

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt
**„Getriggerte Gelbildung von Proteinen – vom 3D-Druck
zur verfahrenstechnischen Anwendung“ (3522)**

gefördert durch die Max-Buchner-Forschungstiftung der DECHEMA

*Stefan Nöbel, Zeynep Atamer & Jörg Hinrichs
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,
FG Milchwissenschaft und -technologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland*

Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Die Stereolithografie ermöglichte erstmals den gezielten, punktwisen Aufbau eines Werkstücks aus seinem flüssigen oder pulverförmigen Rohstoff durch eine lasergetriggerte Phasenwandlung, wie z. B. Polymerisation oder Aufschmelzen. Aus der Idee des stückweisen Herstellens entwickelten sich neue Drucktechniken und angepasste Materialien. Das dreidimensionale Drucken wird bereits erfolgreich in diversen Branchen zur Herstellung von individuellen Werkstücken oder Kleinserien genutzt, z. B. der Human- und Zahnmedizin, Modellbau, Architektur und Maschinenbau [2]. Aber auch in der Lebensmittelverarbeitung finden sich dreidimensionale Verarbeitungsprozesse. Hauptsächlich werden mittels 3D-Druck individuelle Verzierungen und Dekorationen auf Torten oder Eiscreme aufgebracht. Daneben eignet sich das Drucken für Teige und Teigwaren, wobei nach dem Backen oder Trocknen meist flächige, zweidimensionale Produkte entstehen [4]. Für viele Lebensmittel konnte das dreidimensionale Drucken noch nicht umgesetzt werden, da es sich um wasserhaltige Mehrphasensystem mit einer komplexen Strukturbildung handelt.

Allen eingesetzten Techniken ist gemein, dass eine zeitlich und räumlich angegrenzte Phasenwandlung genutzt wird, um den Werkstoff schichtförmig miteinander zu verbinden. Insbesondere das Schmelzen eines festen Werkstoffs, z. B. Kunststoffstrang (Filament) oder Schokoladenmasse, und das anschließende Gießen oder Sprühen der Schmelze wird häufig eingesetzt. Dabei werden, wie im Fall der Schokolade, bekannte Strukturierungsverfahren genutzt. Diese wurden durch die geeignete Zuführung des Rohstoffs und an das kurzzeitige Erwärmen angepasst. Am Beispiel des Milchproteins Casein soll die neue Möglichkeiten zur gezielten lokalen Strukturierung aufgezeigt werden. Um das kurzzeitige Erwärmen für Caseingele zu nutzen, müssen dazu die Stoffdaten für diverse Temperatur-Zeit-Kombinationen erhoben und auf den punktförmigen Energieeintrag abgestimmt werden. Potenziell eignen sich auch andere proteinbasierte Strukturen, z. B. aus Algen- oder Insektenproteinen, um diese als Rohstoffquelle zu erschließen. Im Vergleich zur Extrusion, wo der gesamte Rohstoff stark erwärmt wird, kann mit der lokal getriggerte Gelbildung eine höhere Wasserbildung erreicht werden.

Alternativer Ansätze für die gezielte Strukturierung von Milchgelen sind die (lokale) enzymatische Vernetzung und die Extrusion. Das Vernetzung mittels Transglutaminase konnte erfolgreich in Milchprodukten eingesetzt werden [1]. Für die lokale Anwendung müsste ebenfalls die getriggerte Initiation der Vernetzungsreaktion und vor allem die anschließende Inaktivierung untersucht werden [5]. Extrudieren erlaubt diverse zweidimensionale Formen

mittels einer geeigneten Düse. Die dritte Dimension entsteht durch das schichtweise Schneiden des Strangs. Diese Technik wäre prinzipiell auch zum dreidimensionalen Formen von Milchgelelen geeignet. Jedoch ist hier die Gelbildung schon vorab abgeschlossen, sodass keine neuen Bindungen zwischen den aufgetragenen Schichten entstehen.

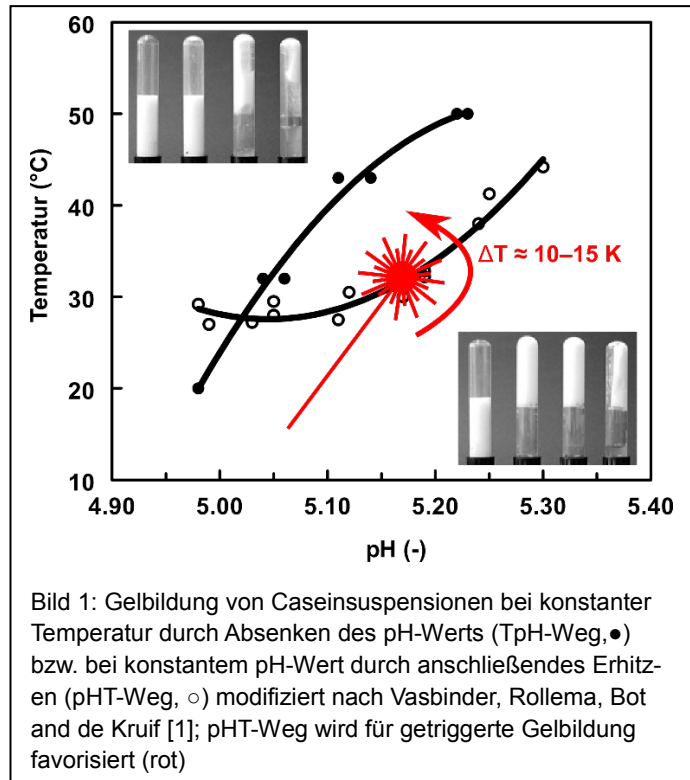
Forschungsziele

Die Gelbildungsmechanismen in proteinbasierten Lebensmittelsystemen werden für die Nutzung zum freien Formen neuartig strukturierter Lebensmittel in nur einem Prozessschritt angepasst. Dazu sollen die bekannten Mechanismen hinsichtlich ihrer Eignung zur getriggerten, d. h. zeitlich und räumlich begrenzten Gelbildung, untersucht und im Rahmen kleiner Produktionsproben eingesetzt werden.

In der Milchverarbeitenden Unternehmen werden die beiden Mechanismen Labgelbildung und Säuregelbildung zur Herstellung von strukturierten Produkten genutzt [6]. Dabei kommt es zur Phasenumwandlung von flüssiger Milch zu halbfesten oder festen Gelen, z. B. Joghurt, Frischkäse und Käse. Beide Mechanismen gehen auf das Destabilisieren und Vernetzen der Caseinmicellen in der Milch zurück (Bild 1). Die Phasenumwandlung geschieht bisher im großvolumigen Maßstab, wobei ein homogener Gelblock entsteht, der anschließend in gewünschte Produktform gebracht wird.

Vorgehen

Während einer Screening-Phase (Arbeitspaket AP 1) wurden zunächst verschiedene Kombinationen aus Proteingehalt (w) und pH-Werten von Milchkonzentraten untersucht. Zusätzlich wurden die Konzentrate bezüglich ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften analysiert, als Basis für die spätere Auslegung eines 3D-Druckers. Die mittels Mikrofiltration gewonnenen Konzentrate wurden durch das Verhältnis aus Permeat ($w = 0,7\%$) und Retentat ($w = 13,6\%$) auf Proteingehalte von $w = 8,0\%$, $10,0\%$ und $12,0\%$ standardisiert, und bei $2\text{ }^\circ\text{C}$ auf pH-Werte von 4,8 bis 5,4 gesäuert. Durch Anwenden eines für jede Protein/pH-Kombination angepassten Temperaturprofils wurde die Gelbildung induziert (Bild 1). Hierzu wurde zunächst aus einem mit einem Rheometer verbundenen Peltierelement ein Versuchsaufbau zur Herstellung und Charakterisierung dünnschichtiger Milchgele entwickelt (ca. 2,6 mm Schichtdicke). In AP 2 wurde anschließend ein kommerzieller 3D-Drucker um eine temperierbare Substratzuführung und Düse ergänzt (AP 2a), damit verschieden gestufte Temperaturprofile vorgegeben werden können. Für den Energieeintrag zur Phasenumwandlung Sol-Gel wurde weiterhin ein CO_2 -Laser eingesetzt (AP 2b).





Ergebnisse

(AP 1) Identifizieren geeigneter Bildungsmechanismen und -bedingungen

Verschiedene Kombinationen von Proteingehalt und pH-Wert wurden untersucht und die Gele in vier verschiedene Gruppen, bezogen auf das Verhalten des Konzentrats vor und nach dem Induzieren der Gelbildung, eingeteilt. Zusätzlich wurden die verschiedenen Proben im Rahmen dieses Vorsortierens innerhalb der Gruppen in stabile und molkenlässige Proben unterteilt (Bild 2). Basierend auf den Ergebnissen dieses Screenings wurde je eine positiv ($w = 10\%$ / $\text{pH} = 4,8$), neutral ($w = 12\%$ / $\text{pH} = 5,0$) und negativ ($w = 8\%$ / $\text{pH} = 5,0$) bewertete Probe zur weiteren Untersuchung ausgewählt, um die Auswirkungen des Temperaturprofils während der Gelbildung auf die Eigenschaften der Gele zu untersuchen. Negative Geleigenschaften, wie erhöhte Molkenlässigkeit, konnten durch individuelle Anpassung der Temperaturführung während des Prozesses verbessert werden. In dieser Phase wurde zusätzlich durch Ermitteln der Fließgrenzen (190 – 802 Pa) festgestellt, dass sich die untersuchten Gele zwischen Werten von Quark (~100 Pa) und Mozzarella (~1000 Pa) einordnen.

(AP 2a) Anwendung der Gelbildung im dreidimensionalen Druck – Temperierte Düse

Die während des Screenings positiv bewertete Kombination ($w = 10\%$ / $\text{pH} = 4,8$) konnte auf dem 3D-Drucker zu einem homogenen Milchgel verarbeitet werden. Die Austrittstemperatur an der Düse wurde an die mittels Rheometer ermittelte Gelbildungstemperatur angepasst. Die Vorlauftemperatur musste ca. 5 K unterhalb gewählt werden, um eine frühzeitige Gelbildung während der Zufuhr zu vermeiden. Damit konnte erreicht werden, dass die Gelbildung genau am Austritt der Düse stattfindet. Die Festigkeit, Fließgrenze und Molkenlässigkeit der fertigen, dünnen Prüfkörper (ca. 2,5 mm Schichtdicke) wurde, analog AP 1, direkt nach dem Druck und zusätzlich nach 4 Tagen Lagerung ermittelt. Die Fließgrenze des direkt gedruckten Gels war mit 82 Pa niedriger als die in Ruhe ausgebildeten Gele (220 Pa), mit der kürzesten untersuchten Haltezeit. Haptisch waren die so gedruckten Gele vergleichbar zu Frischkäsezubereitungen oder Magerquark. Proben mit einem Proteingehalt von 8% waren druckbar, jedoch mechanisch instabil, sodass keine anschließende Messung der Geleigenschaften erfolgen konnte.

(AP 2b) Anwendung der Gelbildung im dreidimensionalen Druck – CO₂-Laser

Die sowohl während des Screenings (AP 1) als auch beim 3D-Druck (AP 2b) optimale Probe mit einem Proteingehalt von $w = 10\%$ und $\text{pH} = 4,8$ wurde beispielhaft für die Gelbildung mittels Laser genutzt. Die in Bild 3 gezeigten Felder mit sichtbarer Gelbildung wurden durch unterschiedliche Leistungsdichten des CO₂-Lasers erreicht, um die Gelbildung mit Temperatursprüngen von 5 bis 32 K, bei

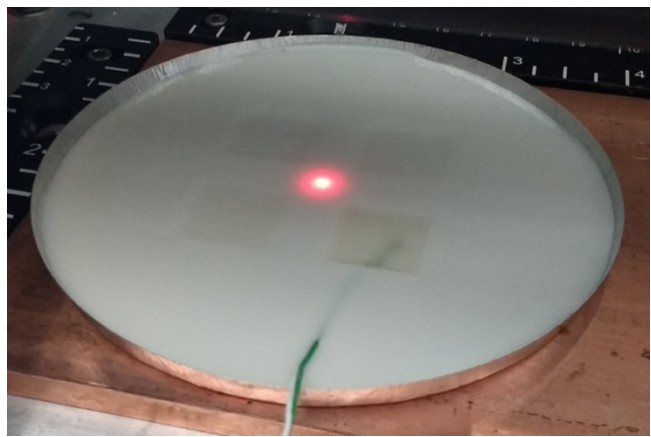


Bild 3: Mittels CO₂-Laser getriggerte Gelbildung in Abhängigkeit der lokalen Leistungsdichte (10 – 100%); Lokaler Temperatursprung bei Maximalleistung: ca. 32 K

gleichzeitiger Rückkühlung des Drucktischs, zu triggern. Damit wurde die Energie zur Gelbildung nur kurzzeitig und sehr lokal eingebracht. Gele mit einem Temperatursprung von ca. 15 K waren in ihrer Festigkeit und Molkenlässigkeit vergleichbar zu den in AP 1 identifizierten und mit einem ähnlichen Temperaturprofil gebildeten Gelen.

Zusammenfassung

Für die untersuchten Protein-/pH-Wert-Kombinationen konnte ein schneller, lokaler und irreversibler Phasenübergang von Sol zu Gel für gesäuerte Milchkonzentrate umgesetzt und stabile Gele hergestellt werden. Grundsätzlich geeignete Stoffsysteme konnten sowohl auf einem angepasstem 3D-Drucker mit Düse als auch durch den Energieeintrag mit einem CO₂-Laser gedruckt werden. Künftige Herausforderungen auf dem Weg zur Anwendung im 3D-Druck sind die Verbindung räumlich und zeitlich getrennter Gelstränge zur Herstellung dreidimensionaler Objekte. In die Konstruktion einer für den dreidimensionalen Druck von Milchgele ausgelegten Maschine sollte die hygienegerechte Auslegung und die hohen Anforderungen an die Temperaturführung eingehen.

Literatur

- [1] A.J. Vasbinder, H.S. Rollema, A. Bot, C.G. de Kruif, Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles, *Journal of Dairy Science*, 86 (2003) 1556-1563.
- [2] K.V. Wong, A. Hernandez, A Review of Additive Manufacturing, *ISRN Mechanical Engineering*, 2012 (2012) 208760.
- [3] A. Rolle, A. Pereszlenyi, R. Koch, B. Bis, B. Baier, Laser resection technique and results of multiple lung metastasectomies using a new 1,318 nm Nd:YAG laser system, *Lasers in Surgery and Medicine*, 38 (2006) 26-32.
- [4] T.F. Wegrzyn, M. Golding, R.H. Archer, Food Layered Manufacture: A new process for constructing solid foods, *Trends in Food Science & Technology*, 27 (2012) 66-72.
- [5] J.I.A. Lipton, D.; Nigl, F.; Lopez, N.; Cohen, D.L.; Noren, N.; Lipson, H., Multi-Material Food Printing with Complex Internal Structure Suitable for Conventional Post-Processing, 21st Solid Freeform Fabrication Symposium, Austin, 2010.
- [6] R. Mezzenga, P. Fischer, The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions, *Reports on Progress in Physics*, 76 (2013) 046601-046601-046601-046643.