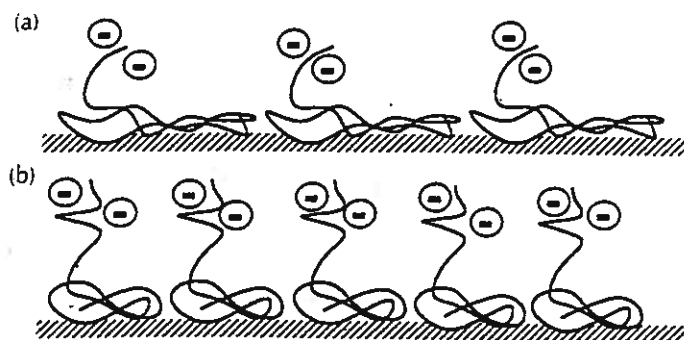


# Funktionelle Eigenschaften der Milchproteine

## Literaturübersicht

E. Eugster-Meier



Schematische Darstellung von  $\beta$ -Kasein-Molekülen an der O/W-Phasengrenze. (a) tiefe Konzentration, (b) hohe Konzentration (DALGLEISH, 1997).

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Chemische Struktur und Zusammensetzung der Milchproteine</b>           | <b>1</b>  |
| 2.1. Proteinstruktur   | 1         |
| 2.2. Wechselwirkungen zwischen Protein und Wasser                            | 2         |
| 2.3. Milchproteine   | 2         |
| 2.3.1. Kaseine   | 3         |
| 2.3.2. Molkenproteine  | 3         |
| <b>3. Funktionelle Eigenschaften der Milchproteine</b>                       | <b>5</b>  |
| 3.1. Protein-Wasser-Wechselwirkungen (hydodynamische Eigenschaften)          | 5         |
| 3.1.1. Interaktionen mit Wasser  | 5         |
| 3.1.2. Löslichkeit   | 5         |
| 3.2. Protein-Protein-Wechselwirkungen  | 6         |
| 3.2.1. Gelbildung von Milchproteinen   | 7         |
| 3.3. Oberflächen- und grenzflächenaktive Eigenschaften                       | 8         |
| 3.3.1. Emulsionen: Grundlagen  | 8         |
| 3.3.1.1. Emulsionsbildung  | 10        |
| 3.3.1.2. Grenzflächenbesetzungskinetik                                       | 12        |
| 3.3.1.3. Stabilisierung einer Emulsion                                       | 13        |
| 3.4. Milchproteine als makromolekulare Emulgatoren (Emulgierereigenschaften) | 15        |
| 3.4.1. Einfluss der Proteinkonformation                                      | 15        |
| 3.4.2. Elektrostatische Effekte  | 16        |
| 3.4.3. Konfiguration der Proteine an der Grenzfläche                         | 16        |
| 3.4.4. Kompetitive Adsorption  | 18        |
| 3.4.5. Kompetitive Adsorption am Beispiel der Speiseeisherstellung           | 22        |
| 3.4.6. Stabilität der mit Milchproteinen hergestellten Emulsion              | 24        |
| 3.5. Methoden zur Charakterisierung der Emulgierereigenschaften              | 24        |
| 3.6. Einflussfaktoren auf die Emulgierereigenschaften von Milchproteinen     | 26        |
| 3.6.1. Einfluss des pH-Wertes im System                                      | 26        |
| 3.6.2. Einfluss der Temperatur   | 26        |
| 3.6.3. Einfluss der Ionenstärke  | 27        |
| 3.6.4. Interaktionen mit Lipiden, Polysacchariden und weiteren Komponenten   | 28        |
| 3.6.5. Enzymatische Behandlung der Milchproteine                             | 29        |
| <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>31</b> |

## 1. Einleitung

Milchproteine besitzen neben der ernährungsphysiologischen Bedeutung weitere funktionelle Eigenschaften, die sie zu geschätzten Zutaten werden liessen. So basiert der grösste Teil bekannter Milchprodukte auf technologischen Veränderungen an den Proteinkomponenten der Milch. Die Einwirkung von Hitze, Druck, pH-Wert-Veränderungen oder enzymatische Reaktionen führen dazu, dass Proteine Strukturen ausbilden. Die Eigenschaften dieser Produkte sind vom physikalisch-chemischen Zustand und der Konzentration der Proteine sowie von den Milieubedingungen abhängig. Dabei spielen insbesondere die Wechselwirkungen der Proteine mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen eine wichtige Rolle. Verschiedene Autoren (KINSELLA, 1976 und 1982; KINSELLA und DAMODARAN, 1981; CHEFTEL et al., 1992; DAMODARAN, 1996) geben eine Liste der bekannten funktionellen Eigenschaften von Proteinen an. So gehören die Wasseraufnahme, die Emulgierereigenschaft und die Schaumbildung zu den funktionellen Aufgaben, die Proteine beispielsweise in Back- und Konditoreiwaren wahrnehmen. Obwohl Proteine eine Vielzahl von funktionellen Eigenschaften besitzen, werden sie in der Lebensmittelindustrie vor allem in Gelen, Emulsionen und Schäumen eingesetzt.

Auch in der schweizerischen Milchwirtschaft besteht grosses Interesse an den funktionellen Eigenschaften der Milchinhaltsstoffe, insbesondere an den Emulgierereigenschaften der Milchproteine. Aus diesem Grunde wurde an der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft ein Projekt mit dem Ziel, die Emulgierereigenschaften von Milchproteinen zu untersuchen und anwendungsbezogen charakterisieren zu können, lanciert.

Die Grenzflächenaktivität sowie die Filmbildungseigenschaften, die zur Bildung bzw. zur Stabilisierung von Emulsionen führen, sind seit langem Gegenstand der internationalen Forschung. Die folgende Arbeit hat zum Ziel, anhand der Fülle an wissenschaftlichen Arbeiten auf diesem Gebiete, eine Übersicht über die funktionellen Eigenschaften, insbesondere über die Emulgierereigenschaften von Milchproteinen zusammenzustellen. Bevor auf die funktionellen Eigenschaften der Milchproteine eingegangen wird, folgt im nächsten Kapitel eine kurze Übersicht über die chemische Struktur und Zusammensetzung der in der Milch vorhandenen Proteine.

## 2. Chemische Struktur und Zusammensetzung der Milchproteine

### 2.1. Proteinstruktur

Proteine sind wie Peptide aus Aminosäuren aufgebaut, die säureamidartig verknüpft sind. Die Struktur eines Proteins wird bestimmt durch die Aminosäuresequenz (Primärstruktur), von der die Konformation des Moleküls (Sekundär-, Tertiärstruktur) abhängt (BELITZ und GROSCH, 1987). In der Primärstruktur sind die Aminosäuren durch kovalente Bindungen verknüpft. Die hohe Bindungsenergie von 330 - 420 kJ/mol (PLOCK, 1994) verhindert einen Bruch in der Primärstruktur unter üblichen Prozessbedingungen. Die Sekundärstruktur besteht aus ungleichmässig über das Proteinmolekül verteilten  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen (BELITZ und GROSCH, 1987; LUDESCHER, 1996). Die  $\alpha$ -Helix-Struktur wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Lokalisierung von  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen innerhalb des Proteinmoleküls wird durch polare Bindungen, hydrophobe Interaktionen und sterische Effekte der Aminosäurereste bestimmt und als Tertiärstruktur bezeichnet (WALSTRA und JENNESS, 1984; BELITZ und GROSCH, 1987; LUDESCHER, 1996). Unter bestimmten Bedingungen liegen Proteinuntereinheiten in Form von Molekülaggregaten (Dimeren, Tetrameren, Octameren) vor, die eine bestimmte Geometrie haben (Quartärstruktur). Diese werden durch nicht kovalente

Assoziationen zusammengehalten. In Tabelle 1 sind die an der Stabilisierung der Proteinmoleküle beteiligten intramolekularen Kräfte dargestellt.

**Tab. 1:** Intramolekulare Kräfte zur Stabilisierung der Proteinmoleküle (WALSTRA und JENNESS, 1984; PLOCK, 1994; LUDESCHER, 1996)

| Bindungstyp  | Bindungsenergie<br>[kJ/mol] |
|--|-----------------------------|
| kovalente Bindung                                  | 330 - 420                   |
| elektrostatische Bindung                           | 21 - 84                     |
| Wasserstoffbrücken                                 | 8 - 40                      |
| hydrophobe Assoziationen und van der Waals Bindung | 0.1 - 20                    |

## 2.2. Wechselwirkungen zwischen Protein und Wasser

Die Proteinkonformation, die sich in wässriger Lösung einstellt, ist thermodynamisch kontrolliert und gekennzeichnet durch die Änderung der freien Energie  $\Delta G$  des Systems.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

$\Delta G$ : Änderung der freien Energie (Gibb's Energie)

$\Delta H$ : Änderung der Enthalpie

T: Temperatur

$\Delta S$ : Änderung der Entropie

Das System ist bestrebt, einen energetisch möglichst günstigen Zustand einzunehmen. Um hydrophobe Seitenketten der Proteinoberfläche formieren sich hochgeordnete Wasserstrukturen, die dazu führen, dass die Entropie des Wassers abnimmt. Durch gegenseitige Assoziation der hydrophoben Seitenketten der Proteinmoleküle wird die Enthalpie gesenkt und das gesamte System nimmt wiederum den Zustand der minimalen freien Energie an (WALSTRA und JENNESS, 1984; WESTPHAL et al., 1996). Hydrophobe Interaktionen sind also eine direkte Antwort auf die Veränderung der freien Energie  $\Delta G$  des Wassers und basieren nicht auf hydrophoben Bindungen zwischen apolaren Gruppen untereinander. Solche Interaktionen tragen massgeblich zur Ausbildung einer bestimmten Proteinkonformation und deren Stabilisierung bei (LUDESCHER, 1996). Die Konformation ist wiederum entscheidend für die technofunktionellen Eigenschaften eines Proteins.

## 2.3. Milchproteine

Der durchschnittliche Proteingehalt der Milch beträgt 3.33%. Die beiden Proteinfractionen, Kaseine und Molkenproteine, unterscheiden sich hauptsächlich durch ihr unterschiedliches Lösungsverhalten im schwach sauren Bereich (pH 4.6). Sie liegen als kolloidal gelöste Feststoffpartikel vor und unterliegen aufgrund ihrer Grösse von  $< 1\mu\text{m}$  der Brown'schen Molekularbewegung, was sie stabil gegen Sedimentation macht. Das unterschiedliche Verhalten von Kaseinen und Molkenproteinen ist auf Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung und damit auf unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen zurückzuführen (WALSTRA und JENNESS, 1984; DAMODARAN, 1996).

### 2.3.1. Kaseine

Die Kaseine machen etwa 2.8 - 3.2% der Milch aus und stellen die grösste Proteinfraction dar. Sie besitzen eine im Vergleich zu den Molkenproteinen ungeordnete Struktur (fast keine  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblattstruktur), was auf den relativ hohen Anteil der Aminosäure Prolin und geladener Seitenketten zurückzuführen ist. Die Kaseine bestehen aus 4 Fraktionen, von denen unterschiedliche genetische Varianten vorkommen:  $\alpha_{s1}$ -Kasein,  $\alpha_{s2}$ -Kasein,  $\beta$ -Kasein und  $\kappa$ -Kasein. Ein weiteres Protein, das  $\gamma$ -Kasein, wird nicht als eigenständiges Protein, sondern als proteolytisches Spaltprodukt des  $\beta$ -Kaseins nach Einwirkung von Plasmin, angegeben (WALSTRA und JENNESS, 1984).

Alle Kaseine besitzen Phosphatgruppen, die in einer Esterbindung an Seitenketten gebunden sind (WALSTRA und JENNESS, 1984).  $\alpha_{s2}$ - und  $\kappa$ -Kasein besitzen je zwei Cysteinreste. Diese beiden Proteine sind, falls nicht in die Mizelle integriert befähigt, intermolekulare Disulfidbrücken auszubilden, was in der Folge zusammen mit anderen Proteinen zu einer Netzwerkbildung führen kann.

Die Kaseine liegen in der ungekühlten Milch in Form von sphärischen Partikeln in aggregierter Form als sogenannte Mizellen vor. Durch die Phosphorylierung der Serin-Seitenketten und die anschliessende Bildung von Calcium-Phosphat-Brücken lagern die Kaseine zusammen und bilden sogenannte Submizellen. Mit Hilfe von kolloidalem Calcium-Phosphat werden die Submizellen zu grösseren Einheiten, den Mizellen, verbunden. Das  $\kappa$ -Kasein besitzt als einziges Kasein Kohlenhydrate, die vor allem am C-terminalen Ende der Kette lokalisiert sind und dieses zusammen mit negativ geladenen Gruppen hydrophil machen. Wegen dieses hydrophilen Endes sind die  $\kappa$ -Kaseine an der Oberfläche der Mizellen lokalisiert, wo sie für die Hydratation der gesamten Mizelle verantwortlich sind. Die hydrophilen Enden ragen in die wässrige Phase, wodurch die Mizelle zusätzlich sterisch stabilisiert wird (WALSTRA und JENNESS, 1984; HOLT und HORNE, 1996). Die in die wässrige Phase herausragenden hydrophilen Enden des  $\kappa$ -Kaseins haben zur Begriffsdefinition "haarige" (engl. "hairy") Mizellenoberfläche geführt. Die "haarige" Schicht an der Mizellenoberfläche soll nach WALSTRA und JENNESS etwa 5 nm dick sein.

Diese äusserste Schicht der Kaseinmizelle von  $\kappa$ -Kasein stellt eine sterische Barriere gegen Aggregation dar (HOLT & HORNE, 1996). Der Schutz gegen Aggregation kann durch enzymatische Entfernung der Haare, beispielsweise bei der Labgerinnung oder bei verminderter Löslichkeit in Gemischen mit organischen Lösungsmitteln, überwunden werden. Nach welchen Mechanismen jedoch die sterische Abstossung bei der Säurefällung und Hitzekoagulation von Milch überwunden wird ist weitgehend unbekannt (HOLT und HORNE, 1996). Die sterische Stabilisierung der Kaseinmizellen wird im Kapitel 3.4.1.5 "Stabilisierung von Emulsionen" genauer beschrieben.

### 2.3.2. Molkenproteine

Die Trennung in Kaseine und Molkenproteine erfolgt entweder durch proteolytische Präzipitation des Kaseins nach Abspalten des Glycomakropeptides vom  $\kappa$ -Kasein oder durch eine Säurefällung der Kaseine am isoelektrischen Punkt (IEP = 4.6). Die molkenproteinhaltige Lab- oder Süssmolke bzw. die Sauermolke unterscheiden sich in der Vorbehandlung, der Zusammensetzung insbesondere des Proteose-Pepton (Glykomakropeptid) und der Mineralstoffe.

Die Molkenproteine machen etwa 19.3% bis 21.2% des Milchproteins aus (WALSTRA und JENNESS, 1984). Alle sind globuläre Proteine mit einer echten Tertiärstruktur. Im Gegensatz zu den Kaseinen bleiben die Molkenproteine beim pH-Wert 4.6 in Lösung und sind hitzelabil. Die beiden Hauptkomponenten der Molkenproteine, das  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) und das  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La), machen 75% bis 80% der gesamten Fraktion aus, wobei das Mengenverhältnis bei etwa 3:1 liegt. Die restlichen 20% bis 25% setzen sich aus Blutserumalbumin (BSA), Immunglobulinen (Ig) und Proteose-Peptonen sowie diversen Enzymproteinen zusammen (WALSTRA und JENNESS, 1984).

**Tab. 2:** Chemische und physikalische Eigenschaften der wichtigsten Molkenproteinfraktionen;  $\beta$ -Lg\*: Monomer; Werte in (): isoeionischer Punkt; (WALSTRA und JENNESS, 1984; PLOCK, 1994).

|                               | $\beta$ -Lg* |        | $\alpha$ -La | BSA       |
|-------------------------------|--------------|--------|--------------|-----------|
|                               | A            | B      |              |           |
| Konz. in Milch [g/kg]         | 0.32         |        | 0.12         | 0.04      |
| Molekulargewicht [D]          | 18 363       | 18 277 | 14 176       | 66 267    |
| isoelektr. pH-Bereich         | (5.35)       | (5.41) | 4.2 - 4.5    | 4.7 - 5.1 |
| Hydrophobizität [kJ/mol]      | 5.03         |        | 4.68         | 4.14      |
| apolare Reste [%]             | 34.60        |        | 36.00        | 28.00     |
| Lysin-Reste                   | 15           |        | 12           | 59        |
| Disulfid-Bindungen            | 2            |        | 4            | 17        |
| Thiolgruppen                  | 1            |        | -            | -         |
| $\alpha$ -Helix-Anteil [%]    | 15           |        | 26           | 54        |
| $\beta$ -Faltblatt-Anteil [%] | 50           |        | 14           | 18        |

Einige chemische und physikalische Eigenschaften von  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin und Blutserumalbumin sind in Tabelle 2 aufgeführt.  $\beta$ -Lactoglobulin ist die mengenmässig bedeutendste Molkenproteinfraktion und setzt sich hauptsächlich aus den genetischen Varianten A und B zusammen. Von besonderer Bedeutung sind die beiden intramolekularen Disulfidbrücken und die freie Thiolgruppe, die im nativen Zustand dem Kontakt mit der wässrigen Umgebung entzogen ist. Sie tragen massgeblich zur Stabilität und Funktionalität des  $\beta$ -Lactoglobulins bei. Bei 20°C und neutralem pH-Wert liegt  $\beta$ -Lactoglobulin als assoziiertes Dimer vor, das durch elektrostatische Bindungen zusammengehalten wird. Je nach Änderung der Milieubedingungen (pH-Wert, Hitzebehandlung) dissoziiert bzw. assoziiert das  $\beta$ -Lactoglobulin zu Monomeren bzw. Octameren.

Durch pH-Wert- oder thermisch-induzierten Zerfall der Dimere wird die Thiolgruppe leichter zugänglich und eine Reihe von Folgereaktionen, die einen wesentlichen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften besitzen, werden möglich. Die Reaktivität der Thiolgruppe nimmt bei pH-Werten oberhalb 6.5 stark zu (WALKENSTRÖM, 1993).

Beim  $\alpha$ -Lactalbumin existieren die beiden genetischen Varianten A und B. Der Aufbau ist ebenfalls globulär und gleicht demjenigen des Lysozyms des Hühnereiweisses (WALSTRA und JENNESS, 1984). Es hat vier intramolekulare Disulfid-Brücken, jedoch keine freie Thiolgruppe. Durch Einbinden von Calcium wird  $\alpha$ -Lactalbumin zusätzlich stabilisiert. Mit fallendem pH-Wert nimmt die Menge an gebundenem Calcium (1.5mol Ca/mol  $\alpha$ -La) ab, bis sie unterhalb pH 3.5 bis 4.0 ganz verloren geht.

### 3. Funktionelle Eigenschaften der Milchproteine

Nach DAMODARAN (1996) sind die funktionellen Eigenschaften von Proteinen Ausdruck zweier molekularer Hauptaspekte: der hydrodynamischen sowie der Oberflächen bzw. Grenzflächen bezogenen Eigenschaften. Unter den hydrodynamischen Eigenschaften werden Protein-Wasser-Wechselwirkungen verstanden. Zu diesen gehören Wasseraufnahme, Wasserbindungsvermögen, Benetzbarkeit, Quellung, Haftvermögen (Adhäsion), Dispergierbarkeit, Löslichkeit und Viskosität. Die zweite Gruppe von Eigenschaften betrifft Ober- bzw. Grenzflächenspannung, Emulgiervermögen und Schäumungseigenschaften von Proteinen. CHEFTEL et al. (1992) gibt eine dritte Gruppe von funktionellen Eigenschaften an, die auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruhen. Zu dieser gehören Phänomene wie Filmbildung, Fällung, Gelierung oder Bildung spezieller Strukturen (Fasern). Die Gruppen können nicht klar gegeneinander abgegrenzt werden, da verschiedene Eigenschaften wie zum Beispiel die Gelbildung auf Protein-Wasser- und Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen.

#### 3.1. Protein-Wasser-Wechselwirkungen (hydrodynamische Eigenschaften)

##### 3.1.1. Interaktionen mit Wasser

Aufgrund der sigmoidalen Kurve der Sorptionsisothermen lassen sich nach KINSELLA und FOX (1986) sowie CHEFTEL et al. (1992) sechs unterschiedliche, physikalische Zustände von Wasser im hydratisierten Molekül mit zunehmendem  $a_w$ -Wert festhalten.

Eine Änderung der Konformation sowie der Umgebungsfaktoren (z.B. pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) können einen entscheidenden Effekt auf die Wasserbindung der Proteine ausüben. Wegen der Protonierung der Carboxylgruppen und verstärkter hydrophober Interaktionen zwischen den Proteinmolekülen zeigen die meisten Proteine beim IEP die geringste Wasserbindung (DAMODARAN, 1996).

Für die Funktionalität der Proteine ist vor allem die Fähigkeit wichtig, Wasser in Form von kapillarem Wasser zu binden und dieses unter Ausbildung eines Netzwerkes zu halten (DAMODARAN, 1996). Die Aufnahme von Wasser durch Proteine, die zu einer Quellung ohne Lösung des Proteins führt, hat wesentlichen Einfluss auf die Konsistenz, Viskosität und Adhäsion von Lebensmitteln (CHEFTEL et al. 1992).

##### 3.1.2. Löslichkeit

Die Löslichkeit ist eine Grundvoraussetzung für die Leistung eines Proteins in bestimmten Anwendungen (MULVIHILL und FOX, 1987; DAMODARAN 1996). Wie bereits erwähnt, beruhen die Wechselwirkungen zwischen Protein und Wasser, und somit die Löslichkeit der Proteine, auf einer Änderung der gesamten freien Energie des Wassers infolge von Interaktionen von hydrophoben und hydrophilen Seitenketten an der Oberfläche des Proteins mit dem umgebenden wässrigen Lösungsmittel. Die Löslichkeit der Proteine hängt von den folgenden Faktoren ab: pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur, Polarität des Lösungsmittels, Verfahrensbedingungen bei der Herstellung des Proteinkonzentrates. Der Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die Löslichkeit der Proteine beruht auf der Veränderung der elektrostatischen Kräfte innerhalb des Proteinmoleküls.

Die Kaseine sind wie die meisten Proteine am IEP unlöslich, währenddem die Molkenproteine im pH-Bereich von 3 bis 9 löslich sind (DAMODARAN, 1996). Nach der Neutralisation der Ladungen am IEP folgt aufgrund hydrophober Interaktionen die Aggregation von Proteinmolekülen, was zur Ausfällung der Kaseine am IEP führt. Bei den Molkenproteinen sorgt der geringe Anteil hydrophober Seitenketten an der Moleküloberfläche dafür, dass der Hydrationsmantel auch bei Abnahme der Ladungen bestehen und somit das Protein beim IEP in Lösung bleibt.

Ionenstärke und pH-Wert besitzen teilweise komplementäre Effekte auf die Proteinlöslichkeit. Neben dem Einfluss der Ionenstärke auf die elektrostatischen Kräfte innerhalb des Proteinmoleküls besitzen Salze ionenspezifische Effekte, die eine Veränderung der hydrophoben Kräfte und somit eine Veränderung der Löslichkeit bewirken. Dieser Einfluss verschiedener Salze auf die Löslichkeit der Proteine wird mit dem Einsalz- und Aussalzeffekt beschrieben.

Die Vorbehandlung der Proteine hat ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf deren Löslichkeit. Eine Denaturierung der Proteine mit nur geringen Veränderungen in der Konformation kann zu einer drastischen Abnahme der Proteinlöslichkeit führen.

### 3.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die Gelbildung muss sorgfältig von vergleichbaren Phänomenen, bei denen die Dispersion einer Proteinlösung abnimmt, unterschieden werden.

**Tab.3:** Definition der Gelbildung und vergleichbarer Phänomene (CHEFTEL et al., 1992)

| Bezeichnung          | Definition  |
|----------------------|---|
| Assoziation          | Verbindung von Proteinuntereinheiten oder einzelner Moleküle                    |
| Polymerisation       | Bildung grösserer, ungeordneter Komplexe oder Einheiten                         |
| Präzipitation        | Aggregatbildung mit teilweisem oder vollständigem Verlust der Löslichkeit       |
| Flockung             | ungeordnete Aggregatbildung, die nicht mit einer Denaturierung verbunden ist    |
| Koagulation          | ungeordnete Aggregatbildung, die mit einer Denaturierung verbunden ist          |
| Gelbildung/Gelierung | Bildung geordneter Netzstrukturen durch Zusammenlagerung denaturierter Proteine |

In den meisten Fällen ist eine Erhitzung für die Bildung von Proteingelen unerlässlich (CHEFTEL et al., 1992; WALKENSTROM, 1993; DAMODARAN, 1996). In der Literatur wird diese Art von Gelen auch "heat-set-Gel" genannt. Ausgehend von einer Proteinlösung sind die ersten Schritte der thermischen Gelbildung wie folgt zu definieren:



wobei  $P_N$  = natives Protein

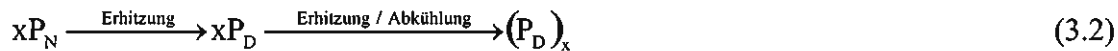
$P_D$  = denaturiertes Protein

$n$  = Dimer:  $n=2$ ; Tetramer:  $n=4$ ; Octamer:  $n=8$



Beim ersten Schritt erfolgt die reversible Dissoziation der Quartärstruktur zu Untereinheiten. Der folgende zweite Schritt beinhaltet die je nach Auffaltungsgrad reversible bzw. irreversible Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstruktur (insbesondere bei Milchproteinen oft nur partielle Auffaltung).

Nach WALKENSTROM (1993) und CHEFTEL et al. (1992) kann die endgültige Gelstruktur nach folgendem Mechanismus entstehen:



wobei  $(P_D)_x$  = aggregiertes, teilweise denaturiertes Protein

Durch eine Hitzebehandlung werden Proteinmoleküle gezielt aufgefaltet (teilweise denaturiert), wodurch reaktive Gruppen, insbesondere hydrophobe Gruppen in globulären Proteinen freigesetzt werden. Infolge hydrophober Interaktionen und Protein-Protein-Wechselwirkungen wird ein Netzwerk aufgebaut, das das freie Wasser einschliesst. Dabei wirken elektrostatische und ionische Interaktionen ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Brücken), Wasserstoffbrücken, hydrophobe Interaktionen und Disulfid-Bindungen als Anziehungskräfte zwischen den Proteinen. Hydrophobe Interaktionen sind die Hauptursache für die nach der Hitzebehandlung stattfindende Aggregation. Je nach Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionsschritte entstehen Gele mit unterschiedlicher Struktur. Je langsamer die Aggregationsreaktion im Verhältnis zur Denaturierungsreaktion verläuft, desto mehr Zeit haben die teilweise aufgefalteten Polypeptide, sich vor der Aggregation auszurichten. Auf diese Weise werden Gele mit einer geordneten, homogenen Struktur und glatter, elastischer, transparenter Konsistenz gebildet, die stabil gegen Synärese/Wasserlässigkeit sind. Gele die aus stark aggregierten Proteinpartikeln bestehen, sind dagegen undurchsichtig, wenig elastisch und sehr instabil (Synärese/Wasserlässigkeit) (WALKENSTROM, 1993).

### 3.2.1. Gelbildung von Milchproteinen

Bekanntestes Beispiel der Strukturbildung ist die Koagulation der Kaseinmizellen in Milch bei der Herstellung verschiedenster Milchprodukte. Bei der Käseproduktion wird die Koagulation durch die proteolytische Wirkung von Chymosin auf das  $\kappa$ -Kasein eingeleitet und erfordert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Einstellung des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt der Milch führt ebenfalls zur Koagulation. Kaseinmizellen und Kaseinate sind bei pH-Werten über 6 sehr hitzestabil, was auf die wenig ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur der Kaseine zurückzuführen ist (WALSTRA und JENNESS, 1984).

Molkenproteine weisen in einer wässrigen Lösung bei einer Konzentration über 5% gute Gelbildungseigenschaften auf, wenn sie auf 70 bis 85°C erhitzt werden. Dabei ist die Fähigkeit zur Bildung von Gelen vor allem von der Konzentration an  $\beta$ -Lactoglobulin abhängig, da dieses aufgrund der freien Thiol-Gruppe sehr reaktiv ist. Der pH-Wert muss sorgfältig eingestellt werden, so dass ein Gleichgewicht zwischen Denaturierungsrate (Auffaltungsrate) und Aggregationsrate entsteht. WALKENSTROM (1993) gibt an, dass für die Auffaltung der globulären Proteine eine Hitzebehandlung im basischen Bereich optimal ist. So werden Aggregationsreaktionen vermindert. Dagegen bilden wässrige Lösungen von hitzebehandelten Proteinen bei einem pH-Wert von 5.0 Gele mit der höchsten Gelstärke (Viskosität Brookfield). Durch

die Aufhebung der elektrostatischen Abstoßung findet eine starke Aggregation statt, wodurch die Bildung von Disulfid-Brücken begünstigt wird. Die Gelbildungseigenschaften von Molkenproteinen ist stark von der Ionenkonzentration abhängig. Bei pH-Werten über 5.5 führt die Anwesenheit von divalenten Ionen, insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Reduktion der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Polypeptiden, was die Gelbildung begünstigen kann (WALSTRA und JENNES, 1984; CHEFTEL et al., 1992).

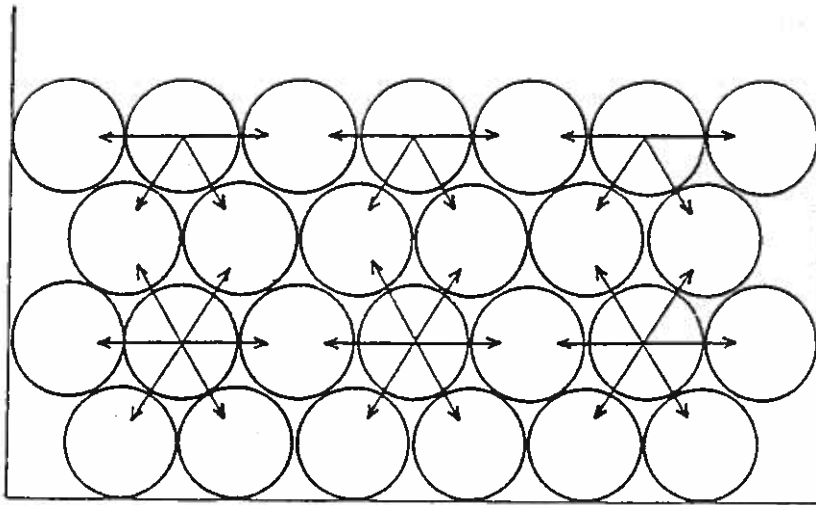
### 3.3. Oberflächen- und grenzflächenaktive Eigenschaften

Wegen ihrer grenzflächen- bzw. oberflächenaktiven Eigenschaften sind Proteine befähigt, Dispersionen zu bilden und zu stabilisieren. Ein disperses System besteht aus mindestens zwei nicht oder nur teilweise mischbaren Phasen, die fein ineinander verteilt sind. Dabei ist die innere Phase in der äusseren, kontinuierlichen Phase dispergiert. Je nach Aggregatzustand des Dispersionsmittels und der dispergierten Substanz gibt es verschiedene Arten von Dispersionen. Im Folgenden werden hauptsächlich Makroemulsionen (Tropfengrößenverteilung 0.1 - 50  $\mu\text{m}$ ) in der Form von Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen behandelt und als 'Emulsion' bezeichnet. Mit dem Wort "Grenzfläche" wird die Phasengrenze zwischen zwei nicht mischbaren, flüssigen Phasen und mit "Oberfläche" die Phasengrenze zwischen Luft (Gas) und einer Flüssigkeit bezeichnet.

Bevor auf die Emulgiereigenschaften der Milchproteine im einzelnen eingegangen wird, sollen die allgemeinen Grundlagen im Zusammenhang mit „Emulsionen“ und „Emulgiertechnik“ erläutert werden.

#### 3.3.1. Emulsionen: Grundlagen

Emulsionen sind Dispersionen von zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten, von denen die eine in Form fein dispergierter Tröpfchen und die andere in Form einer kontinuierlichen Phase vorliegt. Die Mehrzahl der Lebensmittelemissionen sind vom Typ Öl-in-Wasser (O/W) oder Wasser in Öl (W/O) (CHEFTEL et al., 1992). Aufgrund nicht kompensierter, intermolekularer Kräfte entsteht an der Grenzfläche zwischen den beiden Flüssigkeiten eine Grenzflächenspannung (DUKHIN et al., 1995). In Abbildung 1 ist die Grenzflächenspannung in einem mechanischen Modell mit Kraftvektoren dargestellt.



**Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung der asymmetrischen Kräfte, die auf ein Molekül an der Phasengrenze wirken. (DUKHIN et al., 1995)

Die Grenzflächenspannung  $\gamma$  kann auch als Ausdruck der freien Energie pro Grenzflächeneinheit ( $\text{Jm}^{-2} = \text{Nm}^{-1}$ ) beschrieben werden (DUKHIN et al., 1995).

$$\gamma = \left( \frac{dG}{dA} \right)_{p,T} \quad \text{wobei } G: \text{ freie Energie (nach Gibbs)} \quad (3.3)$$

A: Grenzfläche

Emulsionen sind thermodynamisch instabil. Das System ist bestrebt, die Grenzfläche zwischen lipophiler und hydrophiler Phase durch Zusammenfließen von Tropfen, sogenannter Tropfenkoaleszenz, zu verringern. Dabei wird die in der Grenzfläche gespeicherte Energie frei. Koaleszenz von Tropfen kann zur vollständigen Phasentrennung führen (Brechen der Emulsion).

Da das System bestrebt ist, die freie Energie möglichst tief zu halten, muss Arbeit verrichtet werden, um die Grenzfläche zu vergrößern. Bei isothermen und isobaren Bedingungen gilt:

$$W = \gamma \cdot \Delta A \quad \text{wobei } W: \text{ Arbeit} \quad (3.4)$$

Je tiefer die Grenzflächenspannung, desto tiefer die aufgewendete Energie, die für eine Vergrößerung der Grenzfläche eingesetzt werden muss.

Durch die Zugabe von Emulgierhilfsstoffen (Emulgatoren, Stabilisatoren) kann zumindest über einen bestimmten Zeitraum hinweg verhindert werden, dass Tropfen koaleszieren. Emulgatoren sind chemische Substanzen oder Mischungen, die an der Phasengrenzfläche adsorbieren und die Grenzflächenspannung erniedrigen. Emulgatoren verbessern vorwiegend die Kurzzeitstabilität einer Emulsion während der Emulsionsbildung (WALSTRA und SMULDERS, 1997). Stabilisatoren sind Substanzen, die in der kontinuierlichen Phase löslich sind und deren Viskosität erhöhen. Sie adsorbieren nicht an der Phasengrenzfläche und werden auch als Dickungsmittel bezeichnet. Typische Stabilisatoren sind Hydrokolloide, meist Polysaccharide und halbsyntheti-

sche Stabilisatoren, die in Lebensmittelemulsionen eingesetzt werden. Stabilisatoren sollen überwiegend eine gute Langzeitstabilität der Emulsion gewährleisten (STANG, 1998).

Proteine können aufgrund ihrer Grenzflächenaktivität an Phasengrenzflächen adsorbieren. Da Proteine Makromoleküle sind, erhöhen sie zusätzlich die Viskosität der kontinuierlichen Phase.

Im Rahmen des Forschungsprojektes an der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft war das Ziel der Arbeiten, Proteine vor allem wegen ihrer grenzflächenaktiven Eigenschaften und somit als Emulgatoren zu untersuchen und zu betrachten.

Tabelle 4 enthält die von STANG (1998) angegebene Einteilung für verschiedene Emulgierhilfsstoffe.

**Tab.4:** Einteilung der Emulgierhilfsstoffe (STANG, 1998)

| Emulgierhilfsstoff                  | Grenzflächenaktivität | Wirkung   | Molekulargewicht  | Beispiele aus der Lebensmittelindustrie          |
|-------------------------------------|-----------------------|---|-------------------|--|
| niedermolekularer Emulgator         | ja                    | überwiegend zur Verbesserung der Kurzzeitstabilität               | tief<br>< 1.3 kDa | Monoglyceride, Polysorbate, Lecithin             |
| makromolekularer Emulgator: Protein | ja                    | sowohl zur Verbesserung der Kurz- als auch der Langzeitstabilität | hoch<br>> 10 kDa  | Milchproteine, Proteine des Eigelbes             |
| Stabilisator                        | nein                  | überwiegend zur Verbesserung der Langzeitstabilität               |                   | Stärke, Pektine, Glukose, Cellulosederivate etc. |

### 3.3.1.1. Emulsionsbildung

Die mittlere Tropfengröße bzw. die Tropfengrößenverteilung von Emulsionen ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal und bestimmt u.a. die Konsistenz, das Fließverhalten, die Lagerstabilität und die Farbe des Endproduktes. Es gibt viele Methoden, um Emulsionen und Schäume herzustellen. In allen Fällen werden Tropfen oder Luftblasen durch mechanische Kräfte des umgebenden Mediums aufgebrochen und in kleinere umgewandelt. Der Laplace-Druck  $p_L$  wirkt der Deformation oder dem Tropfenaufbruch entgegen:

$$p_L = \gamma (1/R_1 + 1/R_2) \text{ wobei } \gamma: \text{ Grenzflächenspannung} \quad (3.5)$$

$R_1$  und  $R_2$ : Krümmungsradii

Tropfenaufbruch kann einerseits durch Scherkräfte, andererseits durch lokale Druckunterschiede, die je nach Fließverhalten (laminar, turbulent) wirken, erzeugt werden (WALSTRA and SMULDERS, 1997).

Je tiefer die Grenzflächenspannung  $\gamma$  ist, desto geringer ist der mechanische Energieeintrag, um die Emulsion zu bilden. Oberflächen- bzw. grenzflächenaktive Stoffe wandern aufgrund der Wechselwirkung ihrer hydrophilen bzw. lipophilen Gruppen mit der polaren bzw. apolaren Phase an die Phasengrenze und belegen diese. Der hydrophile Teil ist in die Wasserphase und der lipophile Teil in die apolare Ölphase getaucht. Durch die Besetzung der Grenzfläche bilden Emulgatoren einen Grenzflächenfilm. Bei makromolekularen Stoffen kann durch intermoleku-

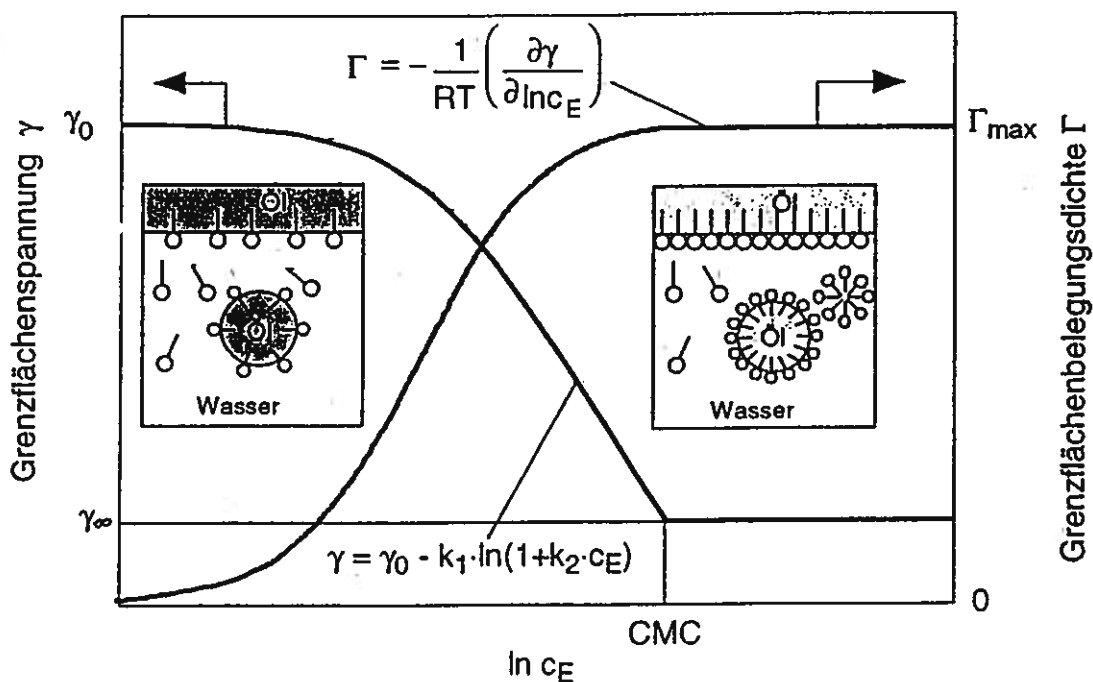
lare Interaktionen zwischen den an der Phasengrenze adsorbierten Molekülen ein viskoelastischer Grenzflächenfilm entstehen.

Die Grenzflächenbelegungsdichte  $\Gamma$  gibt an, wieviel Mol einer grenzflächenaktiven Substanz pro Grenzflächeneinheit adsorbiert ist.

$$\Gamma_i = \frac{n_i}{A} \quad \text{wobei } n_i: \text{Menge Mol der Komponente } i \quad (3.6)$$

A: Phasengrenzfläche

Für die Bildung und Stabilität einer Emulsion ist die Grenzflächenbelegungsdichte  $\Gamma$  von Bedeutung. Die Erfassung der Grenzflächenbelegungsdichte an Flüssig-Flüssig-Phasengrenzflächen ist messtechnisch schwer zugänglich. Sie kann jedoch über die Messung der Grenzflächenspannung  $\gamma$  bestimmt werden. Im dynamischen Gleichgewicht stellt sich in Abhängigkeit von der Emulgatorkonzentration eine bestimmte Grenzflächenbelegungsdichte  $\Gamma$  und eine entsprechende Grenzflächenspannung  $\gamma$  ein. Diese Konzentrationsabhängigkeit von  $\Gamma$  und  $\gamma$  im Adsorptionsgleichgewicht ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2:** Konzentrationsabhängigkeit der Grenzflächenspannung sowie der Grenzflächenbelegungsdichte. (BÜLTERMANN und STANG, 1996)

Mit zunehmender Konzentration des Emulgators  $c_E$  nimmt die Grenzflächenspannung ab bzw. die Grenzflächenbelegungsdichte zu, bis diese ein Maximum bei der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) erreicht (DUKHIN et al., 1995; BÜLTERMANN und STANG, 1996).

Der Zusammenhang zwischen Grenzflächenspannung und der Grenzflächenbelegungsdichte kann mit Hilfe der Gibbsschen Adsorptionsisothermengleichung beschrieben werden:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \left( \frac{d\gamma}{d \ln a} \right) \quad (3.7)$$

- wobei R: allgemeine Gaskonstante  
 T: Temperatur  
 $\gamma$ : Grenzflächenspannung im Gleichgewicht  
 a: Aktivitätskoeffizient (näherungsweise Konzentration  $c_E$  des Emulgators)

Die Belegung der Grenzfläche bewirkt die Ausbildung eines Filmdruckes  $\pi$  an der Grenzfläche. Der Ausdruck "Filmdruck" wird sehr oft bei der Beschreibung der Adsorption an bereits besetzten Grenzflächen verwendet. Für die Besetzung einer Grenzfläche muss mit zunehmender Belegungsdichte Arbeit gegen den Filmdruck verrichtet werden (WALSTRA und JENNESS, 1984; WALSTRA und DE ROOS, 1993).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.8)$$

- wobei  $\gamma_0$ : Grenzflächenspannung zur Zeit  $t=0$   
 $\gamma$ : Grenzflächenspannung zur Zeit  $t$

Bei der Emulsionsbildung spielen sich neben dem Tropfenaufbruch weitere Prozesse wie Kollision, Aggregation und Koaleszenz ab, die vor allem bei einer Emulgatorkonzentration unterhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) statt finden. Im Homogenisierspalt erfolgen alle diese Vorgänge mehrfach und in kürzester Zeit ( $\mu\text{s}$ ). Die Bedeutung der Emulgatoren während der Emulsionsbildung liegt nach WALSTRA und SMULDERS (1997) nicht nur bei der Herabsetzung der Grenzflächenspannung  $\gamma$ , sondern auch im Aufbau eines Grenzflächenspannungsgradienten.

Folgende Gleichgewichtsgrenzflächenspannungen werden in Lebensmittelsystemen approximativ erreicht (WALSTRA und SMULDERS, 1997):

**Tab. 5:** Gleichgewichtsgrenzflächenspannungen in Lebensmittelsystemen

| Art der Phasengrenze                      | Grenzflächenspannung $\gamma$ |
|---|-------------------------------|
| Wasser/Luft                               | 72 mN/m                       |
| Schaum (mit Emulgator)                    | > 35 mN/m                     |
| Öl/Wasser mit Protein                     | $\approx 10$ mN/m             |
| Öl/Wasser mit niedermolekularem Emulgator | $\approx 3$ mN/m              |

### 3.3.1.2. Grenzflächenbesetzungskinetik

Die Besetzung der Grenzfläche in Abhängigkeit der Zeit (Grenzflächenbesetzungskinetik) ist ein wichtiger Faktor bei der Bildung einer Emulsion. Wird das Adsorptionsgleichgewicht gestört wie dies beim Emulgierprozess durch die andauernde mechanische Zerkleinerung der dispergierten Phase stattfindet, versucht das System das Gleichgewicht mit Hilfe der Besetzung der neu entstandenen Grenzflächen wieder herzustellen. Die während des Emulgierprozesses ständig neu entstehende Phasengrenzfläche muss möglichst schnell von Emulgatormolekülen

besetzt werden, damit die Tropfen weiter zerkleinert und die neu gebildeten Tropfen ausreichend gegen Aggregation und Koaleszenz geschützt werden (AMBARCI und ARMBRUSTER, 1987; KARBSTEIN und SCHUBERT, 1995a und b; DUKHIN et al. 1995, STANG, 1998). Modelle zur Beschreibung der Grenzflächenbesetzungskinetik werden bei verschiedenen Autoren be-

schrieben (TORNBERG, 1978; MAC RITCHIE, 1978; HOLLEY, 1984; DE FEIJTER und BENJAMINS, 1987; DUKHIN et al., 1995).

### 3.3.1.3. Stabilisierung der Emulsion

Mikroemulsionen mit einer durchschnittlichen Tröpfchengrösse von  $< 1\ \mu\text{m}$  unterliegen der Brown'schen Wärmebewegung und sind somit stabil gegen Instabilitäterscheinungen. Makroemulsionen wie sie grösstenteils in der Lebensmittel verarbeitenden Industrie vorkommen sind thermodynamisch instabil. Das System möchte die Grenzfläche zwischen lipophiler und hydrophiler Phase durch Zusammenfliessen von Tropfen verringern. Dies kann zur vollständigen Phasentrennung d.h. zum Brechen der Emulsion führen.

Sobald grenzflächenaktive Moleküle an der Phasengrenzfläche adsorbiert sind, löst eine Vergrösserung oder eine Kompression der Grenzfläche eine Veränderung der Grenzflächenspannung aus, die mit dem Begriff „**surface dilational modulus  $E_{SD}$** “ erklärt werden kann (WALSTRA und SMULDERS, 1997).

$$E_{SD} = \frac{dy}{d\ln A} \text{ wobei } dy: \text{ Änderung der Grenzflächenspannung} \quad (3.9)$$

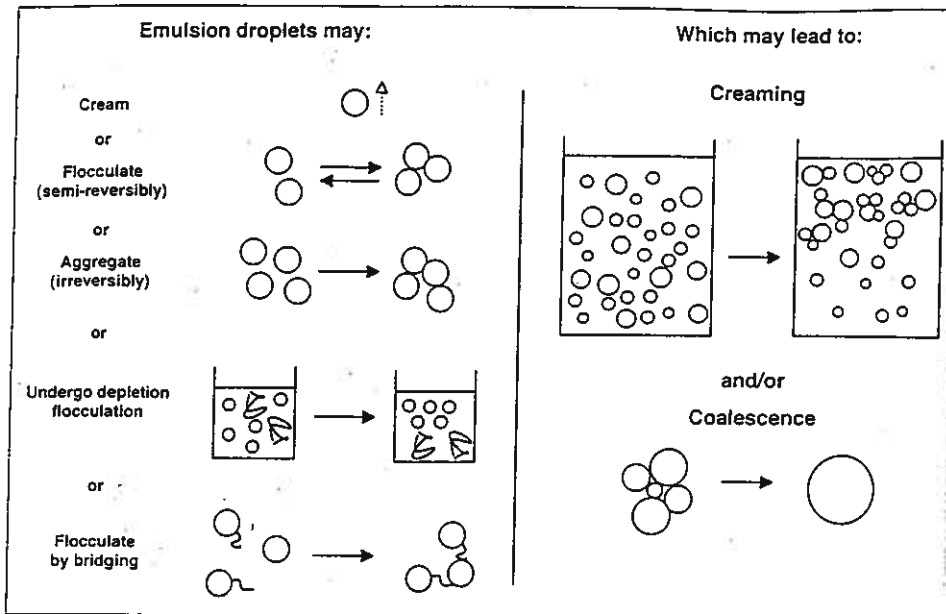
$dA$ : Änderung der Grenzfläche

Die daraus berechnete Viskosität des Grenzflächenfilmes ist ein wichtiges Kriterium zur Abschätzung der Stabilsierung einer Emulsion während der Emulsionsbildung und während der Lagerung.

Im folgenden sind verschiedene Mechanismen, die zur physikalischen Instabilität einer Emulsion führen können, kurz beschrieben und in Abbildung 3 dargestellt (WALSTRA, 1987; WALSTRA und SMULDERS, 1997; DALGLEISH, 1997). Mit dem Begriff „**Ostwald-Ripening**“ wird der Verlust der kleineren Partikel zu Gunsten der Partikel mit grösserem Durchmesser beschrieben. Dieser Effekt ist abhängig von der Löslichkeit der dispergierten in der kontinuierlichen Phase und hat somit vor allem bei der Stabilisierung von Schäumen grosse Bedeutung. Wegen der Dichtedifferenz zwischen Öl und Wasser kommt es zur **Sedimentation** der Wassertropfen in einer W/O-Emulsion bzw. zur **Aufrahmung** der Öltropfen in einer O/W-Emulsion. Anziehungskräfte verschiedenster Art zwischen den dispergierten Tropfen bewirken eine **Aggregation** (Agglomeration, Traubenbildung). Als Folge von Filmrisse fliessen die aggregierten Tropfen zusammen (**Koaleszenz**) und es kommt zu einer echten Änderung der Tropfengrössenverteilung. Die ursprüngliche Tropfengrössenverteilung kann nur durch erneutes Emulgieren hergestellt werden.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die sogenannte „**Depletion flocculation**“ (Filmverdünnungsaggregation). Dispergierte Tropfen aggregieren, falls der Film an kontinuierlicher Phase zwischen den Tropfen bis zu einer kritischen Dicke verdrängt wird. Dies ist der Fall, wenn Polysaccharide, die in geringer Konzentration als Verdickungsmittel zugegeben werden, zu gross sind, um zwischen den Tropfen Platz zu finden und einen osmotischen Druck auf die wässrige, kontinuierlichen Phase zwischen den Tropfen ausüben.

Durch die Adsorption von Makromolekülen, insbesondere Proteinen, an der Tropfenoberfläche kann es zur **Brückenbildung** („bridging flocculation“) zwischen zwei benachbarten Tropfen kommen. MilCHFettkügelchen können nach der ersten Homogenisationsstufe durch Kaseinmizellen verbunden werden, was zur Aufrahmung des MilCHFettes führt. Deshalb wird die Milch zweistufig homogenisiert.



**Abb. 3:** Physikalische Veränderungen, die zur Instabilität einer Öl-in-Wasser Emulsion führen. (DALGLEISH, 1997)

Zur Erklärung der Stabilität bzw. Instabilität von dispersen Systemen in wässriger Lösung haben unabhängig voneinander Derjaguin und Landau sowie Vervey und Overbeek die Anziehungs- ( $V_A$ ) und Abstossungsenergie ( $V_R$ ) zur gesamten Wechselwirkung überlagert (SCHUBERT, 1996). Die Theorie wird nach den Anfangsbuchstaben dieser Autoren mit DLVO-Theorie bezeichnet.

$$V = V_A + V_R \quad (3.10)$$

Dabei wird die Abstossung ( $V_R$ ) vom elektrostatischen Potential der Phasengrenze, Zeta ( $\Psi_0$ ), und die Anziehung ( $V_A$ ) von Van der Waals-Kräften bestimmt. Bereits während der Emulsionsbildung sind verschiedene Mechanismen zum Schutz gegen Koaleszenz der neu gebildeten Tropfen vorhanden. Die sterische Abstossung durch an der Oberfläche adsorbierte Emulgatoren verhindert Koaleszenz. Durch den Aufbau eines Grenzflächenspannungsgradienten entlang der Phasengrenzfläche kann die Filmverdünnungsrate (Geschwindigkeit mit der der Wasserfilm zwischen zwei sich annähernden Öltropfen dünner wird) reduziert und der Gibbs-Marangoni Effekt erhöht werden. Dies geschieht durch die Verschiebung von adsorbierten Emulgatormolekülen entlang dem Spannungsgradienten. Die wandernden Moleküle ziehen benachbartes Wasser mit. Dieses Wasser bewirkt, dass sich angenäherte Tropfen wieder voneinander entfernen (WALSTRA und SMULDERS, 1997).

Allgemein anerkannt ist, dass Emulsionen durch sterische Behinderung, rheologische Eigenschaften des Grenzflächenfilmes und Viskosität der kontinuierlichen Phase stabilisiert werden (DAMODARAN, 1996; SCHUBERT, 1996; WALSTRA und JENNESS, 1984; WALSTRA 1987; DUKHIN et al., 1995; KARBSTEIN, 1994). Bei der sterischen Stabilisierung ragen langkettige Emulgatormoleküle, die an der Phasengrenze adsorbiert sind, mit ihren hydrophilen Abschnitten und Enden in die kontinuierliche Phase und verhindern bei einer Annäherung zweier dispergierter Tropfen, dass der kritische Oberflächenabstand unterschritten wird. Solche hydrophilen Abschnitte und Enden werden "loop" (Schlaufe) bzw. "tail" (Schwanz) genannt. Grenzflächenaktive Stoffe können an der Grenzfläche über intermolekulare Interaktionen einen viskoelastischen Film bilden, der die dispergierte Phase aufgrund seiner viskoelastischen Eigen-



schaften vor mechanischen Einflüssen schützt. Nach dem Stokes'schen Gesetz kann die Sedimentations- bzw. Aufrahmggeschwindigkeit von Tropfen durch eine Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase reduziert werden.

### **3.4. Milchproteine als makromolekulare Emulgatoren (Emulgiereigenschaften)**

Proteine agieren wegen ihrer amphiphilen Molekülstruktur als makromolekulare Emulgatoren. Sie wandern an die Grenzfläche, wo sie einen energetisch günstigeren Zustand einnehmen als in einer der beiden Phasen (WALSTRA und DE ROOS, 1993; DUKHIN et al., 1995; DAMODARAN, 1996). Zudem tendieren die Proteine dazu, ihre Konformation während der Adsorption zu ändern, sich vollständig zu entfalten und in der Folge teils gestreckt entlang der Phasengrenze, teils in Form von Schlaufen oder abstehenden Enden in eine der beiden Phasen zu tauchen. Es ist nicht nur ein Konzentrationsgradient, der die Milchproteine von der grenzflächen-nahen Region an die Grenzfläche treibt, sondern auch die Reduktion der freien Energie durch entropische und enthalpische Änderungen des Systems, die auf hydrophoben, hydrophilen und elektrostatischen Eigenschaften der Proteinmoleküle beruhen. Diese wiederum sind von der Konformation der Proteine und den Umgebungsbedingungen abhängig (DAMODARAN, 1996). Nach erfolgter Adsorption an der Phasengrenze bilden Proteine über intermolekulare Interaktionen hochviskose Filme an den Grenzflächen aus.

Nach WALSTRA und DE ROOS (1993) zählen Aufrahmung bzw. Sedimentation, Aggregation und Koaleszenz zu den physikalischen Instabilitäten einer proteinstabilisierten Emulsion. Die meisten Proteine bewirken starke elektrostatische und sterische Abstossung zwischen zwei Öltröpfchen. Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, ist die sterische Stabilisierung wegen der abstehenden Peptidketten sehr effizient. Werden die Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Lösungsmittel etc.) so verändert, dass das Protein nicht mehr löslich ist, aggregieren proteinbedeckte Tropfen schnell. Auch die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken bei hohen Temperaturen führt zur Aggregation von Emulsionstropfen.

Grosse durchschnittliche Tropfendurchmesser, tiefe Grenzflächenspannung, ein dünner Film und kleine Abstossungsdistanz (Debye-Länge) können einen Filmriss zwischen aggregierten Tropfen auslösen. Proteine vermögen die Grenzflächenspannung weniger stark zu reduzieren als niedermolekulare Emulgatoren. Zudem bilden sie dicke Filme an der Phasengrenze, was dazu führt, dass in proteinstabilisierten Emulsionen Koaleszenz kaum erscheint.

HOLT und HORNE (1996) geben an, dass an der Oberfläche der Kaseinmizelle die van der Waals Anziehungskräfte und die Abstossung durch die elektrische Doppelschicht klein sind im Vergleich zur sterischen Abstossung durch die "haarige" Oberfläche der Kaseinmizellen.

#### **3.4.1. Einfluss der Proteinkonformation**

Allgemein anerkannt ist, dass ein Protein mit guten Emulgatoreigenschaften eine hohe Diffusions- und Adsorptionsrate sowie die Fähigkeit, sich an der Grenzfläche schnell zu entfalten und zu reorganisieren, um einen kohesiven, viskoelastischen Film zu bilden, aufweisen sollte (WALSTRA und JENNESS, 1984; CHEFTEL et al., 1992; DICKINSON, 1994; DAMODARAN, 1996). Die Diffusionsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Auffaltung der Proteine zu. Auch die Adsorptionsrate einiger Proteine ist im denaturierten Zustand höher als in der nativen Konfiguration. Bei globulären Proteinen werden durch die Denaturierung zusätzliche im nativen Zustand im Molekül versteckte hydrophobe Gruppen freigesetzt.

GRAHAM und PHILLIPS (1979b) untersuchten die Adsorptionsraten verschiedener Proteine an der Luft-Wasser Grenzfläche. Sie erklärten den Unterschied in der Adsorptionsrate von  $\beta$ -Kasein und BSA mit der unterschiedlichen Konformation der beiden Proteinmoleküle. Wegen der ungeordneten Struktur und dem Fehlen von Disulfidbrücken, besitzt  $\beta$ -Kasein eine hohe Flexibilität und entfaltet und reorientiert sich an der Grenzfläche schnell. Deshalb setzt  $\beta$ -Kasein die Grenzflächenspannung schneller herab als das hochstrukturierte BSA, das vier intramolekulare Disulfidbrücken besitzt.

### 3.4.2. Elektrostatische Effekte

Die Gegenwart von Ionen in einer Emulsion kann verschiedene elektrostatische Effekte haben. Einerseits führt die Adsorption von Ionen an ungeladene Emulgatoren zum Aufbau eines elektrostatischen Potentials, was zur Erhöhung der Abstossung zwischen den dispergierten Partikeln führt. Andererseits bewirken Ionen einen Ladungsausgleich, falls es sich bei den adsorbierten Proteinen um geladene Moleküle handelt. Dadurch wird das elektrostatische Potential der Phasengrenzfläche reduziert und die dispergierten Partikel neigen zu Aggregation (SCHUBERT, 1996).

MAC RITCHIE und ALEXANDER (1963c) stellten fest, dass durch Zugabe von NaCl das elektrokinetische Potential der Grenzfläche erhöht wird und in der Folge die Adsorptionsrate von BSA bei pH 6.9 abnimmt. Durch die Zugabe der Ionen wird ein elektrisches Potential an der Grenzfläche aufgebaut, das wie eine Barriere wirkt und infolge stärkerer Abstossung die Adsorptionsrate der Proteine reduziert.

Der Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf Kasein-stabilisierte Emulsionen kann mit der Bindung an die Phosphoserinseitenketten der Kaseine erklärt werden. Dies reduziert die negative Ladung des

Proteins und die Struktur der adsorbierten Moleküle verändert sich. Emulsionstropfen beginnen zu aggregieren, obwohl das elektrokinetische Potential noch nicht Null ist. Gemäss DALGLEISH (1997) ist nicht sicher, ob die Reduktion der sterischen oder der elektrostatischen Stabilisierung zum Bruch einer Emulsion führt. Die enzymatische Entfernung der  $\text{Ca}^{2+}$  empfindlichen Seitenketten von  $\beta$ - und  $\alpha_s$ -Kasein führte zur Stabilisierung der Emulsion. Durch die Konformationsänderung, die  $\beta$ -Lactoglobulin bei der Adsorption an Öl/Wasser Grenzflächen erfährt, sind die gebildeten Emulsionen ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  empfindlich. Dies obwohl  $\beta$ -Lactoglobulin im Gegensatz zu Kasein im nativen Zustand mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht fällbar ist.

### 3.4.3. Konfiguration der Proteine an der Grenzfläche

Untersuchungen verschiedener Autoren (GRAHAM und PHILLIPS, 1979a und 1979b; WALSTRA und DE ROOS, 1993; DALGLEISH, 1995, DALGLEISH, 1996, HOLT und HORNE, 1996) haben gezeigt, dass nach der Adsorption eines Proteinmoleküls an der Grenzfläche und der damit verbundenen Konformationsänderung nur ein Teil der Polypeptidkette in direktem Kontakt mit der Grenzfläche ist. Solche Abschnitte, die in direktem Kontakt mit der Grenzfläche stehen werden "trains" genannt. Daneben gibt es Abschnitte, die als sogenannte "loops", Schlaufen, und "tails", Schwänze, in der hydrophilen "Bulk" Phase suspendiert sind. Die Segmente am N- bzw. C-terminalen Ende des Proteins bilden die abstehenden Enden, die wie bereits erwähnt, auch für die sterische Stabilisierung der Kaseinmizellen verantwortlich sind und zum Ausdruck der haarigen Oberfläche von Kaseinmizellen geführt haben (HOLT und HORNE

1996). Nach WALSTRA und DE ROOS (1993) können hydrophobe Regionen des Proteinmoleküls zu einem kleinen Teil auch in die Ölphase tauchen.

Heute wird davon ausgegangen, dass sowohl Kaseine als auch Molkenproteine eine Konformationsänderung während der Adsorption an einer Phasengrenze erfahren. Das Ausmass der Konformationsänderung kann von vollständiger Streckung bis hin zur Erhaltung der nativen Struktur reichen. Die Verteilung von "trains", "loops" und "tails" an der Grenzfläche hängt im wesentlichen von der Flexibilität der Polypeptidkette, von der Grenzflächenspannung bzw. dem Filmdruck und vom Emulsionsalter ab. Ist die Phasengrenze voll mit Proteinen belegt, ist die treibende Kraft zur Adsorption und Auffaltung gering, da die freie Energie der Grenzfläche nicht mehr stark gesenkt werden kann.

Aufgrund der Molekülgrösse vermögen Proteine die Grenzflächenspannung niemals so stark zu reduzieren wie niedermolekulare Emulgatoren, da diese eine höhere Packungsdichte an der Phasengrenze erreichen. Je nach Konzentration und infolge von intermolekularen Interaktionen wie Aggregation, Disulfidbrückenbildung wird die Packungsdichte von Milchproteinen, insbesondere der Kaseine, und somit die Grenzflächenbelegungs-dichte  $\Gamma$  erhöht (DALGLEISH, 1997).

Wegen seiner Flexibilität adsorbiert  $\beta$ -Kasein rasch an der Grenzfläche und breitet sich dort in einem einschichtigen Film (Monolayer), der nach GRAHAM und PHILLIPS (1979 b, c) irreversibel gebunden ist, aus. WALSTRA und DE ROOS (1993) geben an, dass  $\beta$ -Kasein mit zunehmender Grenzflächenbelegungs-dichte  $\Gamma$  eine kompaktere Form an der Phasengrenze einnimmt und vor allem die hydrophoben Regionen direkt an der Phasengrenze liegen. Dies bedeutet, dass das Protein seine Konformation ständig den Platzverhältnissen anpasst und somit äusserst flexibel ist. Dieser Sachverhalt wurde von DALGLEISH (1996) bestätigt.

DICKINSON (1994) gibt eine Übersicht über molekulare Unterschiede der adsorbierten Schichten von ungeordnetem  $\beta$ -Kasein und globulären Proteinen wie  $\beta$ -Lactoglobulin und BSA.  $\beta$ -Kasein ist relativ lose angeordnet und bildet einen einschichtigen Film an der Öl-Wasser Phasengrenze. Etwa 70% des Proteinmoleküls bedeckt die Phasengrenze in der Form von "trains" und kleinen, in die wässrige Phase ragenden Schlaufen. Der hydrophile Rest der Seitenketten taucht in grösseren Schlaufen in die wässrige Phase und ist hauptsächlich für enzymatische Angriffe zugänglich (DALGLEISH und LEAVER, 1991). Die schematische Darstellung von  $\beta$ -Kasein-Molekülen an der O/W-Phasengrenze ist in Abbildung 4 dargestellt (DALGLEISH, 1997).

Im Gegensatz zu Kaseinen bilden globuläre Molkenproteine einen, wegen der teilweisen Auffaltung enger gepackten, ca. 3 nm dicken, mehrschichtigen Film an der Grenzfläche. Aufgrund der starken intermolekularen Interaktionen, Disulfidbrückenbildung und hydrophoben Interaktionen wird angenommen, dass die Molkenproteine irreversibel adsorbiert sind. GRAHAM und PHILLIPS (1979 b, c) beobachteten, dass bei der Adsorption von globulären Proteinen wie beispielsweise BSA bei konstantem Filmdruck eine stetige Zunahme der Grenzflächenbelegungs-dichte  $\Gamma$  erfolgt. Sie setzten diesen Sachverhalt mit der Bildung eines mehrschichtigen Filmes an der Grenzfläche gleich.

DALGLEISH und LEAVER (1991), DALGLEISH (1996) und CRUIJSEN (1996) geben für adsorbierte Proteinfilm bestehend aus  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Kasein,  $\kappa$ -Kasein, Gesamtkasein und  $\beta$ -Lactoglobulin je eine Schichtdicke von 10 - 15 nm, 8 - 9 nm, 12 nm bzw. 2 nm an. Diese Schichtdicken werden nur erreicht, wenn die Proteine im Überschuss vorhanden sind (höher als die kritische Mizellenbildungskonzentration CMC). Bei Gesamtkasein beträgt die Schichtdicke 5 nm, falls die Grenzflächenbelegungs-dichte kleiner als 1mg/m<sup>2</sup> ist. Im Überfluss (> 2mg/m<sup>2</sup>) ist

die berechnete Schichtdicke ungefähr 10 nm dick. Die Ursache für die Unterschiede in der Schichtdicke liegen in der Flexibilität der Milchproteine. Kaseine sind flexibler als Molkenproteine und sind in der Lage Schlaufen und Schwänze mit grosser Distanz zur Phasengrenze in die wässrige Phase abstehen zu lassen. Mittels proteolytischer Behandlung mit Trypsin wurde bewiesen, dass  $\beta$ -Kasein an der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser mit einer grossen Schlaufe, welche die hydrophilen Aminosäure-Regionen 25 bis 28 beinhaltet, in die wässrige Phase ragt (DALGLEISH und LEAVER, 1991).

Die Dicke der adsorbierten Proteinschicht hängt stark von den vorhandenen Proteinfractionen, ihrer Konzentration und der Reihenfolge ihrer Zugabe zum System ab. DALGLEISH und LEAVER (1991) zeigten, dass durch die Zugabe von  $\beta$ -Kasein zu einer mit  $\beta$ -Lactoglobulin stabilisierten Emulsion die Schichtdicke um die dispergierten Öltröpfen von 2 nm auf 14 nm erhöht wurde. Die Zunahme der Schichtdicke erklärten die Autoren mit Interaktionsreaktionen zwischen den beiden Proteinen und der Bildung eines gemischten, mehrschichtigen Proteinfilmes.

MONAHAN et al. (1993) untersuchte den Einfluss der Lagerdauer auf den Polymerisationsgrad der an der Öl-Wasser Phasengrenze adsorbierten Molkenproteine. Er stellte fest, dass  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im Vergleich zu BSA und Ig bevorzugt adsorbiert werden. Sowohl  $\beta$ -Lactoglobulin als auch  $\alpha$ -Lactalbumin unterliegen Polymerisationsreaktionen im Grenzflächenfilm. Die Bildung von Di-, Tri- und Polymeren findet mit Hilfe des Sulfhydryl-Disulfidaustausches und Disulfidbrücken zwischen freien Thiol-Gruppen des  $\beta$ -Lactoglobulins und den Disulfid-Gruppen des  $\alpha$ -Lactalbumins statt. Dagegen scheinen BSA und Ig an der Bildung eines viskoelastischen Grenzflächennetzes unbeteiligt zu sein.

#### 3.4.4. Kompetitive Adsorption

In echten Lebensmittelsystemen kann es zum Austausch der an der Grenzfläche adsorbierten Proteine durch andere Proteine, Fette, Öle und weitere grenzflächenaktive Stoffe kommen. Durch diese kompetitive Adsorption werden die Emulgiereigenschaften verbessert oder verschlechtert.

Unter der Voraussetzung, dass keine weiteren grenzflächenaktiven Komponenten im System vorhanden sind, scheint die Grundregel zu sein, dass diejenigen Moleküle, die während der Emulsionsbildung zuerst an der Phasengrenze adsorbieren auch dort verbleiben. Dies bedeutet, dass verschiedene Proteinmoleküle einander an der Grenzfläche nicht ersetzen können (WALSTRA und DE ROOS, 1993). Ursachen hierfür ist die grosse Aktivierungsenergie, die für die Desorption eines Proteins aufgewendet werden muss, sowie die geringen Unterschiede

in der Grenzflächenspannungsabnahme nach Zugabe verschiedener Milchproteine. Dem Grundsatz, dass diejenige Proteinfraction, die während der Emulsionsbildung an der Phasengrenze adsorbiert, auch die vorherrschende Fraktion während der Lagerung ist, schliesst sich auch DICKINSON (1994) an. Allerdings macht er einen Unterschied zwischen Molkenproteinen und Kaseinen. Aufgrund der Flexibilität und Mobilität der adsorbierten Kaseinfractionen findet ein gegenseitiger Austausch bis zum scheinbaren Gleichgewicht zwischen adsorbierten und in der wässrigen Vorlage gelösten Polypeptiden statt. In gemischten Systemen jedoch fand kein eigentlicher Austausch zwischen Kaseinen und Molkenproteinen in der untersuchten Zeit (48 h) statt.

Wie im folgenden beschrieben wird, stellte eine Reihe anderer Autoren aufgrund einer grossen Anzahl Untersuchungen mit Modellsystemen sowie der nativen Fettkügelchenmembran fest,

dass unter bestimmten Umständen Austauschreaktionen stattfinden. Wie vorher erwähnt, hat in diesem Zusammenhang die zeitliche Reihenfolge des Zusatzes verschiedener Milchproteine bei der Herstellung einer Emulsion ebenfalls einen grossen Einfluss auf die Konkurrenz in der Grenzflächenbesetzung (PHIPPS und TEMPLE, 1982; DICKINSON et al., 1989; HUNT und GALGLEISH, 1994). HUNT und DALGLEISH (1994) vermuten, dass bereits adsorbierte Kaseinmoleküle die Adsorption der Molkenproteine und somit die Bildung eines mehrschichtigen Grenzflächenfilmes sterisch behindern. Diese Feststellung stützt wiederum die Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen in denen festgestellt wurde, dass die Reihenfolge der Zugabe von Milchproteinen bei der Emulsionsherstellung von Bedeutung für die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Grenzflächenfilmes ist.

In Lebensmittelemlusionen bilden die Kaseine die Hauptkomponente der Makromoleküle, die in der Phasengrenzfläche von dispergierten Fetttröpfchen vorkommen. DICKINSON et al. (1989) und DICKINSON und WHYMAN (1987) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass  $\beta$ -Kasein grenzflächenaktiver ist als die anderen Kaseine. Ein gegenseitiger Austausch von adsorbiertem  $\beta$ -Kasein und  $\alpha_{s1}$ -Kasein an der Öl-Wasser Phasengrenze findet statt und zwar schneller von  $\alpha_{s1}$ -Kasein durch  $\beta$ -Kasein als in umgekehrter Richtung. In wenigen Minuten wird der Gleichgewichtszustand zwischen adsorbierten und in der wässrigen Umgebung (= bulk) gelöster Moleküle erreicht. Im Gegensatz dazu findet bei den Molkenproteinen,  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin kaum ein messbarer Austausch statt. Insbesondere  $\beta$ -Lactoglobulin, das einmal an der Phasengrenze adsorbiert hat, ist durch  $\alpha$ -Lactalbumin nicht zu ersetzen. Zudem wird ein Gleichgewichtszustand zwischen adsorbierten und gelösten Molkenproteinen erst nach 30 Stunden, wenn überhaupt, erreicht. Diese Beobachtungen veranlassten die Autoren zur Vermutung, dass Kaseine reversibel an die Grenzfläche zwischen Öl und Wasser gebunden sind und dass die kompetitive Adsorption einer thermodynamischen Kontrolle unterliegt.

Dagegen werden die Molkenproteine beinahe irreversibel gebunden und die Konkurrenz bei der Adsorption ist vom kinetischen Zustand kontrolliert. Unabhängig davon, ob die Molkenproteinfraktion grenzflächenaktiv ist oder nicht, herrscht an der Tröpfchenoberfläche dasjenige Molkenprotein vor, das zuerst im System vorhanden war. Ursache für dieses Verhalten ist die Fähigkeit der globulären Proteine über Disulfidbindungen einen viskoelastischen Film an der Phasengrenze zu bilden, aus dem ein Molekül schwer heraus zu lösen ist.

HUNT und DALGLEISH (1994) untersuchten die Adsorptionseigenschaften der Milchproteine in Mehrkomponenten-Systemen wie Molkenproteinisolat und Kaseinat an der Sojaöl-Wasser Phasengrenze. Die Grenzflächenbelegungsdichte  $\Gamma$  wurde empirisch nach Zentrifugation über die elektrophoretische Untersuchung (SDS-PAGE) und darauffolgender densitometrischer Auswertung (quantitativ) der in der Ölphase vorhandenen Proteinmenge bestimmt. So konnte der mengenmässige Anteil der einzelnen Proteinfraktionen an der Phasengrenze in Abhängigkeit der gesamten Proteinkonzentration in der ursprünglichen Emulsion mit 20% Sojaöl erfasst werden. Sie stellten fest, dass bei Proteinkonzentrationen von weniger als 1.0 Gew.-% ein einschichtiger Proteinfilm gebildet wird. Die Kaseine vermögen sich aufgrund ihrer Flexibilität stärker auszubreiten (12.05 m<sup>2</sup>/g). Bei einer Proteinkonzentration im Überschuss (> 2.5 Gew.-%) kommt es zur Bildung eines mehrschichtigen Filmes, der bis maximal 3.24 mg Protein/m<sup>2</sup> betragen kann. > 2.5 Gew.-% Potein überwiegt der Anteil an Kaseinen in der adsorbierten Schicht. Sobald jedoch Kaseine zuerst an die Phasengrenze gebunden werden, wird die Bildung eines mehrschichtigen Filmes verhindert.

Niedermolekulare Emulgatoren können, falls in höheren Konzentrationen vorhanden, adsorbierte Proteine ersetzen, da sie eine stärkere Reduktion der Grenzflächenspannung bewirken und somit die freie Energie der Grenzfläche herabgesetzt wird. Dabei sind wasserlösliche Emulgatoren im

Vergleich zu öllöslichen effizienter (WALSTRA und DE ROOS, 1993). GAONKAR (1989) weist in seinem Artikel darauf hin, dass Mono- und Diglyceride, freie Fettsäuren und Phospholipide, die in geringen Mengen in raffiniertem Pflanzenöl vorhanden sind, die Adsorptionskinetik von Emulgatoren beeinflussen können. Da die Grenzflächenspannung  $\gamma$  zwischen ungereinigtem Öl und Wasser oft bei unter 20 mN/m, diejenige zwischen gereinigtem Öl und Wasser bei 26 bis 32 mN/m liegt, schlägt er deshalb die Verwendung einer teilweise gereinigten Ölphase für Modellversuche vor.

COURTHAUDON et al. (1991) sowie CHEN et al. (1993) untersuchten den Einfluss des wasserlöslichen Emulgators Tween 20 (Sorbitanester) auf die kompetitive Adsorption an der Öl-Wasser Phasengrenze zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Kasein. In einem Verhältnis Tween 20 zu Gesamtprotein von 2:1 führte die Zugabe von Tween 20 vor der Emulsionsbildung zur bevorzugten Adsorption von  $\alpha$ -Lactalbumin. Bei einer bereits vorhandenen Emulsion bewirkte Tween 20 die selektive Desorption von  $\beta$ -Lactoglobulin. Es scheint, dass die Gegenwart von Tween 20 den kompetitiven Proteinaustausch zwischen der Phasengrenze und Bulk-Phase durch die Bildung eines Tween 20- $\beta$ -Lactoglobulin-Komplexes erleichtert. In älteren Emulsionssystemen (> 24h bzw. 48h), in denen der Grenzflächenfilm durch die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin gefestigt ist, hat der Zusatz von Tween 20 keinen Einfluss mehr.

Die Ablösung der Oligomere eines älteren und somit stabilen Grenzflächenfilmes durch wasserlösliche Emulgatoren ist schwieriger als die Ablösung nativer  $\beta$ -Lactoglobulin Moleküle von der Oberfläche eines frischen Öltropfens. Bei  $\beta$ -Kasein hat der Zusatz von wasserlöslichen Emulgatoren nach der Emulsionsbildung keinen zeitabhängigen Einfluss auf den Austausch bereits adsorbierter Proteinmoleküle. Mit zunehmendem Konzentrationsverhältnis von Emulgator zu  $\beta$ -Kasein herrschen die niedermolekularen Stoffe an der Grenzfläche vor.

Der Einfluss der kompetitiven Adsorption zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin bzw.  $\beta$ -Kasein und niedermolekularen Emulgatoren (Tween 20, Lecithin) an der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser war ebenfalls Gegenstand in den von DICKINSON et al. (1996) und AGBOOLA und DALGLEISH (1996b) durchgeführten Untersuchungen an hitzeinduzierten (heat set) Emulsionsgelen und Emulsionen. Falls der Emulgator und das  $\beta$ -Lactoglobulin gleichzeitig während der Emulsionsbildung im System vorhanden waren, fand eine bevorzugte Adsorption der niedermolekularen Emulgatoren statt. Die Stärke des Gels nach der Hitzebehandlung war gering, da beispielsweise mit Lecithin bedeckte Öltropfen das mit  $\beta$ -Lactoglobulin gebildete Netzwerk störten. Wird der Emulgator jedoch erst nach der Emulsionsbildung zugegeben, ist die Oberfläche der dispergierten Öltropfen bereits mit  $\beta$ -Lactoglobulin besetzt. Die Ausbildung eines Netzwerkes infolge der Hitzebehandlung hängt nun entscheidend von der Fähigkeit des Emulgators ab, die adsorbierten Milchproteine an der Phasengrenze zu verdrängen. Lecithin vermag adsorbierte Molkenproteine und Kaseine nicht zu ersetzen. Durch die Hitzebehandlung kommt es zur Komplexbildung zwischen Emulgator und adsorbierten sowie nicht adsorbierten Proteinmolekülen mit der Folge einer Zunahme der Gelstärke des Emulsionsgels. Die Zugabe von Tween 20 gleich nach der Emulsionsbildung bewirkt einen Austausch zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\beta$ -Kasein, in Abhängigkeit der Konzentration, an der Grenzfläche. Die anschließende Hitzebehandlung führt je nach Austauschgrad zu einer Zu- bzw. Abnahme der Gelstärke. Bei einem Konzentrationsverhältnis zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und Tween 20 von 1:1 wirken die Öltropfen als Verstärkerpartikel im Gel, da sie an der intermolekularen Brückenbildung im Netzwerk durch die an ihrer Oberfläche adsorbierten Proteine beteiligt sind. Mit zunehmender Konzentration (4:1) an Tween 20 nimmt die Grenzflächenbelegungsichte  $\Gamma$  von  $\beta$ -Lacto-

globulin ab, die Öltröpfchen behindern die Ausbildung eines Proteinnetzwerkes und die Gelstärke nimmt stark ab.

Eine zeitabhängige Veränderung der mit Kasein stabilisierten Emulsion nach Zugabe von Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), mit zwei ungesättigten Fettsäuren, in höheren Konzentrationen (>10:1) stellten FANG und DALGLEISH (1996) fest. Sie erklärten die Instabilität der Emulsion mit der selektiven Ablösung von  $\beta$ -Kasein von der Phasengrenze. Die über die direkte Methode nach HUNT und DALGLEISH (1994) erhaltenen Resultate der SDS-PAGE Analyse zeigten, dass  $\beta$ -Kasein mit zunehmendem Alter der Emulsion (bis 48 h) in der Gegenwart von DOPC vollständig von der Phasengrenze entfernt wurde, währenddem die Belegungsdichte an  $\alpha_{s1}$ -Kasein konstant blieb. Die Autoren vermuten, dass diese selektive Entfernung von  $\beta$ -Kasein mit der spezifischen Bindung von DOPC an  $\beta$ -Kasein erklärt werden kann. Falls die Bindungsstelle in der hydrophoben Region des  $\beta$ -Kasein Moleküls liegt, könnte der DOPC- $\beta$ -Kasein-Komplex von der Phasengrenze desorbieren, da er nun eine hydrophile Oberfläche besitzt.

DICKINSON et al. (1987) untersuchten die kompetitive Adsorption von Gelatine und Natrium-Kaseinat. Bei einem pH von 7.0 verhindern Kaseine die Adsorption von Gelatine an der Öl/Wasser Grenzfläche, sofern beide Komponenten während der Emulsionsbildung im System vorhanden sind. Weiter konnte gezeigt werden, dass adsorbierte Gelatinemoleküle von Kaseinat, das 1 Stunde nach der Emulsionsbildung zugegeben wurde, an der Phasengrenze kontinuierlich ausgetauscht werden. Innerhalb von 10 Stunden nimmt der Anteil der Gelatinemoleküle an der Phasengrenze auf 0.8 Gew.% ab und bleibt bei diesem Wert konstant. Die Grenzflächenspannung nimmt zu und gleicht sich derjenigen von Na-Kaseinat an. Erfolgt die Zugabe von Kaseinat 24 Stunden nach der Emulsionsbildung, werden die Gelatinemoleküle nur zu 50% ausgetauscht. Dies bedeutet, dass Gelatine innerhalb von 24 Stunden über Vernetzungsreaktionen einen stabilen Grenzflächenfilm aufbaut. Kaseine penetrieren die adsorbierte und vernetzte Gelatineschicht und bilden mit Gelatine zusammen einen gemischten Film, der eine hohe Viskosität besitzt. In einer zusammenfassenden Arbeit von DICKINSON und HONG (1994) ist eine Aufzählung der effektivsten Austauschsubstanzen von adsorbiertem  $\beta$ -Lactoglobulin enthalten. Am effektivsten ist Tween (Sorbitanester) vor zwitterionischen Phospholipiden (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) oder DATEM (Diacetylweinsäureester). Die Reduktion des pH-Wertes der Emulsion, die Lagerung sowie Hitzebehandlung erschweren die Desorption von adsorbiertem  $\beta$ -Lactoglobulin.

Die Temperatur hat einen wesentlichen Einfluss auf die kompetitive Adsorption zwischen Milchproteinen und niedermolekularen Emulgatoren (KROG, 1991). Die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Öl, das gesättigte Monoglyceride enthält, nimmt bei einer Temperatursenkung von 40°C auf 5° von 18 mN/m auf 2 - 4 mN/m ab. Ist die Phasengrenze mit Hilfe von Milchproteinen stabilisiert, macht sich der Temperatureinfluss nicht bemerkbar, d.h. die Grenzflächenspannung bleibt im gesamten Temperaturbereich bei 10 mN/m. In gemischten Systemen kommt es ab Temperaturen < 20°C zu einer Desorption von Milchproteinen, die an der Phasengrenze durch einen Film von Monoglyceriden ersetzt werden. Dieser Austauschvorgang wird mit der reduzierten Löslichkeit hydrophober Proteinseitenketten an der kristallisierten Fettkügelchenoberfläche bei tiefen Temperaturen erklärt. In der Speiseeisherstellung ist die Desorption von Milchproteinen während der Reifung erwünscht.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass das Ausmass des Austausches von adsorbierten Milchproteinen durch niedermolekulare Emulgatoren von deren spezifischem Molekülbau, dem Zeitpunkt der Zugabe zum System sowie der Temperatur abhängig ist.

### 3.4.5. Kompetitive Adsorption am Beispiel der Speiseeisherstellung

Speiseeis ist eine komplexe, geschäumte Emulsion auf der Basis von Milchbestandteilen. Diese besteht aus einer gefrorenen Matrix mit eingeschlossenen Luftblasen, Fettkügelchen, Eiskristallen sowie einer ungefrorenen Serumphase. Die Luftblasen sind von einem Mantel aus Fettkügelchen, die teilweise mit einer Milchprotein-Emulgator Schicht stabilisiert sind, umhüllt. Die Serumphase besteht aus Zuckern und hochmolekularen Hydrokolloiden in einer gefrierkonzentrierten Lösung. Die Entstehung der Struktur des Endproduktes ist als ein Zusammenspiel der drei Phasen, deren Partikelgrößenverteilung sowie der viskoelastischen Eigenschaften der die Phasen umfassenden Lamellen zu sehen (GOFF et al., 1995).

Bei der Herstellung von Speiseeis ist die kompetitive Adsorption von Milchproteinen und Emulgatoren Voraussetzung für die erwünschte Qualität des Endproduktes (Kremigkeit, Körper, Mundgefühl, Abschmelzverhalten). Neuere Erkenntnisse bezüglich des Zusammenspiels der verschiedenen Inhaltsstoffe und dessen Auswirkung auf Emulsions- und Schaumstrukturen in Speiseeis sind von mehreren Autoren zusammengefasst worden (TIMM, 1985; GOFF et al., 1989; BARFOD et al., 1991; BUCHHEIM, 1992; GOFF et al., 1995; MARSHALL und ARBUCKLE, 1996).

Nach dem Homogenisieren wird der Mix, der eine Öl-in-Wasser Emulsion darstellt, von Milchproteinen stabilisiert. Die Mix-Emulsion wird zur vorteilhaften Beeinflussung verschiedener physikalischer Eigenschaften im Endprodukt einer Reifung bei etwa 5°C unterzogen. Während der Reifung, die je nach Fettgehalt des Endproduktes mehrere Stunden dauert, kristallisiert die Fettphase des Mixes, gleichzeitig kommt es zu einer langsamen Desorption von zuvor adsorbiertem Protein von der Oberfläche der Fettkügelchen. Elektronenmikroskopisch lässt sich zeigen, dass in frisch hergestellten Speiseeisemulsionen nach der Homogenisierung die Fettkügelchen durch eine adsorbierte Proteinschicht stabilisiert werden und zwar unabhängig davon, ob die Fettphase einen Emulgator enthält oder nicht. Während der Kaltlagerung des Mixes wird mit zunehmender Dauer bei Mixen mit dem Emulgator eine Ablösung dieser Proteinfilme festgestellt (BUCHHEIM, 1992). Der Austausch von Proteinen verläuft nur in Gegenwart von niedermolekularen, grenzflächenaktiven Stoffen (Lecithin, Mono-, Diglyceride, Phospholipide, freie Fettsäuren) ab. BARFOD et al. (1991) zeigten, dass niedermolekulare Emulgatoren nicht nur die Proteindesorption, sondern auch die Fettkristallisation und die Agglomeration von Fettpartikeln beeinflusst. Die Geschwindigkeit der Reaktionen wird durch Emulgatoren bei Temperaturen unter 10°C stark erhöht, d.h. die Mix-Emulsion wird also destabilisiert. Die tiefere Grenzflächenspannung hat zur Folge, dass durch die Scherkräfte beim Luft einschlag sowie die entstehenden Fettkristalle im Freezer, die Fettkügelchenmembran geschädigt wird und ein Teil des flüssigen Fettes auslaufen kann. Das partielle Ausbuttern und die geringfügige Agglomeration von Fettpartikeln begünstigen wegen dem ständigen Auskristallisieren von Fett die Stabilisierung der kontinuierlich neu gebildeten Luftblasen. Zudem agiert das ausgelaufene Butterfett als Kittsubstanz zwischen Luftblasen, Fettkügelchen und anderen Inhaltsstoffen im Speiseeis. Die Luftblasenbildung wird zusätzlich gefördert durch die Desorption von Milchproteinen von der Öl-Wasser Grenzfläche und deren Adsorption an der Luft-Wasser Phasengrenze, wodurch die Grenzflächenspannung stark reduziert wird, und Fettkristallen, die die Fettkügelchenmembranen durchstossen (GOFF et al., 1989). Ein bestimmtes Mass von deemulgiertem Pflanzenfett oder ein sogenannt teilweises Ausbuttern und das Zusammenklumpen von freiem Fett im Glacémix hat eine schaumige, feine, trockene, vollmundige Struktur und eine langsame Abschmelzrate zur Folge (KOKUBO et al., 1996). Durch die Zugabe von niedermolekularen ungesättigten (Glycerolmonooleat, Sorbitanmonooleat, Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween 80) und gesättigten (Glycerolmonostearat, Sorbitanmonostearat oder Polyoxyethylensorbitanmonostearat



(Tween 60) Emulgatoren zum Eiscrememix konnten GOFF und JORDAN (1989) zeigen, dass eine indirekte Proportionalität zwischen Grenzflächenspannung und Fettdestabilisierung, ausgelöst durch die verschiedenen Emulgatoren im Glacémix, besteht. Tween 80 bewirkt die stärkste Fettdestabilisierung und zugleich die tiefste Grenzflächenspannung zwischen Serum und Butterfett. Fettdestabilisierung ihrerseits bewirkt die Bildung eines feinen Speiseeises mit guten Abschmelzeigenschaften infolge einer mit Hilfe des Fettnetzwerkes verbesserten Schaumstruktur. Diese Beobachtungen wurden von PELAN et al. (1997) bestätigt. Wasserlösliche Emulgatoren wie Tween 60 waren im Vergleich zu öllöslichen Emulgatoren (Monoglyceride und Lecithin) in Bezug auf den Proteinaustausch effektiver. Die Funktionalität von gesättigten Mono- und Diglyceriden bei der Stabilisierung des Speiseeismix scheint nicht im Proteinaustausch allein zu bestehen. Die Autoren vermuten, dass diese Emulgatoren bei hohen Konzentrationen in den Öltröpfchen auskristallisieren und so die Emulsion stabilisieren. Der Proteinaustausch und damit verbunden die Fettdestabilisierung im Speiseeismix, korrelierten mit kleineren Luftzellen und besserem Abschmelzverhalten des Endproduktes. Eine zu starke Fettdestabilisierung bewirkt allerdings die Koaleszenz von Luftblasen im Endprodukt.

GOFF et al. (1989) untersuchten den Einfluss verschiedener Milchproteinkonzentrate auf die Emulsionsstabilität von Speiseeis. Der Einsatz von Molkenproteinkonzentrat bewirkte eine weniger stabile Emulsion als der Einsatz von Caseinaten. Dies konnte mittels Grenzflächenspannung (tiefer Spannung bei 70°C) und einer erhöhten Fettdestabilisierung nachgewiesen werden.

KOKUBO (1994) untersuchte den Einfluss der Freezeraustrittstemperatur, des Aufschlages (Overrun), die Freezer-Bauart sowie der Umdrehungsgeschwindigkeit des Freezerrotors auf die Fettdeemulgierungsrate und das Abschmelzverhalten. Je tiefer die Freezeraustrittstemperatur war, desto stärker war das Fett deemulgiert und desto langsamer war der Schmelzvorgang. Dies wurde in anderen Studien mit einer Veränderung der Partikelgrößenverteilung bestätigt. Eine Zunahme des Overruns hat eine Reduktion der Schmelzgeschwindigkeit infolge tieferer Wärmeleitfähigkeit zur Folge. Auch die Struktur des Speiseeises erscheint trockener, da mehr deemulgiertes Fett vorhanden ist. Zusätzlich führt ein geringes Mixvolumen im Freezerspalt sowie eine hohe Umdrehungszahl zu einem langsameren Abschmelzverhalten und einer grösseren Fettdeemulgierungsrate, was sich wiederum in einer verbesserten, trockeneren Struktur äussert. In einer weiteren Studie stellten KOKUBO et al. (1996) einen Unterschied im Deemulgiereffekt bei verschiedenen Fettypen im Premix fest. Die über die Partikelgrößenverteilung ermittelte Menge an freiem, deemulgierten Fett nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: Rahm, Butter, Pflanzliche Fette. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Fetten und deren Effekt auf die Speiseeisstruktur wurde in sensorischen Tests bestätigt.

Die unterschiedliche Kombination einzelner Zutaten wie Magermilchpulver, Molkenproteinkonzentrat, Polysorbat und gesättigte Monoglyceride hatten unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen und sensorische Eindrücke zur Folge (GELIN et al., 1996). Polysorbat 80 beispielsweise ersetzt die Proteine an der Phasengrenzfläche in grösserem Ausmass als Monoglyceride, was zu einer tieferen Grenzflächenspannung der Fettkügelchenoberfläche führt. Die Phasengrenze ist schwächer und wird im Freezer stärker beschädigt. Diese Proben, mit einem grösseren Anteil an freiem Fett, wurden in der sensorischen Prüfung als cremiger bezeichnet. Die Zusammenfassung aller Resultate bringt die Autoren (GELIN et al., 1996) zur Aussage, dass eine partielle Destabilisierung des emulgierten Fettes im Speiseeismix notwendig ist, um die Textureigenschaften zu verbessern.

### 3.4.6. Stabilität der mit Milchproteinen hergestellten Emulsion

Bereits GRAHAM und PHILLIPS (1979) berichteten, dass der Hydratmantel, die elektrostatische und sterische Abstossung zwischen den proteinbelegten Grenzflächen, mit den abstehenden Proteinschlaufen und -enden massgebend für die Emulsionsstabilität sind.

Verschiedene weitere Untersuchungen ergaben, dass die Hydrophobizität des adsorbierten Proteins verantwortlich für die Stabilität einer Emulsion ist (KATO und NAKAI, 1980; KATO et al., 1983; ROBSON und DALGLEISH, 1987). Der zeitabhängige Austausch von weniger hydrophoben Proteinen durch hydrophobere Moleküle an der Grenzfläche ergaben eine bessere Emulsionsstabilität. Allerdings liefert die Untersuchung der Hydrophobizität der Oberfläche von Milchproteinen je nach Methode unterschiedliche Resultate, die keine Korrelation mit der Emulgieraktivität aufweisen (SHIMIZU et al., 1986). Aus diesem Grunde ist die Bestimmung der Hydrophobizität als Mittel zur Vorhersage der Emulgiereigenschaften von Milchproteinen in der neuesten Literatur nicht mehr anzutreffen.

Aufgrund verschiedener Untersuchungen, die in den vorangehenden Kapiteln zusammengefasst wurden, kann gesagt werden, dass Milchproteine eine Emulsion insbesondere durch sterische Behinderung (v.a. Kaseine) und Bildung eines viskoelastischen Grenzflächenfilmes (v.a. Molkenproteine) stabilisieren.

### 3.5. Methoden zur Charakterisierung der Emulgiereigenschaften

Nach wie vor ist es schwierig, einen für die Produktezusammensetzung geeigneten Emulgator zum voraus auszuwählen. Für niedermolekulare Emulgatoren werden häufig der HLB-Wert (HLB = hydrophilic lipophilic balance) des Emulgators, die Phasen-Inversions-Temperatur (PIT) und die Emulgierkapazität (EC) als erste Anhaltswerte gewählt (KINSELLA, 1976, STANG, 1998).

Noch schwieriger wird es bei den makromolekularen Emulgatoren. Die Emulgiereigenschaften von Milchproteinen werden von der Adsorptionsrate an der Öl-Wasser Grenzfläche, der Grenzflächenbelegungsdichte  $\Gamma$ , vom Ausmass der Konformationsänderung an der Grenzfläche, der Reduktion der Grenzflächenspannung  $\gamma$ , und der Fähigkeit einen kohäsiven Film via Disulfid-Brücken zu bilden, bestimmt (DAMODARAN, 1996).

GRAHAM und PHILLIPS (1979b) geben einen Überblick über Adsorptionsisothermen für Proteine. Da sich bei der Adsorption von Proteinen an Phasengrenzflächen deren Tertiärstruktur verändert, ist deren Adsorption in der Regel irreversibel. Adsorbierte Proteine desorbieren nicht, wenn die Konzentration einer Proteinlösung, die zunächst mit einer Grenzfläche im Gleichgewicht war, verringert wird. Die Gibbs-Isotherme (Gl. 3.7) kann daher nicht für Proteine angewendet werden (DE FEIJTER und BENJAMINS, 1987).

Zur Bestimmung der Grenzflächenbelegungsdichte in Abhängigkeit der Zeit existieren jedoch andere Ansätze. Nach COURTHAUDON et al. (1991) werden Emulsionen mit einer bestimmten Menge an Protein hergestellt und die Tropfengrösse bzw. die gesamte Grösse der Oberfläche gemessen. Danach wird die disperse Phase abzentrifugiert und die Konzentration des Proteins in der kontinuierlichen Phase bestimmt. Mit Hilfe der Differenz zwischen der Proteinkonzentration in der kontinuierlichen Phase vor und nach dem Emulgieren und der Gesamtoberfläche der Tropfen kann die Grenzflächenbelegungsdichte berechnet werden.

Eine andere Möglichkeit, wichtige Hinweise zum Emulgierverhalten von nieder- und makromolekularen Emulgatoren zu erhalten, besteht im Messen der Grenzflächenbesetzungskinetik (Adsorptionskinetik) sowie der Grenzflächenspannung im scheinbaren Gleichgewicht. Die Grenzflächenbesetzungskinetik beschreibt die Geschwindigkeit, mit der Emulgatoren an der Phasengrenzfläche adsorbieren. Sie wird über die Änderung der Grenzflächenspannung mit der Zeit (dynamische Grenzflächenspannung) gemessen. STANG (1998) gibt eine Übersicht über einige ausgewählte Methoden zum Messen dynamischer Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannungen. Unter anderen figuriert auch die Berstmembranmethode, die an der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft aufgebaut und seit 1997 angewendet wird (Tab.6).

Für die Beurteilung der Fähigkeit zur Emulsionsstabilisierung wurden verschiedenste Methoden entwickelt, von denen jedoch viele nicht standardisiert sind. Lagertests, in denen die Aufrahmstabilität untersucht wird, oder Viskositätsmessungen an wässrigen Proteinlösungen herrschen vor. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die von PEARCE und KINSELLA (1978) entwickelten Methoden zur Bestimmung der Emulgieraktivität (EA), Emulgierkapazität (EC) und Emulsionsstabilität (ES) anzuwenden.

**Tab. 6:** Übersicht über einige ausgewählte Methoden zum Messen dynamischer Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannungen (STANG, 1998).

| Messmethode                               | Geeignet für Messungen an Oberflächen? | Geeignet für Messungen an Flüssig-Flüssig-Grenzflächen? | Probleme   |
|---|--|---|--|
| oszillierender Strahl ('oscillating jet') | ja                                     | nein  | nicht kommerziell erhältlich, enger zeitlicher Messbereich                       |
| geneigte Platte ('inclined plate')        | ja                                     | nein  | nicht kommerziell erhältlich, enger zeitlicher Messbereich                       |
| hängender Tropfen ('pendent drop')        | ja                                     | ja  | nicht kommerziell erhältlich, enger zeitlicher Messbereich                       |
| wachsender Tropfen ('growing drop')       | ja                                     | ja  | nicht kommerziell erhältlich   |
| Tropfenvolumen                            | ja                                     | ja  | hydrodynamische Effekte  |
| maximaler Blasendruck                     | ja                                     | nein  | Interpretation der Messdaten: Bestimmung des tatsächlichen Alters der Oberfläche |
| Berstmembran                              | ja                                     | ja  | Durchmischung durch die Berstmembran   |

### 3.6. Einflussfaktoren auf die Emulgierereigenschaften von Milchproteinen

Im System Lebensmittel werden die Emulgierereigenschaften der Milchproteine in mannigfaltiger Weise beeinflusst. Von den vielen Möglichkeiten sind bis heute einige wenige in Modellsystemen untersucht worden. Im folgenden sind die wichtigsten, bisher untersuchten Einflussfaktoren auf die Emulgierereigenschaften der Milchproteine zusammengefasst.

#### 3.6.1. Einfluss des pH-Wertes im System

YAMAUCHI et al. (1980) untersuchten die Emulgierereigenschaften von Molkenproteinen und variierten dabei den pH-Wert, die Hitzebehandlung und die Zugabe weiterer Stoffe. Eine stabile Emulsion (20% Kokosöl) konnte mit einer Molkenproteinkonzentration von mehr als 2 Gew.% erreicht werden. Beim pH 5 stellten sie die geringste Aufrahmstabilität und die höchste Viskosität fest. Als Ursache für das starke Aufrahmen beim pH 5 wird die geringe elektrostatische Abstossung im IEP Bereich der Molkenproteine angegeben.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen SHIMIZU et al. (1985) sowie DAS und KINSELLA (1989). Sie untersuchten die Emulgierereigenschaften von  $\beta$ -Lactoglobulin in Abhängigkeit vom pH und der Proteinkonzentration. Obwohl die Grenzflächenbelegungsichte der mit  $\beta$ -Lactoglobulin stabilisierten Emulsion bei einem pH-Wert weit vom IEP am tiefsten ist, zeigten gerade diese Emulsionen die höchste Stabilität. Die Autoren leiteten aus diesen Ergebnissen ab, dass keine Korrelation zwischen der Dicke des Grenzflächenfilmes und der Emulsionsstabilität besteht. Die geringe Stabilität der Emulsion beim IEP ist darauf zurückzuführen, dass durch die Aufhebung der elektrostatischen Abstossung die  $\beta$ -Lactoglobulin Moleküle aggregieren und in dieser Form an der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser adsorbieren. Dies im Gegensatz zu pH-Bereichen über 7.5 und unter 3.0, in denen die elektrostatische Abstossung hoch ist und die einzelnen Proteine an der Grenzfläche adsorbieren, wo sie über intermolekulare Interaktionen einen viskoelastischen Film bilden, welcher die dispergierten Öltröpfchen stabilisiert.

TURGEON et al. (1996) untersuchte die Emulgierereigenschaften von hitzebehandeltem und enzymatisch hydrolysiertem Molkenproteinkonzentrat in einem Modellsystem, das den Bedingungen, wie sie in einer Salatsauce vorkommen, ähnlich war. Im Vergleich zum nativen Molkenproteinkonzentrat adsorbierte das unter sauren Bedingungen erhitzte (pH 2.5, 90°C, 10 Minuten) Konzentrat langsamer an der Luft-Wasser Grenzfläche. Zugleich wurde ein Zusammenhang zwischen der Adsorptionsrate an der Luft-Wasser Phasengrenze und der Emulgierkapazität (EC) festgestellt. Die Abnahme der Oberflächenadsorptionsrate wurde mit der, durch die hitzeinduzierte Auffaltung und Aggregation, reduzierten Diffusionsrate erklärt.

#### 3.6.2. Einfluss der Temperatur

Durch eine kontrollierte Hitzebehandlung, die jedoch nicht zur Hitzekoagulation führt, werden die Proteine teilweise entfaltet und die Hydrophobizität der Proteinoberfläche nimmt zu. So können auch die Emulgierereigenschaften verbessert werden. Dies trifft insbesondere für die Molkenproteine zu, deren Hitzedenaturierung ein mehrstufiger Prozess darstellt, der sich aus Auffaltungs- und Aggregationsreaktionen zusammensetzt.

Nach WALKENSTRÖM (1993) verlieren die Molkenproteine bei einer Erhitzung von über 65°C ihre sekundäre und tertiäre Struktur, apolare Seitenketten werden freigesetzt, Wasserstoff-

brücken und hydrophobe Bindungen gebrochen und die Aktivität der Sulfhydryl-Gruppen nimmt stark zu. Verschiedene Autoren (WALSTRA und JENNESS, 1984; WALKENSTRÖM,

1993) geben an, dass bei steigenden Temperaturen (78° - 85°C) eine Polymerisation von Molkenproteinen und Kaseinen stattfindet. Bei dieser Aggregation (= irreversible Denaturierung) spielen freie Sulfhydryl-Gruppen und Disulfid-Brücken in  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, BSA,  $\alpha_{s2}$ - und  $\kappa$ -Kaseinen die Hauptrolle. Die hitzeinduzierte Aggregation von Milchproteinen ist vom pH-Wert abhängig. Im basischen Bereich sind die S-haltigen Gruppen ionisiert und stark aktiviert, so dass ein Disulfid-Austausch zwischen verschiedenen Gruppen rasch stattfindet. Bei pH < 4 ist dieser Effekt aufgehoben und es kommt nur zur minimalen Aggregation zwischen den verschiedenen Milchproteinen.

GELIN et al. (1995) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf Protein-Lipid Interaktionen an der Öl-Wasser Grenzfläche. Beim Abkühlen war die Veränderung der Grenzflächenspannung  $\gamma$  zwischen Triolein und Milch unter Anwesenheit von Polysorbat 80 (Tween) nicht signifikant, währenddem sie in Gegenwart von Glycerol-Monostearat, insbesondere im Bereich zwischen 20° - 40°C, stark abnahm. Aufgrund der Untersuchung der Fettkristallisation zwischen 4 und 40°C konnte der Schluss gezogen werden, dass die Protein-Lipid Interaktionen nicht signifikant durch die Veränderung des physikalischen Zustandes der Fettmoleküle des emulgierten Triolein oder Butteröl, sondern im wesentlichen durch die Änderung des physikalischen Zustandes des an der Grenzfläche adsorbierten Monoglycerides beeinflusst werden. Gesättigte Monoglyceride besitzen unterhalb einer bestimmten Temperatur eine erhöhte Oberflächenaktivität.

MUSCHIOLIK et al (1997) untersuchten die Adsorptionskinetik zweier kommerziell erhältlicher Molkenproteinkonzentrate mit Hilfe der Berstmembranmethode. Das Molkenproteinkonzentrat mit dem höheren Anteil an freien SH-Gruppen (nativ) setzte die Grenzflächenspannung rascher herab als das Molkenproteinkonzentrat mit dem tieferen Anteil freier SH-Gruppen (stärker intermolekular vernetzt). Die höhere Grenzflächenaktivität des nativen Molkenproteinkonzentrates deckt sich mit den kleineren durchschnittlichen Tropfendurchmessern in einer Emulsion. Durch eine Hitzebehandlung (70°C, 10 Minuten) dagegen wurde die Grenzflächenaktivität beider Molkenproteinkonzentrate erhöht. Die Auffaltung der globulären Proteine ergab eine Emulsion mit kleineren durchschnittlichen Fettkugeldurchmessern.

DICKINSON und HONG (1994) zeigten, dass eine Hitzebehandlung (70°C) den Austausch von adsorbiertem  $\beta$ -Lactoglobulin durch Tween 20 erschwert.

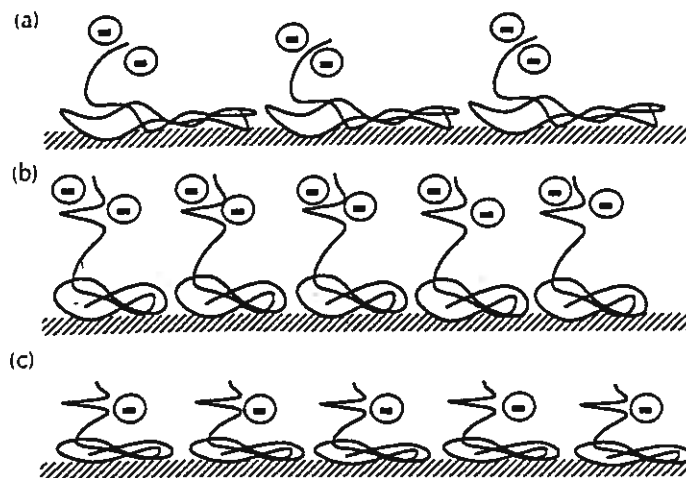
### 3.6.3. Einfluss der Ionenstärke

YAMAUCHI et al. (1980) stellten in ihren Untersuchungen, welche die Erforschung der Emulgierereigenschaften von Molkenproteinen zum Gegenstand hatten, fest, dass in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  die Emulsion nach einer Hitzebehandlung gelierte. Die Gelierung, die als Folge einer Polymerisationsreaktion betrachtet werden kann, erklärte er mit der Bildung von Disulfidbrücken zwischen Molkenproteinen, der Vernetzung des  $\alpha$ -Lactalbumin über Ca-Brücken oder einer Zunahme der Tropfenaggregation induziert durch die Abnahme der elektrostatischen Abstossung nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ .

CHEN und DICKINSON (1993) untersuchte den Einfluss der Ca-Ionen-Konzentration (0 - 14 mM) auf die mit  $\beta$ -Kasein stabilisierte Emulsion (20% Öl). Der durchschnittliche Tropfendurchmesser wurde mit zunehmender Konzentration an Ca-Ionen grösser. Das Vorhandensein von Ca-

Ionen führte zur Vernetzung einzelner mit  $\beta$ -Kasein stabilisierten Öltröpfen unter Bildung von Ca-Brücken und die dispergierte Phase flockte in der Folge aus.

Nach DALGLEISH (1997) destabilisieren Emulsionen durch Aufrahmung, Koaleszenz, Flokkenbildung und Aggregation. Dabei bewirkt die Änderung der Ionenstärke oder der Ionenbindung durch Zusätze oder technologische Massnahmen nicht nur eine Reduktion der Ladung, sondern auch eine Veränderung in der Konformation der adsorbierten Milchproteine. Die Zugabe von Ca-Ionen zu einer  $\beta$ -Kasein stabilisierten Öl-in-Wasser Emulsion reduziert die negative Ladung der Proteinmoleküle. Zudem wird das adsorbierte Molekül durch die Bindung von Ca-Ionen kompakter. Diese beiden Vorgänge führen zur Reduktion der elektrostatischen und sterischen Stabilisierung der Öltröpfen. Andererseits ist es vorstellbar, dass Ca-Ionen zur Vernetzung von dispergierten Öltröpfen führen (AGBOOLA und DALGLEISH, 1996b). Die Entfernung von Phosphoserinseitenketten mittels Proteolyse hatte zur Folge, dass der Grenzflächenfilm stabiler gegen Ca-Ionen wurde. Ähnlich verhält es sich mit  $\beta$ -Lactoglobulin stabilisierten Öltröpfen. Dies obwohl das native Protein unempfindlich gegen Ca-Ionen ist. DALGLEISH (1997) nimmt an, dass dieses Verhalten mit dem Effekt von Ca-Ionen auf hitze-induzierte Molkenproteingele zurückzuführen ist, obwohl die Denaturierung durch Adsorption nicht dasselbe ist wie die Hitzedenaturierung von Molkenproteinen.



**Abb. 4:** Verhalten von  $\beta$ -Kasein-Molekülen an der O/W-Phasengrenzfläche: (a) tiefe Konzentration an  $\beta$ -Kasein, (b) hohe Konzentration an  $\beta$ -Kasein, (c) Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Konformation von  $\beta$ -Kasein (DALGLEISH, 1997).

### 3.6.4. Interaktionen mit Lipiden, Polysacchariden und weiteren Komponenten

YAMAUCHI et al. (1980) untersuchte die Emulgierereigenschaften von Molkenproteinen und variierte dabei den pH-Wert, die Hitzebehandlung und die Zugabe weiterer Stoffe. Eine stabile Emulsion (20% Kokosöl) konnte mit einer Molkenproteinkonzentration von mehr als 2 Gew.-% erreicht werden. Die geringste Aufrahmstabilität wurde bei einem pH-Wert 5 festgestellt. Die Zugabe von Zucker, Monostearat und Lezithin bewirkten eine zusätzliche Abnahme der Aufrahmstabilität.

Die Resultate einer Studie von NAGASAWA et al. (1996) zeigten, dass die Konjugation von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Polysacchariden zu einer Verschiebung des IEP von  $\beta$ -Lactoglobulin in den

sauren Bereich ( $\text{pH} < 5$ ) bewirkt. Diese Verschiebung hat einen positiven Effekt auf die Emulgierereigenschaften von  $\beta$ -Lactoglobulin unter nicht optimalen Bedingungen wie sie bei der Herstellung von Lebensmitteln insbesondere von Mayonnaise und Salatsaucen vorkommen (saurer  $\text{pH}$ , hohe  $\text{NaCl}$ -Konzentration, Hitzebehandlung). Die Autoren stellten fest, dass  $\beta$ -Lactoglobulin durch die Verbindung mit Carboxymethyldextran hydrophiler, stärker negativ geladen und flexibler wird. Das an der Phasengrenze adsorbierte Konjugat ragt mit seinem verlängerten, hydrophilen Teil in die wässrige Phase. Durch die stark abstehenden Molekülregionen wird die sterische Stabilisierung der dispergierten Emulsionstropfen verstärkt und der Hydratmantel vergrößert. Die Belegungsdichte einer mit Magermilchpulver stabilisierten Speiseeisemulsion ist in Gegenwart von Saccharose erhöht. PELAN et al. (1997) erklären diesen Effekt mit einer Änderung der Lösungsmittleigenschaften des Wassers nach Zugabe von Saccharose. Die Folge davon ist eine veränderte Kaseinmizellengrößenverteilung.

Der Effekt von niedermolekularen Zuckern auf die Emulgierereigenschaften von globulären Proteinen (11S Globulin, Ovalbumin) hängt stark von der Konzentration der Zucker ab. Bei tiefen Konzentrationen (0.05 Gew.%) liegt der Filmdruck  $\pi$  wegen der direkten Interaktion zwischen Zucker und Protein tiefer als in der reinen Proteinlösung. ANTIPOVA et al. (1997) erklären dieses Verhalten mit der möglichen Erhöhung der Hydrophilie des Protein-Zucker-Komplexes. Bei Konzentrationen von 2 Gew.% konkurrenzieren die Zuckermoleküle das Protein in Bezug auf die Hydratisierung. Der Filmdruck dieser Lösung ist im Vergleich zur reinen Proteinlösung stark erhöht, was die Autoren mit einer Zunahme der Oberflächenaktivität des Proteins gleich setzen. Polysaccharide (hochmolekulare Verbindungen wie beispielsweise Amylose) reduzieren den Filmdruck einer Proteinlösung infolge von intermolekularen Interaktionen zwischen Proteinen und Polysacchariden.

DALGLEISH und HOLLOCOU (1997) untersuchten den Einfluss von Pektin und  $\kappa$ -Carrageenan auf Emulsionen, die entweder mit Na-Kaseinat oder mit einem Molkenproteinisolat stabilisiert waren. Beide Polysaccharide erhöhten die Emulsionsstabilität bei  $\text{pH}$ -Werten, wo normalerweise eine Präzipitation statt findet. Die Interaktionen zwischen negativ geladenen Gruppen des Pektins und positiv geladenen Seitenketten des Kaseins bei  $\text{pH}$  unter dem IEP sind für die Bindung von Kasein und Pektin verantwortlich. Allerdings muss aus noch nicht erklärba- ren Gründen das Kasein in aggregierter Form vorliegen. Die Interaktionsmechanismen bei höheren  $\text{pH}$ -Werten (über dem IEP) sind noch Gegenstand von Untersuchungen. Mit demselben Reaktionsmechanismus, aber weniger effizient, wird die stabilisierende Wirkung von Pektin auf Molkenproteinemulsionen erklärt. Die  $\text{pH}$  unabhängige Wechselwirkung zwischen  $\kappa$ -Kasein und  $\kappa$ -Carrageenan (aufgrund spezifischer Ladungen) erhöht die Stabilität von mit Kaseinat stabilisierten Emulsionen. Aufgrund der Untersuchungen nehmen die Autoren an, dass auch zwischen Molkenproteinen und Carrageenan eine Interaktion stattfindet, die einen stabilisierenden Effekt auf Molkeproteinemulsionen ausübt. Der detaillierte Mechanismus ist noch nicht abgeklärt. Die Stabilität der Emulsion scheint jedoch weniger stark beeinflusst zu sein.

### 3.6.5. Enzymatische Behandlung

TURGEON et al. (1991) verwendete verschiedene Trypsin- und Chymotrypsin-Hydrolysate eines Molkenproteinkonzentrates (35 Gew.% Protein), das vorgängig im sauren  $\text{pH}$ -Bereich auf  $90^\circ\text{C}$  erhitzt wurde, um Salatsaucen (62% Öl) zu stabilisieren. Die verschiedenen Peptidfraktionen wurden mittels zweistufiger UF erhalten. Durch die Erhitzung bei einem  $\text{pH}$  von 2.5 wurde eine Auffaltung der Molkenproteine mit minimaler Aggregation erzielt. Die enzymatische Hydrolyse ergab Peptide mit kleiner Molekülgröße und weniger sekundär Struktur (= ungeord-

meter). Dies führte zur Verbesserung der Löslichkeit, Wasseradsorption, Emulgierkapazität und Schaumbildungseigenschaften.

Auch CRUIJSEN (1996) bestätigt, dass mittels enzymatischer Hydrolyse die Emulgiereigenschaften der Milchproteine verbessert werden. Die kürzeren, aufgefalteten Ketten der mit Pepsin und Chymotrypsin behandelten Molkenproteine zeigten eine höhere Adsorptionsrate an der Öl-Wasser Phasengrenze, verminderten die durchschnittliche Fettkügelchengröße, die Aufrahmung und Koaleszenz. Die Spaltung der Peptidbindung in Proteinen führt zu niedermolekularen Bruchstücken mit freigelegten hydrophoben Regionen. Diese haben im Vergleich zum Ausgangsprodukt aufgrund ihrer tieferen Molekülmasse und demzufolge erhöhten Flexibilität bessere Emulgiereigenschaften.

AGBOOLA und DALGLEISH (1996a) untersuchten die Geschwindigkeit, mit der an der Phasengrenze adsorbierte Milchproteine hydrolysiert werden sowie die Stabilität von Öl-in-Wasser Emulsionen, die mittels Trypsin behandelte Milchproteine hergestellt wurden. Die Resultate zeigten, dass adsorbiertes  $\beta$ -Lactoglobulin bedeutend schneller hydrolysiert wird als in wässriger Lösung vorliegendes Protein. Bei Na-Caseinat konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Bereits anhand früherer Studien wurde vermutet, dass Molkenproteine bei der Adsorption eine Konformationsänderung eingehen. Hydrophile Seitenketten, die im nativen Zustand im globulären Molekül verborgen sind, werden der wässrigen Phase ausgesetzt und somit zugänglicher für enzymatische Reaktionen. Die Stabilität der mit hydrolysierten Milchproteinen hergestellten Emulsionen war im Vergleich zu Emulsionen, die mit unmodifizierten Milchproteinen hergestellt wurden, niedriger.



## Literaturverzeichnis

- AGBOOLA, S. O., DALGLEISH, D. G. (1996a): Enzymatic Hydrolysis of milk proteins used for emulsion formation. 1: Kinetics of protein breakdown and storage stability of the emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3631 - 3636.
- AGBOOLA, S. O., DALGLEISH, D. G. (1996b): Enzymatic Hydrolysis of milk proteins used for emulsion formation. 2. Effects of calcium, pH, and ethanol on the stability of the emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3637 - 3642.
- AMBARCI, A., ARMBRUSTER, H. (1987): Bestimmung der Grenzflächenbesetzungskinetik. *Tenside Surfactants Detergents* 24 (2): 111 - 115.
- ANTIPOVA, A.S., SEMENOVA, M.G., GAUTHIER-JACQUES, A.P. (1997): Effect of neutral carbohydrate structure on protein surface activity at air-water and oil-water interfaces, In *Food Colloids Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Dickinson E., Bergenstahl B. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 245 - 257.
- BARFOD, N.M., KROG, N., LARSEN, G., BUCHHEIM, W. (1991): Effects of emulsifiers on protein-fat interaction in ice cream mix during ageing I: Quantitative analysis. *Fat Sci. Technol.* 93 (1): 24 - 29.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. (1987): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 3. Auflage.
- BLECKER, Ch., CERNE, V., PAQUOT, M., LOGNAY, G., SENSIDONI, A. (1995): Modification of the Interfacial Properties of Whey by Enzymic Hydrolysis of the Residual Fat, In: *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson E. and Lorient D. (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- BUCHHEIM, W. (1992): Emulsions- und Schaumstrukturen in Eiskrem. *dmz* 23: 672 - 677.
- BÜLTERMANN, STANG, M. (1996), Messen der Grenzflächenspannung und der Grenzflächenbesetzungskinetik, Hochschulkurs Emulgiertechnik, Universität Karlsruhe.
- CAMPBELL, I., NORTON, I., MORLEY, W. (1996): Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions. *Neth. Milk Dairy J.* 50: 167 - 182.
- CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., LORIENT, D. (1992): *Lebensmittelproteine*, Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage.
- CHEN, J., DICKINSON, E. (1993): Time dependent competitive adsorption of milk proteins and surfactants in oil-in-water emulsions. *J. Sci. Food Agric.* 62: 283 - 289.

- CHEN, J., DICKINSON, E., IVESON, G. (1993): Interfacial interactions, competitive adsorption and emulsion stability. *Food Structure* 12: 135 - 146.
- COURTHAUDON, J.-L., DICKINSON, E., MATSUMURA, Y., WILLIAMS, A. (1991): Influence of emulsifier on the competitive adsorption of whey proteins in emulsions. *Food Structure* 10: 109 - 115.
- CRUIJSEN, H. (1996): Physical stability of caseinate stabilized emulsions during heating. Ph.D. thesis, Universität Wageningen.
- DALGLEISH, D. G., LEAVER, J. (1991): The possible conformation of milk proteins adsorbed on oil/water interfaces. *J. Colloid and Interface Science* 141 (1): 288 - 294.
- DALGLEISH, D. G. (1995): Structures and properties of adsorbed layers in emulsions containing milk proteins. In *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson, E., Lorient, D. (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- DALGLEISH, D. G. (1996): Conformation and structure of milk proteins adsorbed to oil-water interfaces. *Food Research International* 29 (5 - 6): 541 - 547.
- DALGLEISH, D. G. (1997): Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science and Technology* 8 (1): 1- 6.
- DALGLEISH, D.G., HOLLOCOU, A.-L. (1997): Stabilization of protein-based emulsions by means of interacting polysaccharides, In *Food Colloids Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Dickinson E., Bergenstahl B. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 236 - 244.
- DAMODARAN, S. (1996): Functional properties. In *Food proteins: Properties and Characterization*, Nakai, S., Modler, H.W. (Eds.), VCH Publishers Inc., New York, Weinheim, Cambridge, 167 - 234.
- DAS, K.P., KINSELLA, J.E. (1989): pH dependent emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dispersion Sci. and Technology* 10 (1): 77 - 102.
- DE FEIJTER, J.A., BENJAMINS, J. (1987): Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. In *Food Emulsions and Foams*, Dickinson, E. (Ed.), Royal Society of Chemistry, London, 72 - 85.
- DE WITT, J. N.(1990): Thermal Stability and Functionality of Whey Proteins. *J. Dairy Sci.* 73: 3602 - 3612.
- DICKINSON, E., WHYMAN, R.H. (1987): Colloidal properties of model oil-in-water food emulsions stabilized separately by  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. In *Food Emulsions and Foams*. Dickinson, E. (Ed.), Royal Society of Chemistry, London, 40 - 51.

- DICKINSON, E., MURRAY, A., MURRAY, B.S., STAINSBY, G. (1987): Properties of adsorbed layers in emulsions containing a mixture of caseinate and gelatin. In *Food Emulsions and Foams*. Dickinson, E. (Ed.), Royal Society of Chemistry, London, 86 - 99.
- DICKINSON, E., ROLFE, S. E., DALGLEISH, D.G. (1989): Competitive adsorption in oil-in-water emulsions containing  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 3 (3): 193 - 203.
- DICKINSON, E., Hong, S.-T. (1994): Surface coverage of  $\beta$ -lactoglobulin at the oil-water interface: Influence of protein heat treatment and various emulsifiers. *J. Agric. Food Chem.* 42 (8): 1602 - 1606.
- DICKINSON, E. (1994): Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering* 22: 59 - 74.
- DICKINSON, E., HONG, S.-T., YAMAMOTO, Y. (1996): Rheology of heat-set emulsion gels containing  $\beta$ -lactoglobulin and small-molecule surfactant. *Neth. Milk Dairy J.* 50: 199 - 207.
- DUKHIN, S.S., KRETZSCHMAR, G., MILLER, R. (1995): Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces. In: *Studies in Interface Science*, Mobius, D., Miller, R. (Eds.), Vol. 1, Elsevier Science, Amsterdam.
- FANG, Y., DALGLEISH, D.G. (1996): Competitive adsorption between dioleoyl-phosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces. *J. Agric. Food Chem.* 44: 59 - 64.
- GAONKAR, A. G. (1989): Interfacial tensions of vegetable oil/water systems: effect of oil purification. *JAACS* 66 (8): 1090 - 1092.
- GELIN, J.-L., TAINURIER, P., POYEN, L., COURTHAUDON, J.-L., LE MESTE, M., LORIENT, D. (1995): In: *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson E. and D. Lorient (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- GELIN, J.-L., POYEN, L., RIZZOTTI, R., DACREMONT, C., LE MESTE, M., LORIENT, D. (1996): Interactions between food components in ice cream II: Structure-texture relationships. *J. Texture Studies* 27: 199 - 215.
- GOFF, H.D., JORDAN, W.K. (1989): Action of emulsifier in promoting fat destabilization during the manufacturing of ice cream. *J. Dairy Sci.* 72: 18 - 29.
- GOFF, H.D., KINSELLA, J.E., JORDAN, W.K. (1989): Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. *J. Dairy Sci.* 72: 385 - 397.

- GOFF, H.D., FRESLON, B., SAHAGIAN, M.E., HAUBER, T.D., STONE, A.P., STANLEY, D.W. (1995): Structural development in ice cream - dynamic rheological measurements. *J. Texture Studies*, 26: 517 - 536.
- GRAHAM, D.E., PHILLIPS, M.C. (1979a): Proteins at Liquid Interfaces. I. Kinetics of Adsorption and Surface Denaturation. *J. Colloid Interface Sci.*, 79 (3), 403 - 414.
- GRAHAM, D.E., PHILLIPS, M.C. (1979b): Proteins at Liquid Interfaces. II. Adsorption Isotherms, *J. Colloid Interface Sci.*, 79 (3), 415 - 426.
- GRAHAM, D.E., PHILLIPS, M.C. (1979c): Proteins at Liquid Interfaces. III. Molecular Structure of Adsorbed Films, *J. Colloid Interface Sci.*, 79 (3), 427 - 439.
- HOLLEY, W. (1984): Untersuchungen zum kontinuierlichen Emulgierprozess in laminarer Schlepplströmung unter Berücksichtigung der Emulgator-Adsorptionskinetik, Dissertation, Universität Karlsruhe.
- HOLT, C., HORNE, D. S. (1996): The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 50: 85 - 111.
- HUNT, J. A., DALGLEISH, D. G. (1994): Adsorption behaviour of whey protein isolate and caseinate in soya oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 8 (2): 175 - 187.
- KATO, A., NAKAI, S. (1980): Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624:13 - 20.
- KATO, A., OSAKO, Y., MATSUDOMI, N., KOBAYASHI, K. (1983): Changes in the Emulsifying and Foaming Properties of Proteins during Heat Denaturation. *Agric. Biol. Chem.* 47 (1): 33 - 37.
- KARBSTEIN, H. (1994): Untersuchungen zum Herstellen und Stabilisieren von Öl-in-Wasser-Emulsionen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- KARBSTEIN, H., SCHUBERT, H. (1995a): Einflussparameter auf die Auswahl einer Maschine zum Erzeugen feindisperser O/W-Emulsionen. *Chem.-Ing.-Tech.* 67 (5): 616 - 619.
- KARBSTEIN, H., SCHUBERT, H. (1995b): Developments in the continuous mechanical production of oil in water macro-emulsions. *Chem. Eng. Proc.* 34: 205 - 211.
- KINSELLA, J. E. (1976): Functional properties of proteins in foods: a survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7: 219 - 280.
- KINSELLA, J. E., DAMODARAN, S. (1981): Nutritional, chemical and physical criteria affecting the use and acceptability of proteins in foods. In *Criteria of Food Acceptance*, Solms, J., Hall, R. L. (Eds.), Forster Publishing, Zürich: 296 - 332.

- KINSELLA, J.E. (1982): Relationship between Structure and Functional Properties of Food Proteins, In *Food Proteins*, Fox, P.F. und Condon, J.J. (Eds.), Applied Science Publishers, New York: 51 - 103.
- KINSELLA, J.E., FOX, P.F. (1986): Water sorption by proteins: Milk and whey proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24: 91 - 139.
- KLOSTERMEYER, H., BUCHBERGER, J. (1992): Struktur und Eigenschaften von Milchproteinen. *Deutsche Molkereizeitung* 13: 346 - 350.
- KOKUBO, S. (1994): Physicochemical properties of ice cream. *European Dairy Magazine* 6 (1): 16 - 20.
- KOKUBO, S., SAKURAI, K., HAKAMATA, K., TOMITA, M., YOSHIDA, S. (1996): The effect of manufacturing conditions on the de-emulsification of fat globules in ice cream. *Milchwissenschaft* 51 (5): 262 - 265.
- KROG, N. (1991): Thermodynamics of interfacial films in food emulsions. In: *Microemulsions and emulsions in food*, American chemical society, 138 - 145.
- LUDESCHER, R. D. (1996): Physical and chemical properties of amino acids and proteins. In *Food proteins: Properties and Characterization*, Nakai, S., Modler, H.W. (Eds.), 23 - 70. VCH Publishers Inc., New York, Weinheim, Cambridge.
- MACRITCHIE, F., ALEXANDER, A.E. (1963a): Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces: I. The Role of Bulk Diffusion in Adsorption. *J. Colloid Sci.* 18, - 457.
- MACRITCHIE, F., ALEXANDER, A.E. (1963b): Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces: II. The Role of Pressure Barriers in Adsorption. *J. Colloid Sci.* 18, 458 - 463.
- MACRITCHIE, F., ALEXANDER, A.E. (1963c): Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces: III. The Role of Electrical Barriers in Adsorption. *J. Colloid Sci.* 18, 464 -
- MACRITCHIE, F. (1978): Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*: 283 - 326.
- MARSHALL, R. T., ARBUCKLE, W.S. (1996): *Ice Cream*, Chapman and Hall Verlag, New York, 5. Auflage.
- MITCHELL, J., IRONS, L., PALMER, G.J. (1970): A Study of Spread and Adsorbed Films of Milk Proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 200: 138 - 150.
- MONAHAN, F. J., MC CLEMENTS, D. J., KINSELLA, J. E. (1993): Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1826 - 1829.

- MULVIHILL, D. M., FOX, P. F. (1987): Assessment of the functional properties of milk protein product. International Dairy Federation, Brussels, Bulletin N° 209: 3 - 12.
- MUSCHIOLIK, G., DRÄGER, S., SCHERZE, I., RAWEL, H.M., STANG, M. (1997): Protein-stabilized emulsions prepared by the micro-porous glass method, In *Food Colloids Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Dickinson E., Bergenstahl B. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 393 - 400.
- NAGASAWA, K., OHGATA, K., TAKAHASHI, K., HATTORI, M. (1996): Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of  $\gamma$ -lactoglobulin- carboxymethyl-dextran conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2538 - 2543.
- PEARCE, K. N., KINSELLA J. E. (1978): Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716 - 723.
- PELAN, B. M., WATTS, K. M., CAMPBELL, I. J., LIPS, A. (1997): On the stability of aerated milk protein emulsions in the presence of small- molecule surfactants, In *Food Colloids Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Dickinson E., Bergenstahl B. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 367 - 381.
- PHILLIPS, M. C. (1981): Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Techn.* 50: 50 - 57.
- PHIPPS, L.W., TEMPLE, D. M. (1982): Surface properties of milk fat globules: interfacial tension studies. *J. Dairy Sci.* 49: 61 - 72.
- PLOCK, J. (1994): Zum Einfluss von Lactose auf die Denaturierung von Molkenproteinen in Molkenkonzentrat und auf die Ausbildung thermisch induzierter Gelstrukturen. Fortschrittsberichte VDI, Reihe 14: Landtechnik/Lebensmitteltechnik Nr. 69, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf.
- SCHUBERT, H. (1996), Physikalische-chemische Grundlagen der Stabilität von O/W-Emulsionen. Hochschulkurs Emulgiertechnik, Universität Karlsruhe.
- SHIMIZU, M., SAITO, M., YAMAUCHI, K. (1985): Emulsifying and structural properties of  $\beta$ -Lactoglobulin at different pHs. *Agric. Biol. Chem.* 49 (1): 189 - 194.
- SHIMIZU, M., SAITO, M., YAMAUCHI, K. (1986): Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins. *Agric. Biol. Chem.* 50 (3): 791 - 792.
- STANG, M., KARBSTEIN, H., SCHUBERT, H. (1994): Adsorption kinetics of emulsifiers at oil-water interfaces and their effect on mechanical emulsification. *Chem.-Ing.-Proc.* 33: 307 - 311.
- STANG, M. (1998): Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren. Fortschrittsberichte VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr. 527, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf.

- TORNBERG, E. (1978): The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique. *J. Sci. Food Agric.* 29: 762 - 776.
- TORNBERG, E., GRANFELDT, Y., HAKANSSON, CH. (1982): A comparison of the interfacial behaviour of three food proteins adsorbed at air-water and oil-water interfaces. *J. Sc. Food Agric.* 33: 904 - 917.
- TURGEON, S. L., SANCHEZ, CH., GAUTHIER, S. F., PAQUIN, P. (1996): Stability and rheological properties of salad dressing containing peptidic fractions of whey proteins. *Int. Dairy Journal* 6: 645 - 658.
- WESTPHAL, G., BUHR, H., OTTO, H. (1996): *Reaktionskinetik in Lebensmitteln*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- WALKENSTRÖM, P. (1993): Functional properties of whey proteins, Ph.D. thesis
- WALSTRA, P., JENNESS, R. (1984): *Dairy Chemistry and Physics*. Wiley & Sons, New York.
- WALSTRA, P. (1987): Overview of emulsion and foam stability. In *Food Emulsions and Foams*, Dickinson E. (Ed.), The Royal Society of Chemistry, London: 242 - 257.
- WALSTRA, P., DE ROOS, A.L. (1993): Proteins at Air-Water and Oil-Water Interfaces: Static and Dynamic Aspects. *Food Reviews International* 9 (4): 503 - 525.
- WALSTRA, P., SMULDERS, I. (1997): Making emulsions and foams: an overview. In *Food Colloids Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Dickinson E., Bergenstahl B. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 367 - 381.
- YAMAUCHI, K., SHIMIZU, M., KAMIYA, T. (1980): Emulsifying Properties of Whey Protein. *J. Food Sci.* 45: 1237 - 1242.