Partikeloberfläche kann jedoch als eine der Ursachen für die starke Sedimentbildung bei Temperaturen von 140 °C angesehen werden. Verschiedene Messergebnisse, wie z.B. die Strukturstabilität, deuteten zudem eine Degradation der Biopolymere bei hohen Temperaturen an.

Einfluss einer partiellen Hydrolyse des Polysaccharids

Eine Überprüfung auf erhitzungsbedingte Zersetzung von Biopolymeren in diesem Mischsystem erfolgte an einer Pektinlösung in gesäuertem Milchserum ohne Zucker- und Proteinzusatz. Die gesäuerten Polysaccharidansätze wurden an der Pilotanlage ausgewählten Homogenisations- und Erhitzungsbedingungen unterzogen. In diesen zusätzlichen Messungen bestätigte sich die Vermutung, dass die Hauptursache für den Verlust des Stabilitätsvermögens der Biopolymermischung nach Erhitzungen im Bereich von 120 bis 140 °C in der Hydrolyse von Teilen des Pektinmakromoleküls liegt. Deutlich wurde dies in einem signifikanten Abfall der inneren Viskosität bei Kombinationen mit starken Prozessbelastungen, wie z.B. bei einer Homogenisation bei 80 MPa mit nachfolgender Erhitzung auf 140 °C.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Druckverhältnisse im ersten Prozessschritt (der Homogenisation) die Mischungsintensität und Raumverteilung beider Biopolymere bestimmen. Damit wird die Grundlage für den Reaktionsverlauf im nachfolgenden Erhitzungsschritt gelegt. Die Erhitzungstemperatur darf nicht zu hoch gewählt werden, da sonst eine Degradation der Biopolymere auftritt. Im Bereich von 73 bis 95 °C ist genügend Flexibilität innerhalb des Zusammenspiels der einzelnen Mischsystemkomponenten vorhanden, um erfolgreich ein stabiles, durchgehendes, schwaches Netzwerk aufzubauen.

6. Resümee und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen an zwei ausgewählten Beispielen, wie das Zusammenspiel verschiedener physikalisch-chemischer Mechanismen durch die Auswahl relevanter Prozessparameter gesteuert werden kann. Damit wird schon an der Basis das thermodynamische Verhalten von Biopolymersystemen entscheidend beeinflusst. Eigenschaften und Stabilität von Mischungen hängen damit nicht allein von der Zusammensetzung ihrer einzelnen Inhaltsstoffe ab, sondern nachdrücklich auch von ihrer Herstellungsgeschichte.
Besonders deutlich wurde der Prozesseinfluss bei Mischungen, die sich im Grenzbereich zu stabilen, das ganze Volumen umfassenden, durchgehenden Strukturen befinden. In diesen Fällen können indirekte Effekte, wie beispielsweise die Auswirkung einer Veränderung der hydrophoben Gesamtoberfläche auf die Entropie der Serummatrix, im Zusammenspiel mit anderen Wechselwirkungen der entscheidende Schritt sein, um eine durchgehende Netzwerkstruktur aufzubauen, obwohl die Volumenanteile der beteiligten Biopolymere im eigentlichen Sinne zu gering sind.
Kompensiert wird dieser knappe Volumenanteil der beteiligten Makromoleküle durch die Beteiligung fest assoziierter Serummoleküle bei der Einstellung einer thermodynamisch günstigen Gesamtstruktur. Treibende Kraft für diese Gruppierung und Anordnung aller im Volumen vorhandenen Komponenten ist die Notwendigkeit, im Mischsystem alle thermodynamisch begründeten Gesetzmäßigkeiten unter Berücksichtigung elektrostatischer Wirkungen zu erfüllen. Dabei ergeben sich neue Partikelaggregate und -formen, die ihre Existenz der Tatsache verdanken, dass ihre Bildung und die damit verbundenen Auswirkungen ein thermodynamisch günstiges Gesamtsystem ergeben.

Die Entwicklung von Herstellungsverfahren für neuartige Biopolymerpartikel mit definierten Formfaktoren, die wertvolle funktionelle Eigenschaften hinsichtlich Sensorik, Texturaufbau oder ernährungsphysiologischer Forderungen ermöglichen, bietet in diesem Zusammenhang sehr interessante Forschungsziele, die auf dieser Arbeit aufbauen können.
Konkret sind hier einige Aspekte zu nennen, welche besondere Aufmerksamkeit verdienen:

1.) Weiterführende Überlegungen zur Ergänzung der Analytik:
   Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ergibt die Kombination ausgewählter rheologischer Kennzahlen mit einer parallel durchgeführten Partikelgrößenmessung eine fundierte Basis zur Interpretation der Auswirkungen verschiedener Prozessparameter auf ein Mischsystem.
   Für eine detaillierte Beschreibung von Mikrostruktur und von Grenzfällen mit unzusammenhängenden Biopolymerflocken wäre jedoch eine chemische Analytik der Zusammensetzung einzelner Phasenanteile und Struktureinheiten sehr hilfreich.
   Als Trennungssystem empfiehlt sich in diesem Fall eine asymmetrische Feldflussfraktionierung (FFF) mit den entsprechenden nachgeschalteten Detektorsystemen zur quantitativen Analytik der Biopolymeranteile. Eine solche Anlage stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung, hätte aber, wie auch Testmessungen zeigten, gegenüber anderen Trennungssystemen wie HPLC o.ä.

den Vorteil, ohne Füllmaterial in der Trennungssäule zu arbeiten (KLEIN, 1998). Dieser Aufbau ohne Füllkörper verhindert grundsätzlich, dass Biopolymerkomplexe durch das Analyseverfahren in ihrer Form geändert werden. Die Bildung von Artefakten aufgrund mechanischer Beanspruchung oder starker lokaler chemischer Gradienten kann damit sicher ausgeschlossen werden.

In Kombination mit rheologischen Methoden ist damit unter Verwendung des Einstein-Ansatzes zur Bestimmung der inneren Viskosität eine differenzierte Betrachtung des Wasserbindungsverhaltens verschiedener Biopolymerkomplexe möglich, da der hierfür notwendige Formfaktor mittels FFF bestimmt werden kann (EINSTEIN 1906 & 1911). Dadurch wird eine systematische Bewertung der thermodynamisch bedingten Serum-Biopolymer-Einheiten und ihrer Entstehungsbedingungen ermöglicht. Während diese Arbeit hier von Mischungseigenschaften Rückschlüsse auf den Gesamtaufbau der Mikrostruktur vollziehen konnte, wäre durch ein solches Vorgehen der nächste Schritt zu einem Verständnis der eigentlichen Grundbausteine der Mikrostruktur möglich. Zur Ergänzung ist in diesem Zusammenhang die Anwendung einer FTIR-Analytik zur Identifizierung der an Bindungen beteiligten funktionellen Gruppen empfehlenswert. Abgerundet werden kann die Untersuchung durch bildgebende Analysemethoden ausgewählter Proben. Sehr anschauliche elektronenmikroskopische Aufnahmen von Carrageenan-Caseinstrukturen wurden bereits publiziert (SPANGNUOLO ET AL., 2005). Auch ist prinzipiell die kovalente Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an verschiedene Polysaccharide möglich, so dass über konvokale Laserscanningmikroskopie eine eindeutige Zuordnung von phasengetrennten Mikrostrukturbereichen möglich ist.

2.) Weitere Differenzierung der Rolle einzelner Biopolymere in komplexen Mischungen:

Hauptziel dieser Arbeit war, an zwei ausgewählten praxisrelevanten Beispielmischungen den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf Biopolymermischungen aufzuzeigen. Für eine systematische Untersuchung der am Strukturaufbau beteiligten Serum-Biopolymereinheiten mit der unter 1.) genannten Methodik ist jedoch ein Schritt zurück hin zu einfacher aufgebauten Modellsystemen ohne Molkenproteine nötig, um die Rolle der Caseinmicellen und ihr pH-abhängiges Wasserbindungsvermögen im Detail zu erfassen. Denn die Caseinmicelle stellt in den hier bearbeiteten Mischsystemen ein Schlüsselelement dar, da sie neben ihrem Einfluss auf die minoren Serumkomponenten über das Calciumphosphatgleichgewicht auch verschiedene Umstrukturierungsmöglichkeiten besitzt, welche die Entropie des Gesamtsystems entscheidend beeinflussen können.

Die Versuche auf der Pilotanlage sollten daher durch Versuchsreihen mit Mischungen aus nativen Caseinmicellen in Milchserum und Carrageenan ergänzt werden. Zur Herstellung empfiehlt sich eine Kombination aus Mikro- und Ultrafiltration nach KERSTEN (2001). Zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen würden solche Versuche eine gut begründete Interpretationsgrundlage bieten, um durch Gegenüberstellung der Formfaktoren der oberflächenmodifizierten Caseinmicellen und der nativen Caseinmicellen Rückschlüsse auf die Mikrostruktur ihres micellaren Aufbaus zu ziehen.

3.) Erweiterung der theoretischen Grundlagen:

Bei der Darstellung der für diese Arbeit vorhandenen theoretischen Grundlagen hat sich gezeigt, dass die Berechnungsformeln des chemischen Potentials für die hier relevanten Mischungen entscheidende Einflussgrößen nicht berücksichtigen.

Ein wichtiges Themenfeld ist in diesem Zusammenhang die Ergänzung der Grundlagen durch einen theoretischen Gesamtansatz, der die in Kapitel 2 benannten Defizite der aktuellen Modellvorstellungen im Hinblick auf die Anwendbarkeit der Modelle bei Biopolymermischungen mit geladenen Makromolekülen kompensiert. Unumgänglich ist dabei die Anpassung der Berechnung der für die theoretische Betrachtung grundlegenden Debyeschen Länge r_D. Diese gilt in der vorliegenden Form nur für kugelförmige Modelle und ist im Sinne der Anwendbarkeit auf Biopolymerlösungen auf entfaltete Kettenformen zu erweitern. In Kombination mit der bereits unter 1.) genannten Untersuchung des Formfaktors von Biopolymerkomplexen ergibt sich somit ein leistungsfähiger Weg für eine Gesamtbetrachtung des thermodynamischen Verhaltens eines breiten Spektrums von Biopolymermischungen ohne die aktuell geltenden Einschränkungen.

Anhang

Literaturverzeichnis

Alizadeh-Pasdar N. & Li-Chan C.Y. (2000) Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 328-334.

Antonov Ju.A., Grinberg V.Ja. & Tolstoguzov V.B. (1979) Thermodynamische Aspekte der Verträglichkeit von Eiweißen und Polysacchariden in wässrigen Medien. 2. Mitt. Phänomenologie der thermodynamischen Unverträglichkeit von Eiweißen und Polysacchariden in wässrigen Medien. Die Nahrung, 23, 6, 597-610.

Antonov Yu.A. & Gonçalves M.P. (1999) Phase separation in aqueous gelatin-kappa-carrageenan systems. Food Hydrocolloids, 13, 517-524.

Albertsson, P.A. (1971) Partition of Cell Particles and Macromolecules. Wiley-Interscience, New York.

Aoki T., Suzuki H. & Imamura T. (1974) Formation of soluble casein in whey protein-free milk heated at high temperatures. Milchwissenschaft, 29, 589-594.

Arsenault G.P. & Yaphe W. (1965) Effect of Acetaldehyde, Acetic Acid and Ethanol on the Resorcinol Test for Fructose, Analytical Biochemistry, 13, 133-142.

Atkins P.W. (1990) Physikalische Chemie. VCH, Weinheim.

Augustin M.A., Puvanenthiran A. & McKinnon I.R. (1999) The effect of k-carrageenan conformation on its interaction with casein micelles. International Dairy Journal, 9, 413-414.

Bake K. (2003) Handbuch der Milch- und Molkereitechnik. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen.

Bals A. (2002) Verfahrenstechnik und Substratfaktoren beim Aufschäumen mit Membranen. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan, Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr.105, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Beyer H.J. (1990) Zum Einfluß der Proteinkonzentration auf das Denaturierungsverhalten der Molkenproteine sowie die damit verbundenen rheologischen Veränderungen. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Bixler H.J., Johndro K. & Falshaw R. (2001) Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. Food Hydrocolloids, 15, 619-630.

Boulenguer P. & Laurent M. A. (2003) Comparison of the stabilisation mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin and soluble soybean polysaccharide (SPP). In: Voragen F., Schols H. & Visser R. (Ed.) Advances in pectin and pectinase research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Braudo E.E. & Antonov Y.A. (1993) Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. In: Schwenke K.D. & Mothes R. (Ed.) Food Proteins Stucture and Functionality. VCH, Weinheim.

Bulca S. & Kulozik U. (2004) Heat induced changes in native casein micelles obtained by microfiltration. Bulletin International Dairy Federation, 389, 36-39.

Caram-Lelham N., Hed F. & Sundelöf L-O. (1997) Adsorption of Charged Amphiphiles to Oppositely Charged Polysaccharides - A Study of the Influence of Polysaccharide Structure and Hydrophobicity of the Amphiphile Molecule. Biopolymers, 41, 765-772.

Clark A.H. (2000) Direct analysis of experimental tie line data (two polymer-one solvent systems) using Flory-Huggins theory. Carbohydrate Polymers, 42, 337-351.

Cotterill R.M.J. (2002) Biophysics. John Wiley & Sons, New York.

Czeslik C., Seemann H. & Winter R. (2001) Basiswissen Physikalische Chemie. Teubner, Stuttgart.

Dalgleish D.G. (1983) Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. Journal of Dairy Research, 50, 331-340.

Dalgleish D.G. & Morris E.M. (1988) Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoresis and hydrodynamic properties of the particles. Food Hydrocolloids, 2, 4, 311-320.

Dannenberg F. (1986) Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Dannenberg F. & Kessler H.G. (1988) Reaction-Kinetics of the Denaturation of Whey Proteins in Milk. Journal of Food Science, 53, 1, 258-263.

de Carvalho Junior I.C. (1986) Über das Fliessverhalten von Ultrafiltrationskonzentraten aus Milch und dessen Abhängigkeit von der Wärmebehandlung und der Tiefkühllagerung. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Debye P. & Hückel E. (1923) Zur Theorie der Elektrolyte. Physikalische Zeitschrift, 9, 24, 185-206.

de Kruif C.G. (1999) Casein micelle interactions. International Dairy Journal, 9, 3-6, 183-188.

de Kruif C.G. & Tuinier R. (2001) Polysaccharide protein interactions. Food Hydrocolloids, 15, 555-563.

de Vries J. (2002) Interaction of carrageenan with other ingredients in dairy dessert gels. In: Wiliams P.A. & Philips G.O. (Ed.) Gums and stabilisers for the food industry Vol. 11, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Dickinson E. (1998) Stability and rheological implications of electrostatic milk-protein and polysaccharide interactions. Trends in Food Science and Technology, 9, 347-354.

Doi M. & Edwards S.F. (1986) The theory of polymer dynamics. Oxford University Press, Oxford.

Doublier J.L., Garnier C., Renard D. & Sanchez C. (2000) Protein-polysaccharide interactions. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 5, 202-214.

Edmond E. & Ogston A.G. (1968) An Approach to the Study of Phase Separation in Ternary Aqueous Systems. Biochemical Journal, 109, 569-576.

Einstein A. (1906) Eine neue Bestimmung der Moleküldimension. Annalen der Physik, 19, 289-306.

Einstein A. (1911) Berichtigung zu meiner Arbeit "Eine neue Bestimmung der Moleküldimension". Annalen der Physik, 34, 591-592.

El-Shobery M.A.R. (1983) Auswirkung thermischer Verfahren auf das Proteinsystem der Milch. Dissertation am chemischen und physikalischen Institut der süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwissenschaft, TU München-Weihenstephan.

Falshaw R., Bixler H.J. & Johndro, K. (2001) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. Food Hydrocolloids, 15, 441-452.

Falshaw R., Bixler H.J. & Johndro K. (2003) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy application of extracts from the New Zealand red seaweed, Gigartina atropurpurea. Food Hydrocolloids, 17, 129-139.

Fink R. (1984) Über lagerungsbedingte Veränderungen von UHT-Vollmilch und deren reaktionskinetische Beschreibung. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Flory P.J. (1953) Principles of Polymer Chemistry. Cornell University Press, Ithaca.

Fuchs K., Friedrich C. & Weese J. (1996) Viscoelastic Properties of Narrow-Distribution Polymethylmethacrylates. Macromolecules, 29, 5893-5901.

Gehm L. (1998) Rheologie: Praxisorientierte Grundlagen und Glossar. Vincentz, Hannover.

Gerthsen C. & Vogel H. (1993) Physik. Springer, Berlin.

Glahn P.E. (1982) Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low pH. Progress in Food and Nutrition Science, 6, 171-177.

Graham H.D. & Mitchell G. (1963) Optimum Conditions for the Interaction of Food Gums with the Anthrone Reagent, Journal of Food Science, 28, 5, 547-553.

Grindberg V.Y. & Tolstoguzov V.B. (1997) Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. Food Hydrocolloids, 11, 145-148.

Guthy K. & Horak P. (1980) Zur Stabilität von Caseinmicellen während der Lagerung von direkt und indirekt erhitzter UHT-Magermilch. Milchwissenschaft, 35, 10, 600-603.

Haiger A. (1966) Biometrische Methoden in der Tierproduktion. Österreichischer Agrarverlag, Wien.

Hammelehle B. (1994) Die Direktsäuerung von Milch - Untersuchungen zur gezielten Einflußnahme auf Textur und Konsistenz gesäuerter Milchgele. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Hammer A. & Hammer K. (1988) Physikalische Formeln und Tabellen. J.Lindauer Verlag, München.

Hansen R.K. & Wichmann J. (1999) New improved FTIR spectroscopic method for carrageenan characterisation. Posterpräsentation: Gums and Stabilisers for the Food Industry 10, Wrexham.

Harding S.E. (1997) The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 68, 2-3, 207-262.

Harwalkar V. R., & Kalab M. (1981) Effect of acidulants and temperature on microstructure, firmness and susceptibility to syneresis of skim milk gels. Scanning Electron Microscopy, III, 503-513.

Hege W.U. (1984) Über die Bildung von Ablagerungen beim Erhitzen von Milch und Molke. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Hemar Y., Hall C.E., Nunro P.A. & Singh H. (2002) Small and large deformation rheology and microstructure of k-carrageenan gels containing commercial milk protein products. International Dairy Journal, 12, 371-381.

Hoefler A.C. (1991) Other Pectin Food Products. In: Walter R.H. (Ed.) The Chemistry and Technology of Pectin. Academic Press Inc, San Diego.

Holze R. (1998) Leitfaden der Elektrochemie. Teubner, Stuttgart.

Horak F.P. (1980) Über die Reaktionskinetik der Sporenabtötung und chemischer Veränderungen bei der thermischen Haltbarmachung von Milch zur Optimierung von Erhitzungsverfahren. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Horne D.S. (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. International Dairy Journal, 8, 171-177.

Houwink R. (1940) The interrelationship between viscosimetric and osmotic identified degree of polymerisation in high polymers. Journal der praktischen Chemie-Leipzig, 157, 1-3, 15-18.

Hunter R.J. (1987) Foundations of colloids science. Clarendon Press, Oxford.

Jenness R. & Patton S. (1967) Grundzüge der Milchchemie. Bayerischer Landwirtschaftsverlag, München.

Keim S. (2005) Hydrostatisch, thermisch, säure- und labinduzierte Casein- und Molkenprotein-Gele. Dissertation am Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Shaker Verlag, Aachen.

Kennel R. (1994) Hitzeinduzierte Aggregatbildung von Molkenproteinen - Größenbestimmung und Strukturanalyse. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Kersten M. (2001) Proteinfraktionierung mittels Membrantrennverfahren. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan, Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 3, Nr.709, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Kessler H.G. (1996) Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik Molkereitechnologie. Verlag A. Kessler, München.

Kiermeier F. & Lechner E. (1973) Milch und Milcherzeugnisse. Verlag Paul Parey, Berlin.

Kirchmeier O. (1982) Zur Reversibilität der Salzgleichgewichte in Milch. Milchwissenschaft, 37, 405-407.

Kirchmeier O., El-Shobery M. & Kirchmeier D. (1984) The heat-induced transition of whey proteins into the casein fraction. Milchwissenschaft, 39, 10, 588-590.

Kirchmeier O., Kamal N.M. & Klostermeyer H. (1985) Milcherhitzung und SH-Gruppenentwicklung. II. Milchwissenschaft, 40, 12, 722-723.

Kirchmeier O. (1987) Phasenumwandlungen in der Technologie der Milch. Volkswirtschaftlicher Verlag, München.

Klein T. (1998) Entwicklung und Anwendung einer Asymmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung zur Charakterisierung von Hydrosolen. Dissertation am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik, TU München.

Klupsch H.J. (1984) Saure Milcherzeugnisse - Milchmischgetränke und Desserts. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.

Koning M.M.G. & Visser H. (1992) Protein Interactions. An Overview. In: Visser H. (Ed.) Protein Interactions. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Konigsveld R. & Staverman A.J. (1968) Liquid-Liquid Phase Separation in Multicomponent Polymer Solutions. I. Statement of the Problem and Description of Methods of Calculation. Journal of Polymer Science: Part A-2, 6, 305-323.

Koxholt M. (2000) Untersuchungen zur Strukturierung und Strukturstabilisierung von Eiskrem - Einfluß verfahrenstechnischer Parameter und technologischer Variationen. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan, Shaker Verlag, Aachen.

Kozicki W. & Kuang P.Q. (1996) An alternative method for evaluation of intrinsic viscosity. Canadian Journal of Chemical Engineering, 74, 3, 429-432.

Krischer O. & Kast, W. (1978) Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik. Springer, Berlin.

Kudo S. (1980) The heat stability of milk: formation of soluble proteins and protein-depleted casein micelles at high temperatures. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 15, 255-263.

Langendorff V., Cuvelier G., Launay B. & Parker A. (1997) Gelation and flocculation of casein-micelle-carrageenan mixtures. Food Hydrocolloids, 11, 35-40.

Langendorff V., Cuvelier G., Michon C., Launay B., Parker A. & de Kruif C.G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. Food Hydrocolloids, 14, 273-280.

Larson R.G., Sridhar T., Leal L.G., McKinley G.H., Likhtman A.E. & McLeish T.C.B. (2003) Definitions of Entanglement Spacing and Time Constants in the Tube Model. Journal of Rheology, 47, 3, 809-818.

Lauber S. (2002) Beziehungen zwischen Struktur und Gelbildungseigenschaften posttranslational quervernetzter Milchproteine. Dissertation am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, TU München-Weihenstephan, Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr.107, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Leskauskaite D., Liutkevichius A., & Valantinaite A. (1998) Influence of the level of pectin on the process of protein stabilization in an acidified milk system. Milchwissenschaft, 53, 3, 149-152.

Lynch M.G. & Mulvihill D.M. (1994) The influence of caseins on the rheology of iota-carrageenan gels. Food Hydrocolloids, 8, 3-4, 317-329.

Mark H. (1938) Der feste Körper. Hirzel, Leipzig.

Maroziene A., & de Kruif C.G. (2000) Interaction of pectin and casein micelles. Food Hydrocolloids, 14, 391-394.

Mlleko S., Li-Chan E.C.Y. & Pikus, S. (1997) Interactions of kappa-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. Food Research International, Vol.30, No.6, pp.427-433.

Morris E.R., Rees D.A & Robinson G. (1980) Cation-specific Aggregation of Carrageenan Helices: Domain Model of Polymer Gel Structure. Journal Molecular Biology, 138, 349-362.

Morris V.J. (1985) Food gels - roles played by polysaccharides. Chemistry & Industry, 5, 159-164.

Nilsson S. & Piculell L. (1991) Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analysed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4.) Effects of site specific counterion binding. Macromolecules, 24, 3804-3811.

Nielsen L.E. (1994) Particulate-filled polymers. In: Nielsen L.E. & Landel R.F. (Ed.) Mechanical properties of polymers and composites. Dekker, New York.

Oakenfull D.G. (1991) The Chemistry of High-Methoxyl Pectins. In: Walter R.H. (Ed.) The Chemistry and Technology of Pectin. Academic Press Inc, San Diego.

O'Connell J.E. & Fox P.F. (1999) Heat-induced changes in the calcium sensitivity of caseins. International Dairy Journal, 9, 839-847.

Ozawa K., Niki R. & Arima S. (1984) Interaction of beta-Casein and kappa-Carrageenan: Viscosity and Turbidity under non-Gelling Conditions. Agricultural and Biological Chemistry, 48, 627-632.

Parker A., Brigand C., Miniou C., Trespoey A. & Vallee P. (1993) Rheology and fracture of mixed - and -carrageenan gels: Two-step gelation. Carbohydrate Polymers, 20, 253-262.

Parker A., Boulenguer P. & Kravtchenko T.P. (1997) Effect of the addition of high methoxyl pectin on the rheology and colloidal stability of acid milk drinks. In: Nishinary K. & Doi E. (Ed.) Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions. Plenum Press, New York.

Pauli W. & Valkó E. (1929) Elektrochemie der Kolloide. Springer, Wien.

Piculell L., Nilsson S. & Muhrbeck P. (1992) Effects of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. Carbohydrate Polymers, 18, 199-208.

Plock J. (1994) Zum Einfluss von Lactose auf die Denaturierung von Molkenproteinen in Molkenkonzentrat und auf die Ausbildung thermisch induzierter Gelstrukturen. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr.69, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Polyakov V.I., Grinberg V.Ya. & Tolstoguzov V.B. (1980) Application of Phase-Volume-Ratio Method for Determining the Phase Diagram of Water-Casein-Soybean Globulins System. Polymer Bulletin, 2, 757-760.

Pratchett T., Stewart I. & Cohen J. (2006) The Science of Discworld III: Darwin's Watch. Ebury Press, London.

Precht M. & Kraft R. (1992) Bio-Statistik 1. Oldenburg, München.

Rees D.A. (1972) Shapely polysaccharides. Biochemistry Journal, 126, 257-273.

Rehage G., Möller D. & Ernst O. (1965) Entmischungserscheinungen in Lösungen von molekularuneinheitlichen Hochpolymeren. Die Makromolekulare Chemie, 88, 232-255.

Reilly P.M., van der Hoff B.M.E. & Ziogas M. (1979) Statistical study of the application of the Huggins equation to measure intrinsic-viscosity. Journal of Applied Polymer Science, 24, 10, 2087-2100.

Renner E. (1982) Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen. Volkswirtschaftlicher Verlag, München.

Ridout M.J., Garza S., Brownsey G.J. & Morris V.J. (1996) Mixed iota-kappa carrageenan gels. International Journal of Biological Macromolecules, 18, 5-8.

Rodd A.B., Davis C.R., Dunstan D.E., Forrest B.A. & Boger D.V. (2000) Rheological characterisation of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. Food Hydrocolloids, 14, 445-454.

Rodriguez del Angel C. & Dalgleish D.G. (2006) Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder. Food Research International, 39, 472-479.

Samant S.K., Singhal R.S., Kulkarni P.R. & Rege D.V. (1993) Protein-polysaccharid interactions: a new approach in food formulations. International Journal of Food Science and Technology, 28, 547-562.

Scheffer F., Schachtschabel P., Blume H.P. Brümmer G., Hartge K.H. & Schwertmann U. (1992) Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Schenz T.W. (1997) Using rheology of weak gels to improve fluid foods. Food Technology, 51, 3, 83-85.

Schkoda P. (1999) Serumbindung und Rheologie fermentierter Milchprodukte. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr.89, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Schkoda P., Hechler A. & Kessler H. G. (1999) Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels. International Dairy Journal, 9, 269-273.

Schlosser M. (1973) Struktur und Reaktivität polarer Organometalle. Springer, Berlin.

Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S. & Hardy J. (1998) Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38, 8, 689-753.

Schorsch C., Jones M.G. & Norton I.T. (2000) Phase behaviour of pure micellar casein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. Food Hydrocolloids, 14, 347-358.

Schraml J. (1993) Zum Verhalten konzentrierter Produkte bei der Belagbildung an heißen Oberflächen. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Schreiber R. (2001) Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability. International Dairy Journal, 11, 553-558.

Schrödinger E. (1948) What is Life ? The Physical Aspect of the Living Cell. University Press, Cambridge.

Schrüfer E. (1992) Signalverarbeitung: numerische Verarbeitung digitaler Signale. Carl Hanser Verlag, München.

Sedlmeyer F., Daimer K., Rademacher B. & Kulozik U. (2003) Influence of the composition of milk-protein kappa/iota-hybrid-carrageenan gels on product properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 31(1-4), 13-20.

Sedlmeyer F., Rademacher B. & Kulozik U. (2003b) Investigations on mixed systems containing milk proteins, starch and carrageenan. In: Fischer P., Marti I. & Windhab E.J. (Ed.) Proceedings of the 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, ETH, Zürich, 489-490.

Sedlmeyer F., Brack M., Rademacher B., & Kulozik U. (2004) Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. International Dairy Journal, 14, 331-336.

Sedlmeyer F. & Kulozik U. (2005) Influence of preheating time and UHT heating temperature on the texture of milk stabilized with carrageenan. In: P.Fito & F. Toldra, Innovations in traditional foods (Vol.1), Elsevier, London, 835-838.

Sedlmeyer F. & Kulozik U. (2006) Impact of process conditions on the rheological detectable structure of UHT treated milk protein-carrageenan systems. Journal of Food Engineering, 77, 943-950.

Sedlmeyer F. & Kulozik U. (2006b) Influence of UHT heating conditions and high pressure homogenisation on structural properties of mixed biopolymer systems. In: P. Fischer, P. Erni & E.J. Windhab, ISFRS 2006 Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure, ETH, Zürich, pp. 245-249.

Sedlmeyer F. & Kulozik U. (2007) Impact of processing conditions and protein concentration on the assembly of carrageenan milk protein weak gels. Food Hydrocolloids, 21, 756-764.

Singh H. & Creamer L.K. (1992) Heat stability of milk. In: Fox P.F. (Ed.) Advanced Dairy Chemistry Vol. 1: Proteins. Elsevier Applied Science, London, 651-656.

Singh H. & Latham J.M. (1993) Heat Stability of Milk: Aggregation and Dissociation of Protein at Ultra-high Temperatures. International Dairy Journal, 3, 225-237.

Singh S.K. & Caram-Lelham N. (1998) Thermodynamics of k-Carrageenan-Amphiphilic Drug Interaction as Influenced by Specific Counterions and Temperature: A Microcalorimetric and Viscometric Study. Journal of Colloid and Interface Science, 203, 403-446.

Skura B.J. & Nakai S. (1981) Stabilization of alpha-s1-Casein by kappa-Carrageenan in the Presence of Calcium. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 14, 59-63.

Snoeren T.H.M., Payens T.A.J., Jeunink J. & Both P. (1975) Electrostatic interaction between kappa-carrageenan and kappa-casein. Milchwissenschaft, 30, 393-395.

Spagnuolo P.A., Dalgleish D.G, Goff H.D. & Morris E.R. (2005) Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. Food Hydrocolloids, 19, 371-377.

Spiegel T. (1999) Thermische Denaturierung und Aggregation von Molkenproteinen in Ultrafiltrationsmolkenkonzentraten: Reaktionskinetik und Partikulieren im Schabewärmetauscher. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan, Shaker Verlag, Aachen.

Sommer K. (1974) Physikalische Vorgänge beim Conchieren. Dissertation am Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik, Universität Karlsruhe (TH).

Stainsby G. (1980) Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. Food Chemistry, 6, 3-14.

Surh J., Decker E.A. & McClements D.J. (2006) Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids, 20, 607-618.

Syrbe A. (1998) Polymer Incompatibility in Aqueous Whey Protein and Polysaccharide Solutions: Phase Separation Phenomena and Microgel Particle Formation. Dissertation am Lehrstuhl für Milchwissenschaft, TU München-Weihenstephan. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr. 86, Düsseldorf : VDI Verlag GmbH.

Syrbe A., Bauer W.J., & Klostermeyer H. (1998) Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. International Dairy Journal, 8, 179-193.

Tako M., Qi Z.-Q., Yoza E. & Toyama S. (1998) Synergistic interaction between k-carrageenan isolated from Hypnea charaodes Lamouroux and galactomannan on its gelation. Food Research International, 31, 8, 543-548.

Tanaka T. (1981) Gele. Spektrum der Wissenschaft, 3, 79-93.

Teixeira J. (1986) Experimental methods for studying fractal aggregates. In: Stanley H.E. & Ostrowsky N. (Ed.) On growth and form. Martinus Nijhof Publishers, Dordrecht.

Tolstoguzov V.B. (1986) Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: Mitchell J.R. (Ed.) Functional Properties of Macromolecules, Elsevier, London.

Tolstoguzov V.B. (1997) Protein-polysaccharide interactions. In: Damodaran S. & Paraf A. (Ed.) Food Proteins and their Applications. Marcel Dekker, New York.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. Food Hydrocolloids, 17, 1-23.

Tompa H. (1956). Polymer Solutions. Butterworth, London.

Tromp R. H., de Kruif C. G., van Eijk M., & Rolin C. (2004) On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. Food Hydrocolloids, 18, 565-572.

Tuinier R., Rolin C., & de Kruif C. G. (2002) Electroadsorption of pectin onto casein micelles. Biomacromolecules, 3, 632-638.

van den Boomgaard Th., van Vliet T. & van Hooydonk A.C.M. (1987) Physical stability of chocolate milk. International Journal of Food Science and Technology, 22, 279-291.

Vasiljevic T. & Jelen P. (1999) Temperature effect on behavior of minerals during ultrafiltration of skim milk and acid whey. Milchwissenschaft, 54, 5, 243-246.

Vega C., Andrew R.A. & Goff H.D. (2004) Serum separation in soft-serve ice cream mixes. Michwissenschaft, 59, 5/6, 284-287.

Vega C., Dalgleish D.G. & Goff H.D. (2005) Effect of kappa-carrageenan addition to dairy emulsions containing sodium caseinate and locust bean gum. Food Hydrocolloids, 19, 187-195.

Verwey E. J. W. & Overbeek, J. T. G. (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids. Elsevier, Amsterdam.

Walstra P. & Jenness R. (1984) Dairy Chemistry and Physics. John Wiley & Sons, New York.

Walstra P. (1990) On the stability of casein micelles. Journal of Dairy Science, 73, 8, 1965-1979.

Walstra P. (2003) Physical Chemistry of Foods. Marcel Dekker, New York.

Walter R. H. (1998) Polysaccharide dispersions chemistry and technology in food. Academic Press, San Diego.

Wang Q., Rademacher B., Sedlmeyer F. & Kulozik U. (2005) Gelation behaviour of aqueous solutions of different types of carrageenan investigated by low-intensity-ultrasound measurements and comparison to rheological measurements. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 6, 465-472.

Welchner K. (1993) Wechselwirkungen zwischen Produkt und Spülfluid. Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München-Weihenstephan.

Wedler G. (1997) Lehrbuch der physikalischen Chemie. Wiley-VCH, Weinheim.

Windhab E. (1990) Einfluss von Hydrokolloiden auf das Fließverhalten von Feinkostsoßen. Lebensmitteltechnik, 47, 7/8, 404-414.

Yaphe W. (1960) Colorimetric Determination of 3,6-Anhydrogalactose and Galactose in Marine Algal Polysaccharides. Analytical Chemistry, 32, 10, 1327-1330.

Zaleska H., Ring S.G., & Tomasik P. (2000) Apple pectin complexes with whey protein isolate. Food Hydrocolloids, 14, 377-382.

Zsaypkin D.V., Braudo E.E. & Tolstoguzov V.B. (1997) Multicomponent biopolymer gels. Food Hydrocolloids, 11, 2, 159-170.

Lebenslauf

Felix Sedlmeyer, geboren am 26.02.1972 in Bochum, Nordrhein-Westfalen, als zweites von drei Kindern von Dr.-Ing. Axel Sedlmeyer und Dr. Margarete Sedlmeyer.

1978-1980	St.Anna-Grundschule, München
1980-1982	Josef-Dosch-Grundschule, Gauting
1982-1986	Otto-von-Taube-Gymnasium, Gauting (neusprachlich)
1986-1992	Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg (mathematisch-naturwissenschaftlich)
1992	Abitur in Chemie, Geschichte, Deutsch und Physik
1992-1993	Voluntär im Straßenkinderheim “Valle féliz” in Santo Domingo de los Colorados, Ecuador
1993	Studium der katholischen Theologie und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten an der Ludwig-Maximiliams-Universität München
1993-1999	Studium Diplom-Agraringenieur, Fachrichtung “Milchwissenschaften” an der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
1999	Abschluss als jahrgangsbester Agraringenieur (Gesamtdurchschnittsnote: 1,4)
2000-2002	Aufbaustudium Biotechnologie an der Technischen Universität München
2002	Erfolgreicher Abschluss des Aufbaustudiums Biotechnologie
2003-2006	Promotionsstudium in Agrarwissenschaften an der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
1999-2000	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Landtechnik Weihenstephan
2001-2006	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan