
Unterschrift des Betreuers



DIPLOMARBEIT

Elektronenmikroskopie, konfokale Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie für die Untersuchung der Struktur von Lebensmitteln

Ausgeführt am Institut für
Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften
der Technischen Universität Wien

Unter der Anleitung von Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Ingrid Steiner

durch
Jennifer Maria Wallner
Sachsenplatz 14/13, A – 1200 Wien
Matrikelnummer: 0402275

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Sensorik und Textur	1
1.2	Geschichte der Elektronenmikroskopie, konfokalen Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie bei Lebensmitteln	2
1.3	Grundlagen der Elektronenmikroskopie, der konfokalen Mikroskopie und der Rasterkraftmikroskopie	4
1.3.1	Elektronenmikroskopie.....	4
1.3.1.1	Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	4
1.3.1.2	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	4
1.3.2	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM).....	5
1.3.3	Rasterkraftmikroskopie (RKM).....	5
1.4	Zusammensetzung und wichtige Strukturelemente der untersuchten Lebensmitteln.....	6
2	Aufgabenstellung.....	21
3	Methodische Vorgehensweise.....	22
3.1	Präparation für TEM.....	22
3.2	Präparation für REM.....	31
3.3	Präparation für CLSM.....	38
3.4	Präparation für RKM.....	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Methodische Vorgehensweise bei Lebensmitteln: Vergleich von unterschiedlichen Techniken.....	40
4.1.1	Auflösungsvermögen	40
4.1.2	Probengröße und -dicke.....	42
4.1.3	REM vs. RKM.....	43
4.1.4	TEM vs. REM.....	45
4.2	Einsatzbereiche der Methoden im Nahrungsmittelsektor	46
4.2.1	Immunchemische Methoden	46
4.2.2	Fraktale Analyse	47
4.2.3	Gefrieren von Lebensmitteln	48
4.2.4	Untersuchung von Lebensmittelgruppen.....	49
4.2.5	Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	76
4.2.6	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	81
4.2.7	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM).....	85
4.2.8	Rasterkraftmikroskopie (RKM).....	88
4.3	Überblick über spezielle Lebensmittelgruppen und dazugehörigen Technik und Diskussion.....	88
4.3.1	Allgemein	88
4.3.2	Elektronenmikroskopie (TEM, REM).....	98
4.3.3	CLSM	99
4.3.4	RKM	99
5	Zusammenfassung.....	101
6	Summary	102
7	Literatur	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema eines Rasterkraftmikroskops	5
Abbildung 2: Strukturelemente in Eiscreme	10
Abbildung 3: Strukturelemente in Butter	13
Abbildung 4: Strukturelemente von Fleisch	16
Abbildung 5: Verschiedene Geltypen	18
Abbildung 6: Verschiedene Methoden der Präparation bei der TEM	22
Abbildung 7: Arten der Fixierung bei der TEM	23
Abbildung 8: Kryofixierung	26
Abbildung 9: Verschiedene Methoden der Präparation bei der REM	31
Abbildung 10: Mausmuskel: (A) REM - Bild, (B) TEM - Bild; T=T-Tubuli	45
Abbildung 11: Immunchemische Methoden	47
Abbildung 12: Erdbeeren / REM: (A) schnelles Gefrieren, (B) langsames Gefrieren	48
Abbildung 13: Caseinmizellen von Magermilch / RKM	50
Abbildung 14: Joghurt / CLSM	52
Abbildung 15: Zwei Joghurtsorten / CLSM	53
Abbildung 16: Käse / TEM: gefroren, mit Platin und Kohlenstoff behandelt.	54
Abbildung 17: Gouda: Bruch - Ausbreitung nach Einschnitt / CLSM.	55
Abbildung 18: Hüttenkäse / REM: durch drei verschiedenen Techniken untersucht ...	56
Abbildung 19: Eiscreme / REM (Kryopräparation)	57
Abbildung 20: Käse: Proteine und Fett / CLSM	58
Abbildung 21: Gel (durch Chymosin) aus Magermilch / CSLM	58
Abbildung 22: Geronnenes Gel mit Fettkügelchen (F) / REM	59
Abbildung 23: Topfen / Elektronenmikroskopie	59
Abbildung 24: Molkenproteinfilm / RKM	59
Abbildung 25: Verteilung von Kalzium in einer Caseinmizelle in Milch / EELS	60
Abbildung 26: Stärkekörner / REM	61
Abbildung 27: Stärkekorn / RKM	62
Abbildung 28: Brot / REM (Lufttrocknung)	63
Abbildung 29: Brot / REM (CP-Trocknung)	64
Abbildung 30: Brot / REM (Gefriertrocknung)	64
Abbildung 31: Salatdressing / CLSM (Negativ-Kontrast)	65
Abbildung 32: Mayonnaise / REM	66
Abbildung 33: Salatdressing / REM	67
Abbildung 34: Mayonnaise / TEM	67
Abbildung 35: Fleisch / TEM	68
Abbildung 36: Fleisch / REM	68
Abbildung 37: Verkapselung	70
Abbildung 38: Verkapselung	71
Abbildung 39: Die sechs Kristallformen von Kakaobutter / REM (Gefrierbruchtechnik)	72
Abbildung 40: Schokoladenfehler: Ausbildung von Kristallnadeln	72
Abbildung 41: Schokoladenfehler an der Oberfläche einer dunklen Schokolade / REM	73
Abbildung 42: Schokolade: Kakao, Zucker, Milchproteine / CLSM (Negativ-Kontrast)	73
Abbildung 43: Xanthan-Moleküle (links), Pektin-Moleküle (rechts) / RKM	74
Abbildung 44: Schaum / CSLM	75
Abbildung 45: Wassertröpfchen in Margarine / TEM (Ultradünnschichtmethode) ...	77

Abbildung 46: Öltröpfchen in homogenisierter Milch / TEM (Ultradünnschichtmethode).....	77
Abbildung 47: Luftzelle in Eiscreme / TEM (Ultradünnschichtmethode).....	78
Abbildung 48: Polysaccharidfaser in Kurdlan-Gel / TEM (Negative Straining).....	78
Abbildung 49: Starke Interaktion zwischen β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen / TEM (Negative Straining)	79
Abbildung 50: TEM / Negative Straining: Schwache Interaktion zwischen β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen	79
Abbildung 51: Wassertröpfchen in Margarine / TEM (Oberflächenabdruck).....	80
Abbildung 52: Luftzellen in Eiscreme / TEM (Kryotechnik)	80
Abbildung 53: Verteilung von Fett und Protein in einem Low-fat-Käse / TEM (Kryotechnik)	81
Abbildung 54: (a) Brot, (b) Butter, (c) Eiscreme, (d) Schokolade / REM (Kryotechnik)	82
Abbildung 55: Mehlpartikel / REM (Lufttrocknen)	83
Abbildung 56: Joghurt / REM (Gefriertrocknung).....	84
Abbildung 57: Stärkekörner (A) nicht beschädigt, (B) beschädigt durch den Elektronenstrahl.....	85
Abbildung 58: Verlauf der Lichtstrahlen auf Grund des sich ändernden Brechungsindex.....	86
Abbildung 59: Mayonnaise (70% Fett) / CLSM.....	86
Abbildung 60: Emulsion (55% Öl) / CLSM.....	87
Abbildung 61: Fett / CLSM (Negativ-Kontrast).....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kuhmilch.....	6
Tabelle 2: Zusammensetzung der Kartoffel.....	12
Tabelle 3: Zusammensetzung von Butter.....	14
Tabelle 4: Zusammensetzung von Fleisch.....	15
Tabelle 5: Zusammensetzung von Schokolade.....	18
Tabelle 6: Auflösungsvermögen von verschiedenen Techniken.....	41
Tabelle 7: Probengröße bzw -dicke bei verschiedenen Methoden.....	42
Tabelle 8: Unterschiede zwischen REM und RKM.....	44
Tabelle 9: Elektronenmikroskopische Techniken bei der Analyse von Milch und Milchprodukten.....	49
Tabelle 10: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik - Milch und Milchprodukte.....	91
Tabelle 11: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik - Stärkehaltige Lebensmittel.....	94
Tabelle 12: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Fetthaltige und eiweißhaltige Lebensmittel.....	95
Tabelle 13: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Viskose Lebensmittel, Schokolade, Polysaccharide und Gele, Proteine und Polysaccharide, Gemüse, Schäume.....	96
Tabelle 14: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Überblick.....	98

1 Einleitung

1.1 Sensorik und Textur

Lebensmittel weisen gegenüber der Mehrheit anderer Stoffe die Besonderheit auf, dass sie ihrer Bestimmung nach für den menschlichen Verzehr als flüssige, pastöse oder feste Stoffe produziert und als Nahrung verzehrt werden.

Wenn man bedenkt, dass Lebensmitteln aus den gleichen Rohstoffen bestehen, ist es faszinierend, dass sie je nach Bestandteile und Bearbeitungsprozesse unterschiedliche Strukturen und Texturen aufweisen.

Die Qualität eines Lebensmittels wird durch grundlegende Stoffeigenschaften, wie Festigkeit, Elastizität, Viskosität und Plastizität^{1,2,3}, verkörpert, die der Mensch mit seinen Sinnen erfassen kann. Farbe, Form, Geruch, Geschmack und Textur stellen die wichtigsten sensorischen Qualitätseigenschaften eines Lebensmittels dar.⁴ Diese Eindrücke beeinflussen die Akzeptanz des Lebensmittels beim Menschen.⁵ Polysaccharide, Proteine und Lipide sind wichtige „Texturogene“⁶ von Lebensmitteln, was bedeutet, dass die Textur vor allem Bedeutung bei Lebensmitteln hat, die reich an Kohlenhydraten, Proteinen oder Fetten sind.

Beim Abbeißen, Kauen und Schlucken werden das Fließ- und Deformationsverhalten von Lebensmitteln durch die Sinnesorgane des Menschen registriert⁷ und die Textur durch die wahrgenommenen Eigenschaften bewertet. Der Gesichts- und Sehsinn erfassen das Äußere eines Lebensmittels, der Gehörsinn die Geräusche, die beim Brechen oder Kauen entstehen, Geschmack- und Tastsinn die Konsistenz, Festigkeit und Textur, und der Geruchsinn entscheidet über die Akzeptanz der Lebensmittel.⁸ Da die Geschmäcker aber bekanntlich verschieden sind und der Mensch ein sehr subjektives „Messinstrument“ darstellt, werden Methoden gesucht, um die Analyse der Struktur und Akzeptanz von Lebensmitteln zu objektivieren. Auf der einen Seite gelingt das durch die Schulung des als „Messinstrument“ dienenden Menschen⁸, auf der anderen Seite wird versucht, den Menschen durch Geräte zu ersetzen, um eine „Absolutqualität“⁸ der Lebensmittel zu erhalten.

1.2 Geschichte der Elektronenmikroskopie, konfokalen Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie bei Lebensmitteln

Der Erfindung des Elektronenmikroskops gingen viele Entdeckungen voraus: 1673 hat Antoni van Leeuwenhoek das erste, einfache Lichtmikroskop erfunden, 1677 baute Robert Hooke das erste Durchlichtmikroskop, und 1897 wurde von Sir J. J. Thomson das Elektron entdeckt. Prinz de Broglie definierte 1924 die Wellennatur und Wellenlänge von Elektronen, zwei Jahre später publizierte H. Busch seine Forschungsergebnisse über die Bewegung von Elektronen in magnetischen Feldern, die bewiesen, dass ein magnetisches Feld als Linse zum Fokussieren von Elektronen dienen kann.

Die älteste Rastersondenmikroskopietechnik ist die, 1982 von Gerd Binnig und Heinrich Rohrer vom IBM-Forschungslaboratorium Zürich entwickelte, Rastertunnelmikroskopie.⁹ Für die Entwicklung dieses damals komplett neuen Typs von Mikroskop, der ohne Linsen, Photonen oder Elektronen funktioniert, sondern wo die Probenoberfläche durch automatisches Scannen abgetastet wird¹⁰, erhielten Binnig und Rohrer 1986 den Nobelpreis für Physik.^{11,12} Im gleichen Jahr wurde auch Ernst Ruska vom Fritz-Haber-Institut in Berlin für den Bau des ersten Transmissionselektronenmikroskops (TEM) in den 30er Jahren der Nobelpreis für Physik verliehen.¹²

Max Knoll vom Hochspannungsinstitut der Technischen Hochschule in Berlin bewies 1935 die Theorie vom Rasterelektronenmikroskop (REM). Das erste, dem heutigen ähnelnden REM wurde 1942 bei der Radio Corporation of America von Vladimir Zworykin, James Hillier und Gerald Snyder entwickelt. Zwischen 1948 und 1952 wurde diese Bauart des Rasterelektronenmikroskops von Oatley, McMullan und Smith von der Universität Cambridge verbessert.

Obwohl das konfokale Laserraster-Mikroskop (CLSM: confocal laser-scanning-microscope) 1957 von Minsky erfunden wurde¹², dauerte es bis in die 80iger Jahre, bis die Technik verbreitet war und man sie genutzt hat. Das Neue daran war, dass bei CLSM nur immer ein Punkt abgebildet wird, während bei der Lichtmikroskopie die ganze Probe beleuchtet wird.¹³

Die Analyse von Lebensmitteln mittels Mikroskopietechniken begann im 19. Jahrhundert, als Arthur Hassall 1850 gezeigt hat, dass es möglich ist, mit dem Mikroskop Spuren von Chicorée in gemahlene Kaffee nachzuweisen. Er erregte

Einleitung

damit Aufsehen, weil es bis dahin weder mit analytischen chemischen Methoden noch mit anderen Möglichkeiten möglich war, Verunreinigung in Lebensmitteln zu entdecken. Nach weiteren Versuchen identifizierte er nicht nur Chicorée, sondern auch Weizen-, Bohnen- und Eichel-Bestandteile in gemahlenem Kaffee.

1930 haben Winton und Winton vier große Bände über die Struktur von Lebensmitteln unter dem Titel „The Structure and Composition of Foods“ (Vol. I-IV) herausgegeben, wo sie einige praktische Details zum Mikroskopieren geben. 1923 publizierte Wallis sein Buch „Analytical Microscopy: its Aims and Methods in Relation to Foods, Water, Spices and Drugs“, welches sehr beliebt war, weil der Autor darin Methoden zur Präparation der Lebensmittel für die Mikroskopie und zur Kontrastverbesserung beschreibt.^{14,15} Er geht auch auf das Thema „Kaffee und Chicorée“ ein und beschreibt, dass es sehr schwer ist, diese beiden Substanzen auseinanderzuhalten, aber dass es Präparationsmethoden gibt, mit denen es gelingt, die Bestandteile zu trennen bzw. auseinanderzuhalten.

Durch die Entwicklung des Lichtmikroskops war es möglich, Lebensmittel nach Verfälschungen zu untersuchen, doch die Lichtmikroskopie allein reichte manchmal nicht aus, daher waren Wissenschaftler gefordert, nach anderen Möglichkeiten zu suchen. Dies gelang, als das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) auf den Markt kam. Im Gegensatz zur 1000-fachen Vergrößerung eines Lichtmikroskops, konnte mit der neuen Technologie 10000-fach vergrößert werden. Vergrößerung heißt aber nicht automatisch, dass man Bilddetails damit immer verbessern konnte. Außerdem war es sehr kompliziert, Lebensmittel mit der neuen Technik zu präparieren und zu untersuchen. Aus diesen Problemen heraus wurde das Rasterelektronenmikroskop (REM) entwickelt, welches dreidimensionale Bilder schuf. Das Problem der beiden Techniken ist die Probenvorbereitung, mit der sich Wissenschaftler seit 1968 beschäftigen. Seit daher wurden mehrere Techniken und Verbesserungen entwickelt, die zur Strukturaufklärung der Lebensmittel einen großen Beitrag leisteten.¹⁶

1.3 Grundlagen der Elektronenmikroskopie, der konfokalen Mikroskopie und der Rasterkraftmikroskopie

1.3.1 Elektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie unterscheidet man zwei Gerätetypen, die Durchstrahlungselektronenmikroskope (TEM; transmission electron microscopy) und die Rasterelektronenmikroskope (REM; scanning electron microscopy, SEM). Sie arbeiten nach unterschiedlichen Prinzipien, haben aber eine Reihe von Bauteilen und Technologien gemeinsam: eine, auf Hochvakuum ausgepumpte Säule mit Vakuumanlage, ein Elektronenstrahlerzeugungssystem und elektromagnetische Linsen. Die gemeinsame Technologie, die dahintersteckt, ist, dass bei beiden Typen die Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Objekt genutzt wird, um Informationen und Erkenntnisse über die Probe zu bekommen, und dass sowohl bei Durchstrahlungselektronenmikroskopen, als auch bei Rasterelektronenmikroskopen die Untersuchung des Objekts im Hochvakuum erfolgt.¹⁷

1.3.1.1 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Die Durchstrahlungselektronenmikroskopie (Transmissionselektronenmikroskopie) arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie das Lichtmikroskop, nur dass Elektronen anstatt von Licht verwendet werden. Das Objekt wird mit Elektronen durchstrahlt, und es kommt zur Erzeugung eines Bildes.

1.3.1.2 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Im Gegensatz zur Transmissionselektronenmikroskopie wird bei der Rasterelektronenmikroskopie ein zeitsequenziertes Bild, das auf einem Monitorbildschirm zeilenweise „geschrieben“ wird, erzeugt. Der Vorgang findet im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden. Es wird zwischen Kathode und Anode Hochspannung (1-30 keV) angelegt, und ein fein gebündelter Elektronenstrahl rastert die Probenfläche ab.

Es gibt verschiedene Detektoren, die je nach Fragestellung unterschiedliche Signale registrieren. Meist werden Sekundärelektronen als Signal verwendet. Diese werden

Einleitung

vom Sekundärelektronendetektor registriert. Werden auf der Probenoberfläche viele Sekundärelektronen herausgelöst, so erscheint der Punkt am Bildschirm hell.¹⁸

1.3.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Anders als bei der konventionellen Mikroskopie, in der das Objektfeld als Ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie durch Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes.¹⁹

1.3.3 Rasterkraftmikroskopie (RKM)

Bei der RKM tastet eine feine Spitze (Sonde) die zu untersuchende Oberfläche in geringen Abständen ab.¹¹ Beim Abtasten wirken zwischen der Spitze und Probe Kräfte, die die Spitze je nach Probenoberfläche auslenken.²⁰

In der nachfolgenden Abbildung ist ein Rasterkraftmikroskop, welches auf einem Lichtmikroskop befestigt ist, schematisch dargestellt. Der Laserstrahl wird durch ein Prisma auf den Nadelhalter geleitet und das reflektierte Licht durch einen Spiegel auf das Messfeld gelenkt.

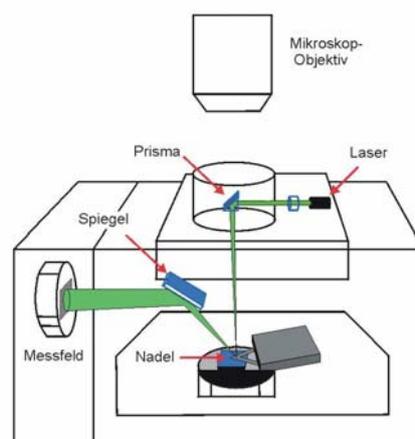


Abbildung 1: Schema eines Rasterkraftmikroskops
(Quelle: Magonov, S.N. und Whangbo, M.-H. (1996).²¹)

1.4 Zusammensetzung und wichtige Strukturelemente der untersuchten Lebensmitteln

Lebensmittel haben unterschiedliche Bestandteile und somit auch verschiedene Eigenschaften. Die Hauptbestandteile unserer Nahrung sind Wasser, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Mikronährstoffe wie Vitamine und Mineralstoffe.

Entscheidend für die Textur der Produkte sind ihre Strukturelemente. Diese ergeben dann die „Architektur“ der Mikro- und Makrostruktur. Veränderungen in der Struktur können zu Veränderungen in der Textur, im Geschmack und in den ernährungsphysiologischen Eigenschaften und zu Wechselwirkungen zwischen den Komponenten führen.

Milch und Milchprodukte:

Milch

Milch ist ein „aus den Milchdrüsen weiblicher Säugetiere während der Laktation abgesondertes Sekret“²² und stellt eine Fett-in-Wasser-Emulsion dar²³.

Die Zusammensetzung von Kuhmilch findet sich in Tabelle 1. Neben Proteinen, Fett, Mineralstoffen und Kohlenhydraten finden sich auch Vitamine, Enzyme und andere stickstoffhaltige Substanzen in der Milch.²³

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kuhmilch

Wasser [%]	83-88
Kohlenhydrate [%]	4-6
Fett [%]	3-5
Proteine [%]	3-4
Mineralstoffe [%]	0,7-0,9

(Quelle: Franzke, C. (1996). Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. B. Behr's Verlag GmbH & Co. S. 420.²²)

Anm.: Die Zusammensetzung bezieht sich auf das Lebensmittel im Allgemeinen.

Die Hauptstrukturelemente der Milch sind Casein-Mizellen, Fettkügelchen, Molkenproteine und Lipoprotein-Partikel.²⁴

Casein stellt fast 80% der Proteine in Milch dar und besteht aus vier Fraktionen: α_{S1} -, α_{S2} -, β - und κ -Casein. Caseine haben einen hohen Gehalt an Prolin und Phosphor, der als Phosphat-Gruppe mit der Hydroxy-Gruppe der Aminosäure Serin verestert ist. Über die Phosphoseryl-Reste können bei den α - und β -Caseinen

Einleitung

Bindungen mit Kalzium aufgebaut werden. Das κ -Casein hat nur einen Phosphoseryl-Rest, ist wie ein Emulgator aufgebaut und dient zur Stabilisierung der Casein-Mizelle.

In Kombination mit kolloidalem Kalziumphosphat (CCP) wird das Gebilde Casein-Mizelle genannt. Das κ -Casein befindet sich an der Oberfläche der Casein-Mizelle zwischen den hydrophoberen α - und β -Caseinen und dem Wasser der Milch. Wird das κ -Casein durch das Enzym Lab gespalten, entsteht ein Gel.

Es existieren vier verschiedene Modelle zur Erklärung dieser Casein-Mizellen. Im Mantel-Kern-Modell bilden α - und β -Caseine die Kerne, die durch Kalzium-Ionen und kolloidales Kalziumphosphat verbrückt werden, und κ -Casein den Mantel. Das Internal-Structure-Modell stellt die Mizelle als fädiges Netzwerk dar, wobei κ -Casein Knoten bildet, die miteinander verbunden sind und in denen die α - und β -Caseine eingelagert sind. Im Submicellen-Modell setzt sich eine Casein-Mizelle aus Casein-Monomeren zusammen, und die Caseine kommen in einem bestimmten Verhältnis vor. Die Casein-Submicellen beinhalten zwei verschiedene Typen, einen Typ mit und einen Typ ohne κ -Casein. Ein viertes Modell beschreibt die Casein-Mizelle als Aggregat einzelner Casein-Moleküle.²⁴

Drei Mechanismen halten das Casein-Molekül zusammen: Casein-Verbindungen zwischen hydrophoben Regionen auf dem Protein und zwischen Regionen mit hohem Gehalt an hydrophoben CCP und CCP-Verbindungen zwischen Caseinen.^{25,26}

Die Casein-Mizellen haben einen Durchmesser von 0,02 bis 0,30 μm und liegen in flüssiger Form als Suspension vor, das heißt, dass sich feste Partikel in einer flüssigen, kontinuierlichen Phase befinden. Die restlichen 20% der Proteine in Milch sind Milchserumproteine (Molkenproteine), wie zum Beispiel α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Rinderserumalbumin und Peptide, die durch Proteolyse aus den Caseinen entstanden sind. Bei Molkenproteinen handelt es sich um globuläre und hitzelabile Proteine. β -Lactoglobuline sind hydrophobe Milchproteine, die aber in Wasser löslich sind, weil ihre Hydrophobie von der Sekundärstruktur verborgen wird. Wenn ihre Sekundärstruktur zum Beispiel durch Erhitzen zerstört wird, werden die hydrophoben Stellen frei und bilden mit Kalzium Komplexe.²⁴

Die Anhäufung von Casein-Mizellen kann durch Säurebildung, Erhitzung, Beigabe von Kalzium, Ethanol oder Hydrokolloiden, Lab, Luft und Gefrieren verändert werden.

Einleitung

Beim Erhitzen von Milch fallen die Caseine aus, es entsteht ein Milchhäutchen aus Albuminen und Globulinen. Das α_{S1} -Casein ist ein globuläres Molekül, dem die Aminosäure Cystein fehlt. Das α_{S2} -Casein besitzt eine dipolare Struktur. α -Caseine sind mit Kalzium-Ionen fällbar. β -Caseine haben einen polaren Kopf und einen unpolaren Schwanz. Spaltet man κ -Casein, bricht die Micelle zusammen und die mizellare Suspension wird zu einem Gel, das heißt die Milch gerinnt.

Durch Pasteurisation von Milch (15 bis 20 Sekunden bei 72 bis 75°C) werden nur die vegetativen Mikroorganismen abgetötet. Bei einer Temperatur über 70°C denaturieren die Molkenproteine und interagieren untereinander und mit Casein-Mizellen über hydrophobe Bindungen und Disulfid-Bindungen. Ultrahocherhitzte Lebensmittel (Sterilisation für 4 bis 15 Sekunden bei 135 bis 150°C) tötet auch die sporenbildenden Mikroorganismen ab.¹⁵⁷

Fettkügelchen stellen in Milch die disperse Phase dar und sind von einer Lipoprotein-„Membran“ umgeben. Die meisten Fettsäuren im Milchfett haben Kettenlängen zwischen C_4 (Buttersäure) und C_{18} (Stearinsäure). Milchfett besteht zu 65% aus gesättigten Fettsäuren und 30% aus einfach ungesättigten Fettsäuren und 4% aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Milchfettkristalle können sich in Nadeln, Plättchen oder polymorphen Formen (zum Beispiel α , β und β') ausbilden. Der α -Zustand stellt ein hexagonales, der β -Zustand ein monoklines und der β' -Zustand ein orthorhombisches Kristallsystem dar.¹⁶

Laktose ist ein Disaccharid aus D-Glucose und D-Galactose, die durch β -1,4-Verbindungen verknüpft sind, und kann in kristalliner und amorpher Form auftreten. Kristalline Laktose existiert in zwei Kristallformen, in α -Hydrat und in der wasserfreien β -Form. Amorphe Laktose ist hygroskopisch und beginnt ab einem Feuchtegehalt von 8% zu kristallisieren.

In der Milch kommen auch Salze, vor allem Natrium- und Kaliumchlorid, und das Mineral Kalzium besonders in Form von Kalziumphosphat vor.

Milchpulver

Milchpulver wird durch Eindampfen von Milch gewonnen. Dazu wird Milch pasteurisiert, vorkonzentriert, und das Wasser wird danach durch Walzen- oder Sprühtrocknung verdampft.

Einleitung

Anwendung findet Milchpulver bei der Herstellung von Milkschokolade und Säuglingsnahrung²³.

Joghurt

Als Joghurtbakterien werden meistens *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus bulgaricus* verwendet.¹⁶³ *Lactobacillus bulgaricus* bauen Proteine zu Peptide ab, welche *Streptococcus thermophilus* zur Produktion von Säure und Acetaldehyd nutzt. Die Casein-Mizellen bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus, was zur Gelbildung führt, das heißt, dass die Milch koaguliert bzw. gerinnt.^{16,31}

Die Hierarchie bei Gelen in Bezug auf ihre Strukturelemente ist folgende: Monomer, Polymer, Faser, Gel-Netzwerk, zum Beispiel Joghurt.²⁷

Käse

Käse ist ein „aus Milch, Sahne, teilweise oder vollständig entrahmter Milch, Buttermilch, Ziegenmilch, Schafsmilch oder aus Gemischen dieser Flüssigkeiten, gegebenenfalls unter Verwendung von Molke, Wasser, Kochsalz, Pilz- und Bakterienkulturen, durch Säuerung oder Zusatz von Lab“²² gewonnenes Gemisch. Die verschiedenen Käsesorten ergeben sich vor allem durch den verschiedenen Gehalt an Wasser bzw. Fett.

Die Mikrostruktur von Frischkäse kann als eine saure, durch Proteine stabilisierte O/W-Emulsion gesehen werden. Dadurch ergibt sich eine streichfähige Konsistenz.

Die Struktur von Hartkäse besteht aus einem dichten Casein-Netzwerk, in dem einige kristalline MilCHFettkügelchen inkludiert sind.¹⁵⁷ Bei der Herstellung von Hartkäse sind die Fermentation von Laktose zur Milchsäure, die Koagulation von Casein durch Lab und Säure, die Bildung eines Protein-Fett-Netzwerks und die Reifung von Bedeutung. Zwei wichtige Parameter dabei sind der Gehalt an Kalzium, der die Casein-Mizellen beeinflusst, und die Temperatur, die die Festigkeit steuert.¹⁶

Cottage Cheese

Cottage Cheese ist ein Frischkäse mit körniger Struktur, der nicht gereift ist.¹⁶³ Abhängig vom Herstellungsverfahren kann sich die Mikrostruktur verändern. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung gibt es Probleme, da die Polysaccharide nicht fixiert werden können und bei der Dehydration mit Ethanol dadurch Filamente entstehen. Daher sollte man bei der Interpretation des Ergebnisses vorsichtig sein.³¹

Eiscreme

Speiseeis kann aus folgenden Zutaten hergestellt werden: Milch, Milchprodukten, Zucker, pflanzlichen Fetten, Eiprodukten, Früchten oder Fruchtbestandteilen, Kaffee, Kakao, Aromastoffen und Farbstoffen¹⁶³. Es enthält 40 bis 50% Luft und besteht aus 10 bis 14% Fett, 12 bis 15% Zucker, 10 bis 14% Milchanteilen, 0,5% Stabilisator und Emulgator und 45 bis 55% Wasser. Die wichtigsten Strukturelemente sind Eiskristalle, Luftbläschen und Fettkügelchen. Die kontinuierliche Phase enthält Casein, Salze und Stabilisatoren, die flüssige Phase Fettkügelchen und die disperse Phase Luft. Stabilisatoren werden beigemischt, um ungefrorenes Wasser zu binden und eine stabile Verteilung von Luft, Wasser und Fett zu bekommen. Fett begünstigt die Bildung von kleinen Fettkristallen und erhöht die Viskosität. Zucker und Salz erniedrigen den Gefrierpunkt.¹⁶

Die Struktur von Eiscreme ist abhängig von der Eiskristallgröße, der Menge und Verteilung von Fett, der Größe der Luftzellen, der Friergeschwindigkeit und ob Stabilisatoren und Emulgatoren beigemischt werden. Letzterer ist für die cremige Konsistenz von Eiscreme verantwortlich.²⁷

Abbildung 2 zeigt eine Zeichnung der Strukturelemente in Eiscreme. Zu erkennen sind Luftzellen, Eiskristalle, Fettkügelchen (runde Kreise), Laktose-Kristalle (kristalline Gebilde), Zucker-Moleküle (kleine, runde Kreise), Casein-Mizellen (Anhäufung von Punkten), Emulgator (Punkt) und festes Fett (strichlierte Linie).

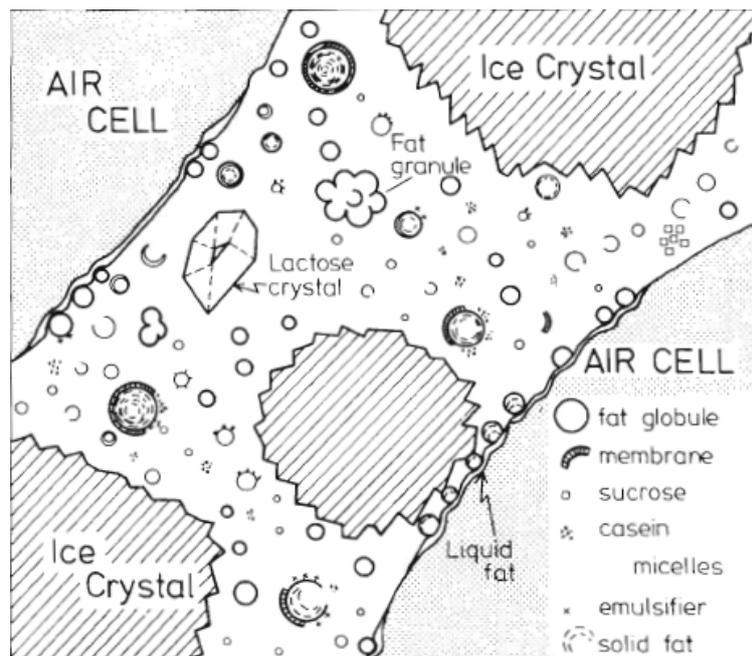


Abbildung 2: Strukturelemente in Eiscreme
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.227. ^[16])

Einleitung

Durch das Wachsen von Eiskristallen kann es sein, dass die anderen Bestandteile wie zum Beispiel Zucker, Casein-Mizellen oder koagulierte Proteine auf die Seite gedrängt werden. Daher muss das Gefrieren so schnell erfolgen, dass keine Zeit bleibt, damit sich Eiskristalle formen können.

Beim Erhitzen und Homogenisieren der Creme lagern sich Caseine und Molkenproteine an die Fettkügelchen an, danach bilden grenzflächenaktive Substanzen einen Film um die Fettkügelchen und verdrängen die Casein-Mizellen. Das Milchfett kristallisiert, und die Milchproteine und Hydrokolloide werden hydratisiert.²⁴

Stärkehaltige Produkte:

Stärke besteht zu 70 bis 80% aus Amylopektin und zu 20 bis 30% aus Amylose. Amylose ist ein lineares Polymer aus α -D-Glucose, verknüpft durch eine α -1,4-Verbindung. Bei höheren Temperaturen entstehen α -1,6-Verbindungen zwischen den Ästen des langen linearen Moleküls. Amylopektin besteht ebenfalls aus α -1,4- und α -1,6- verknüpften α -D-Glucose-Bestandteilen und ist ein verzweigtes Molekül. Ein Gel bildet sich, wenn die Amylopektin-Bausteine von der Amylose-Matrix durchzogen werden.²⁴

Kartoffeln

Die Kartoffel hat ihren Ursprung in Südamerika.²² Die genaue Zusammensetzung der Kartoffel findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Kartoffel

Wasser [%]	72-80
Stärke [%]	15-20
Stickstoffsubstanzen [%]	1,5-2,5
Mineralstoffe [%]	0,6-1,2
Rohfaser[%]	0,5-1
Pektine [%]	0,4
Saccharose [%]	0,2
Lipide [%]	0,2
Glucose [%]	0,1
Fructose [%]	0,1

(Quelle: Franzke, C. (1996). *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. B. Behr's Verlag GmbH & Co. S. 520.²²)

Anm.: Die Zusammensetzung bezieht sich auf das Lebensmittel im Allgemeinen.

Brot

Brot besteht aus „Mehl, Milch (Wasser), Salz und Triebmittel (Sauerteig, Hefe, Backpulver). Als Hefen werden obergärige Bierhefen eingesetzt. Zur Roggenbrotherstellung wird Sauerteig verwendet, der durch *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* und *L. fermentum* aus Mehl und Wasser gebildet wird.²³

Glutelin (Glutenin) und Prolamin (Gliadin) sind die Kleber im Teig. Für die Konsistenz sind Glykolipide (vor allem Digalactosyldiglyceride) verantwortlich. Die Elastizität wird durch Gluteline, die Viskosität durch Gliadin bestimmt. Nach Wasserzugabe wechselwirken Glykolipide und Gliadin bzw. Phospholipide und Glutenin.²⁴

Durch Zusatz von Backhilfsmitteln und anderen Additiven lassen sich die Proteinvernetzungen und damit die Struktur des Teiges bzw. der Backware entscheidend verändern.¹⁶³

Fetthaltige Lebensmittel:

Fette sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerol mit Fettsäuren und haben lange, apolare Ketten von verschiedenen Längen, die miteinander interagieren und so beim Kühlen im geschmolzenen Zustand Kristalle (α -, β - und β' -Kristalle) formen.¹⁶ α -Kristalle haben ein niedriges Molekulargewicht, die schnellste Wachstumsgeschwindigkeit, den niedrigsten Schmelzpunkt und stellen die instabilste Form dar. β -Kristalle haben das höchste Molekulargewicht und den höchsten

Einleitung

Schmelzpunkt und sind am stabilsten. Die genannten Parameter für die β' -Kristallen liegen zwischen denen der α - und β -Kristalle.

Phospholipide sind Verbindungen, die neben Fettsäuren bzw. Fettaldehyden Phosphorsäure enthalten. Sie sind das Grundgerüst biologischer Membrane.

Die flüssige Phase von Fetten und Ölen ist eine Mischung aus Triacylglyceriden. Die Menge an kristallinem Fett ist vom Gehalt an gesättigten Fettsäuren abhängig.

Margarine

Margarine ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion. Bei der Herstellung wird zuerst die wässrige Phase in die Fettphase emulgiert, danach wird die Emulsion unterkühlt, und es erfolgt eine Kristallisation, was die Viskosität der Fettphase erhöht und die Margarine „fest“ macht.¹⁶³

Die Margarine ist mit 80% Fett und etwa 18% Wasser ähnlich wie Butter aufgebaut.

Butter

Butter wird aus Rahm hergestellt und stellt eine Wasser-in-Öl-Emulsion dar. Abbildung 3 zeigt die Strukturelemente von Butter, diese sind Fettkristalle, freies Fett, Luftblasen, Fetttröpfchen und die wässrige Phase.

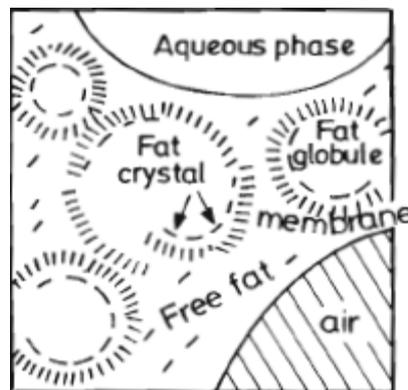


Abbildung 3: Strukturelemente in Butter
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.222. ^[16])

Man unterscheidet Sauerrahmbutter (aus gesäuertem Rahm) und Süßrahmbutter (aus ungesäuertem Rahm). In

Tabelle 3 findet man die Zusammensetzung von Butter.

Die Konsistenz von Butter hängt von der Verteilung von flüssigem und festem Fett in den Fettkügelchen ab. Diese kann man beim Reifeprozess steuern.¹⁶

Tabelle 3: Zusammensetzung von Butter

Fett [%]	81-85
Wasser [%]	14-16
Fettfreie Trockenmasse [%]	0,5-4
NaCl [%] ev.	1,2

(Quelle: Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S.542.¹⁶³)

Anm.: Die Zusammensetzung bezieht sich auf das Lebensmittel im Allgemeinen.

Eine Emulsion ist ein disperses System aus zwei Flüssigkeiten und besteht aus zwei Phasen, aus einer dispersen oder inneren und einer kontinuierlichen oder externen Phase. Man unterscheidet Öl-in-Wasser-Emulsionen, mit Öl als disperser und Wasser als äußerer Phase und Wasser-in-Öl-Emulsionen, wo Wassertröpfchen in Öl emulgiert sind. Folgende physikalische Eigenschaften zeichnen die Konsistenz von Emulsionen aus: Proportion der Phasen, Größenverteilung der Tröpfchen und Vorhandensein und Position von oberflächenaktiven Substanzen.

Oberflächenaktive Substanzen sind chemische Komponenten, die sowohl ein apolares als auch ein polares Ende aufweisen. Sie setzen die Oberflächenspannung der flüssigen Phase herab, indem sie zum Beispiel Mizellen ausbilden.¹⁶

Ein überwiegend hydrophiler Emulgator stabilisiert O/W-Emulsionen, während ein vor allem hydrophober Emulgator W/O-Emulsionen festigt. O/W-Emulsionen werden von Casein-Mizellen, W/O-Emulsionen von Fettkristallen stabilisiert. Man unterscheidet drei Klassen von Emulgatoren, nicht-ionische (gesättigte und ungesättigte Mono- und Diglyceride, Fettkristalle), anionische (Ester von Monoglyceriden) und amphotere (Proteine, Phospholipide, zum Beispiel Lecithin).¹⁵⁷

Eiweißhaltige Lebensmittel:

Proteine sind Polypeptid-Ketten aus (L)-Aminosäuren. Sie liegen meistens in komplexen dreidimensionalen Strukturen vor, welche die Eigenschaften und Funktionen im Lebensmittel definieren.¹⁵⁷ Je nach Aminosäuresequenz, Anordnung und Konformation der Peptidketten unterscheidet man Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Bei einer Denaturierung kommt es zum Verlust der Konformation und zur Auffaltung geordneter Strukturbereiche. Die Folgen davon können ein verändertes Wasserbindungsvermögen und der Verlust der biokatalytischen Fähigkeiten bei Enzymen sein.

Einleitung

Die Hydrathülle von Proteinen wird bei Trocknungsprozessen reduziert, und es kommt zu intermolekularen Wechselwirkungen. Um irreversible Veränderungen zu vermeiden, muss das Trocknen proteinreicher Lebensmittel sehr schonend vor sich gehen. Da das Proteinmolekül eine gewisse Wassermenge als „Konstitutionswasser“ benötigt, ist eine Trocknung bis zur absoluten Wasserfreiheit nicht möglich.²²

Protein-Protein- bzw. Protein-Wasser-Interaktionen führen zur Bildung von Gelen, verschiedenen Texturen, Emulsionen und Schäumen. Die Prozesse werden zum Beispiel durch Kollagen (Bildung von Gelen), Gluten (Bildung eines viskoelastischen Teiges aus Weizenmehl), Caseine (Bildung von Emulsionen), Albumin (Bildung von Schäumen),... hervorgerufen.¹⁶

Fleisch

Unter Fleisch werden „alle Teile von warmblütigen Tieren in frischem und verarbeitetem Zustand“¹⁶³ bezeichnet, während im üblichen Sprachgebrauch darunter „fettes Skelettmuskelgewebe“¹⁶³ gemeint ist. Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der Zusammensetzung von Fleisch.

Tabelle 4: Zusammensetzung von Fleisch

Wasser [%]	76
Stickstoffsubstanzen [%]	21,5
Fett [%]	1,5
Mineralstoffe [%]	1
Kohlenhydraten [%]	0,05-0,2

(Quelle: Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S.585-586.¹⁶³)

Anm.: Die Zusammensetzung bezieht sich auf das Lebensmittel im Allgemeinen.

Der Muskel besteht aus Muskelfasern, die von einer Bindegewebeschicht ummantelt sind. Jede Muskelfaser ist eine mehrkernige Muskelzelle, die von Myofibrillen durchzogen ist. Die Myofibrillen wiederum bestehen aus Myofilamenten, nämlich aus dicken Myosin- und dünnen Aktin-Filamenten, die sich wiederum aus myofibrillären Proteinen zusammensetzen. Bei Aktin, das in doppelhelixartiger Struktur vorliegt, handelt es sich um das Monomer globuläres Aktin (G-Aktin) und um das fadenförmige Polymer F-Aktin. Im Sarkoplasma der Muskelzelle befinden sich wasserlösliche Albumine, wasserunlösliche Globuline, Hämoglobin und Myoglobin.

Einleitung

Letzteres gibt dem Muskel die rote Farbe. Die Querstreifung des Gewebes ergibt sich durch die Anordnung der A- und I-Banden, der Z- und M-Linien, sowie der H-Zonen. Der größte Bestandteil des Gewebes stellt Kollagen dar, das vor allem aus Glycin, Prolin und 4-Hydroxyprolin besteht und in dessen Tripelhelix Hyaluronsäure, Proteoglykane und geringe Mengen an Elastin eingelagert sind. Hyaluronsäure ist ein Aminodisaccharid aus β -1,3-glykosidisch gebundener D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin. Proteoglykane bestehen aus 1,4-verknüpften Dissaccharid-Einheiten, die denen der Hyaluronsäure ähneln. Proteoglykane und die Hyaluronsäure bilden hochmolekulare Aggregate und zusammen mit dem Kollagen ein Netzwerk. Elastin stellt zirka 1% des Muskeleiweißes dar und besteht vor allem aus Desmosin und Isodesmosin.

Bei Fleisch ist die hierarchische Anordnung der Strukturelemente folgende: Aminosäuren, Helix, Fibrille, Faser, Fleisch.²⁷ Fett stellt in Fleisch die disperse Phase dar, die Fetttröpfchen sind von einem Proteinfilm aus myofibrillären Proteinen umgeben. Die myofibrillären Proteine tragen bei der Bildung der Gelmatrix bei. Wird Fleisch erhitzt, denaturieren die Proteine und verlieren ihre Eigenschaft, Wasser zu binden.¹⁶

In nachfolgender Abbildung sieht man die Strukturelemente in Fleisch. Erkennbar sind die großen Fettkügelchen, die von einem Proteinfilm umgeben sind.

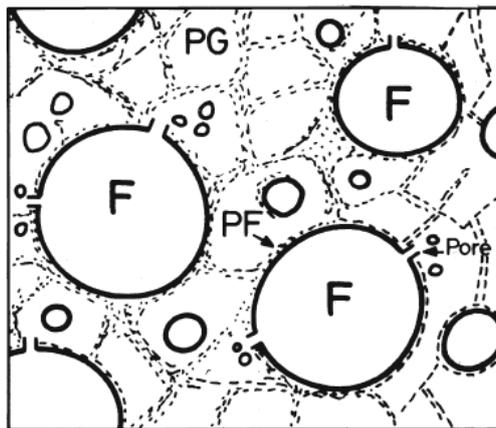


Abbildung 4: Strukturelemente von Fleisch
F = Fetttröpfchen, PG = Protein-Gelmatrix, PF = Proteinfilm um den Fetttröpfchen
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.82. ^[16])

Muskelgewebe enthält bei einem Proteinanteil von 20 bis 22% rund 74 bis 76% Wasser, das sind 350 bis 360 g Wasser pro 100 g Protein. Der Anteil an Hydratwasser ist klein, er liegt bei Proteinen im Allgemeinen bei rund 20 g Wasser pro 100 g Protein. Das übrige Wasser des Muskels (zirka 95%) wird durch die

Einleitung

schmalen Kanäle zwischen den Filamenten gehalten. Veränderungen im Wassergehalt sind mit einer Quellung oder Schrumpfung der Myofibrillen verbunden.¹⁶³

Wenn man Nahrungsmittel auftaut, schmelzen die Wasserkristalle und lagern sich an der Oberfläche größere Kristalle an. Dieser Prozess führt zum Beispiel in Fleisch auf Grund der Dehydratisierung und steigenden Ionenstärke zur Zerstörung des Gewebes und zur Denaturierung von Proteinen.¹⁶

Polysaccharide und viskose Lebensmittel:

Die Bausteine der Polysaccharide (Glykane) sind Monosaccharide, die über Glykosidbindungen miteinander verknüpft sind. Je nach Anreihung dieser Strukturelemente ergeben sich verschiedene Konformationen der Kette.¹⁶³

Nach ihrer Herkunft unterscheidet man verschiedene Hydrokolloide: Stärke, Hydrokolloide aus tierischem Eiweiß (Milcheiweiß, Gelatine), Cellulose und Cellulosederivate, Pektine und Pektinsalze, Samenmehle (Johannisbrotkernmehl, Guar,...), Pflanzenextrakte (Gummi arabicum, Traganth,...), von Mikroben gebildete Hydrokolloide (Curdlan, Xanthan,...) und Hydrokolloide aus Rotalgen (Agar-Agar, Carrageenane,...). In der Lebensmittelindustrie finden sie als Stabilisatoren, Verdickungsmittel, Geliermittel, Suspendierungsmittel, Aufschlagmittel, Bindemittel, Energie-/Kalorienverminderer, Filmbildner, Trennmittel, Flockungsmittel,... Verwendung.²⁸ Sie erhöhen die Viskosität des jeweiligen Produkts und machen es dickflüssiger.²⁹

Man unterscheidet thermo-reversible und thermo-irreversible bzw. klare und undurchsichtige Gele. Stärke zum Beispiel bildet ein thermo-irreversibles, opakes Gel aus. Nach Erhitzen und anschließendem Kühlen setzt der Prozess der Retrogradation ein. Manche Veränderungen, die während diesem Stadium passieren, sind thermo-reversibel.¹⁵⁷

Gele können, wie in Abbildung 5 ersichtlich ist, verschiedene Formen von Netzwerken bilden, zum Beispiel gibt es den Fischnetz-Typ (Beispiel: chemische Gele), Tripel-Helices (Beispiel: Gelatine), die Eierschachtel-Struktur (Beispiel: Pektin und Alginat in Verbindung mit Kalzium-Ionen), Agglomerationen (Beispiel: Carrageen), Doppel-Helices (Beispiel: Agarose) und Gele, die von globulären Proteinen geformt werden.

Einleitung

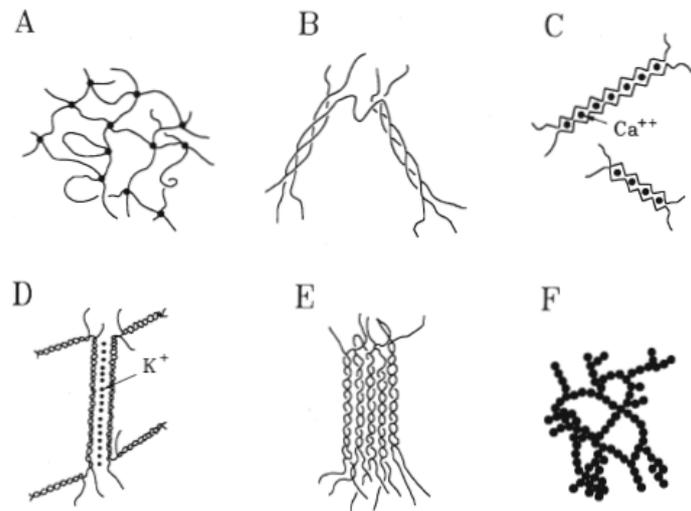


Abbildung 5: Verschiedene Geltypen
A = Fischnetz-Typ, B = Tripel-Helix, C = Eierschachtel-Struktur, D = Agglomerationen, E = Doppel-Helices, F = Gele von globulären Proteinen
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1999). S.230. ^[27])

Verdickungsmittel besitzen im Allgemeinen eine kugelförmige verknäulte, verzweigte oder verkettete Struktur. Da Hydrokolloide ein gutes Quell- und Bindevermögen besitzen, nehmen sie Wasser auf, wobei sich die Moleküle des Verdickungsmittels in den hochviskosen Lösungen frei bewegen können.

Schokolade:

Schokolade ist eine „geformte oder nicht geformte Zubereitung aus Kakaokernen, Kakaobruh oder aus Kakaomasse und Saccharose, ohne oder mit Zusatz von Kakaobutter, natürlichen Gewürzen, Vanillin oder Ethylvanillin“¹⁶³ und Lecithin. Eine typische Zusammensetzung von Schokolade findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Schokolade

Kakaomasse bzw. Kakaomasse / Kakaobutter [%]	mindestens 40
Zucker [%]	höchstens 60
Kakaobutter [%]	mindestens 21
Kakaomasse bei Verwendung von Kakaobutter [%]	mindestens 33

(Quelle: Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S.1000. ¹⁶³)

Anm.: Die Zusammensetzung bezieht sich auf das Lebensmittel im Allgemeinen.

Einleitung

Die rheologischen Eigenschaften von geschmolzener Schokolade hängen von den Interaktionen zwischen festen Partikeln und der flüssigen Phase ab. Die polare Gruppe des Emulgators (Lecithin) reagiert mit der Oberfläche der festen Bestandteile. Da Lebensmittel hierarchisch aufgebaut sind, ergibt sich bei Schokolade folgende Ordnung der Strukturelemente: Fettsäuren, Lamelle, Spherulit, Fettkristalle, Schokolade.

Der Wassergehalt in Schokolade beträgt unter 1%, das meiste Wasser dient als Verbindung zwischen der hydrophilen Oberfläche und der flüssigen Phase.¹⁷¹

Die Fettphase ist die kontinuierliche, flüssige Phase, die die Fettkristalle einschließt. Es werden sechs verschiedene polymorphe Formen unterschieden, die alle unterschiedliche Schmelzpunkte besitzen. Je nach Reinheit, Temperatur, Kühlgeschwindigkeit und Art von Lösungsmittel bilden sich die verschiedenen Kristallformen aus.¹⁵⁷

Kakaobutter besteht zu 94 bis 96% aus Triglyceriden, vor allem von Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Zuckermoleküle sollten in der Schokolade kleiner als 25 μm sein, damit sie nicht im Mund als unangenehm wahrgenommen werden. Außerdem ist amorpher Zucker hygroskopischer als kristalliner.²⁷

Gemüse:

Gemüse hat als Gerüstsubstanzen Zellulose, Hemizellulosen (Polyosen), Pektine, Lignin und Glykoproteine (zum Beispiel Extensin).

Zellulose besteht aus β -1,4-verknüpfter Glucose. Hemizellulosen sind verzweigte (amorphe), heterogene Polysaccharide. Ihre Monomere können Hexosen (Galactose, Glucose, Mannose), Pentosen (Arabinose, Xylose) und Uronsäuren (Galacturonsäure, Glucuronsäure) sein. Pektin besteht aus Ketten von α -1,4-glykosidisch verbundenen Galacturonsäure-Einheiten, die in 1,2-Position miteinander verknüpft sind.

Artefakte bei der mikroskopischen Untersuchung der Lebensmittel:

Für die mikroskopische Untersuchung von Lebensmitteln müssen die Proben vorbereitet und präpariert werden, was manchmal ein Problem darstellt. Die Produkte müssen nämlich bestimmte Präparationsvorbereitungen und -schritte, wie zum Beispiel Trocknung, Fixierung, Hochvakuumbehandlung, Färbung, mechanischen Belastungen (Montierung), Beschichtung, Entwässerung, Gefrieren, Schneiden,

Einleitung

Licht,... , überstehen, die meistens nicht ohne Artefakte oder Veränderung in der Struktur vor sich gehen.

Für manche mikroskopische Techniken müssen beispielsweise gefrorene Proben vorliegen. Während des Gefrierprozesses kann es aber zu einem osmotischen Verlust von Wasser, zu ungleichmäßigen, unregelmäßigen und sequentiellen Gefrieren von verschiedenen Zellbestandteilen und zur Zellzerstörung kommen.

Weiters spielt die Gefrierate eine große Rolle. Bei hoher Gefriergeschwindigkeit bilden die Wassermoleküle kleine Eiskristalle in hexagonalen Kristallstrukturen aus, andere mögliche Formen wären unregelmäßige Dendrite und kleine Spherulite. Langsames Gefrieren hat die Bildung von großen Eiskristallen im extrazellulären Raum zur Folge, was sich auf die Lebensmittelqualität negativ auswirkt. Während der Lagerung kann es auch zur Rekristallisation kommen, was ebenfalls einen Qualitätsverlust des Lebensmittels mit sich bringt.

Bei einer lokalen Überhitzung können auch Schwierigkeiten auftauchen. Fett kann schmelzen, und die Goldschicht kann brechen. Manche Bestandteile, wie zum Beispiel Laktose, sind auf Elektronenstrahlen empfindlich. Auch eine zu hohe Spannung kann zu Veränderungen und zur Zerstörung der Oberfläche führen. Die Proben müssen auch teilweise geschnitten werden, was bei Lebensmitteln mit hohem Wassergehalt Schwierigkeiten bereitet.

Weiters werden bei den Präparationstechniken für die mikroskopische Analyse Substanzen eingesetzt, die die Strukturelemente beschädigen oder verändern. Ein Beispiel wäre eine Formaldehydlösung, die manchmal für die chemische Fixierung bei der TEM eingesetzt wird. Diese Substanz enthält Methanol, der sich auf die Probe negativ auswirkt. Ein weiteres Problem ist, dass es manchmal zu unterschiedlich schnellen Fixierungen der Probenbestandteile kommt, was wiederum zu Artefakten führen kann.

Es kann also gesagt werden, dass die Strukturelemente der Lebensmittel durch die Präparationsschritte und durch die Analyse verändert werden können, und man vorsichtig bei der Interpretation der Ergebnisse sein muss.

2 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es, Methoden und Möglichkeiten zu finden, wie mit Elektronenmikroskopie, konfokaler Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie die Struktur von Lebensmitteln untersucht werden kann. Die Schwerpunkte liegen in der Probenvorbereitung, der Methodik und der Analyse der Proben. Außerdem sollen eventuelle Probleme und Maßnahmen beschrieben werden, die bei den jeweiligen Untersuchungsmethoden auftreten können und jene Untersuchungsmethode aufgezeigt werden, die für ein bestimmtes Lebensmittel am geeignetsten erscheint. Voraussetzung ist dabei, dass die Aufbereitung der Probe möglichst einfach und schnell vor sich gehen soll, und außerdem soll beachtet werden, dass die Struktur durch die Prozesse so wenig wie möglich verändert wird. Des Weiterem soll auf die Unterschiede der einzelnen Lebensmittel in Bezug auf Struktur und Aufbereitung eingegangen und Unterschiede in der Analyse erarbeitet werden.

3 Methodische Vorgehensweise

3.1 Präparation für TEM

Für das TEM wird ein Probenträger (Netz) mit einem Durchmesser von 3 mm verwendet. Je nach Beschaffenheit der Probe unterscheidet man drei große Verfahren. Bei kleinen und dünnen Proben, die man als Ganzes aufbringen kann, wird die Negativkontrastierung („Negative Staining“) eingesetzt. Ist die Probe dicker als 200 nm werden mittels Ultramikrotom Schnitte angefertigt (Ultradünnschicht-Methode). Die dritte Technik ist das Verfahren des Oberflächenabdrucks.

Bevor man diese drei Techniken anwendet kann, ist eine Vorbehandlung der Probe notwendig.

In der nachfolgenden Abbildung ist der Ablauf der drei Grundverfahren beschrieben. Die Stufen, die in Klammern gesetzt wurden, müssen nicht gemacht werden. Nachdem man die Probe isoliert hat, wird sie fixiert und aufbewahrt. Bei der Ultradünnschicht-Methode wird die Probe entwässert, mit Kunstharz getränkt und eingebettet und danach geschnitten. Als letzter Schritt wird eine Kontrastverbesserung durchgeführt. Der erste Schritt beim Oberflächenabdruck ist der Gefrierbruch. Nach diesem kann die Gefrierätzung folgen. Anschließend wird mit einem Schwermetall bedampft, unter Umständen kann ein immunologisches Verfahren angeknüpft werden. Bei kleinen Proben wird die Negativkontrastierung gewählt.

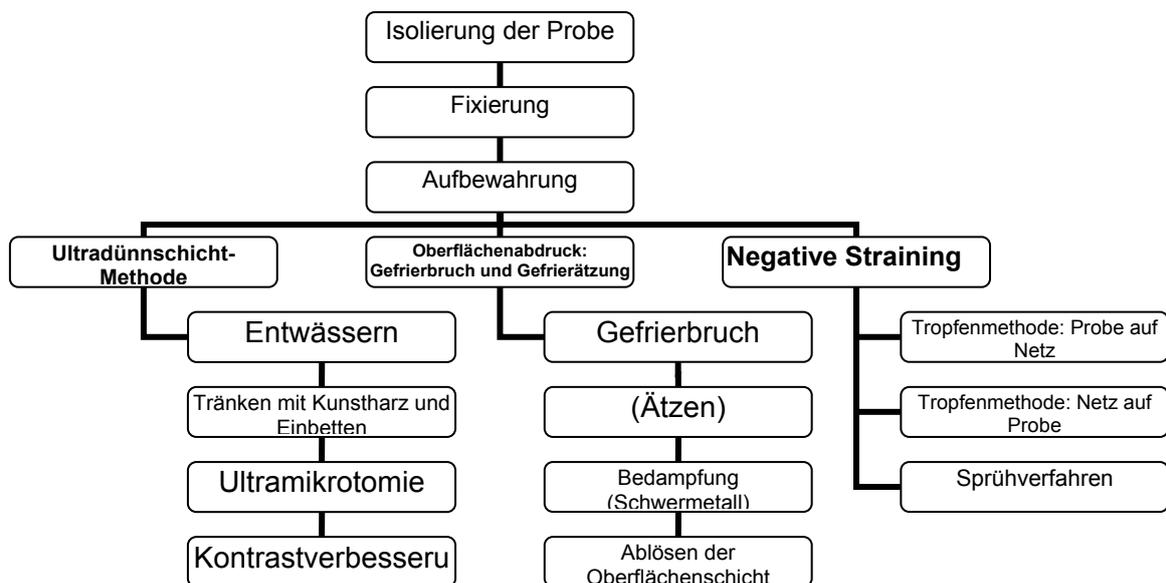


Abbildung 6: Verschiedene Methoden der Präparation bei der TEM

Methodische Vorgehensweise

Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte näher erklärt.

Isolierung der Probe

Die Probe wird in eine Fixierflüssigkeit gegeben, damit sie nicht beschädigt wird. Hierfür kann man zum Beispiel eine größere Probe als erforderlich nehmen, sie in eine Puffer- oder Fixierlösung tauchen und dann aus ihrem Inneren das eigentliche Untersuchungsobjekt entnehmen.

Fixierung

Bei der Fixierung unterscheidet man drei Arten, die chemische Fixierung, die Kryofixierung und die Gefrierfixierung. Die Abbildung 7 soll einen Überblick über die drei Techniken geben.

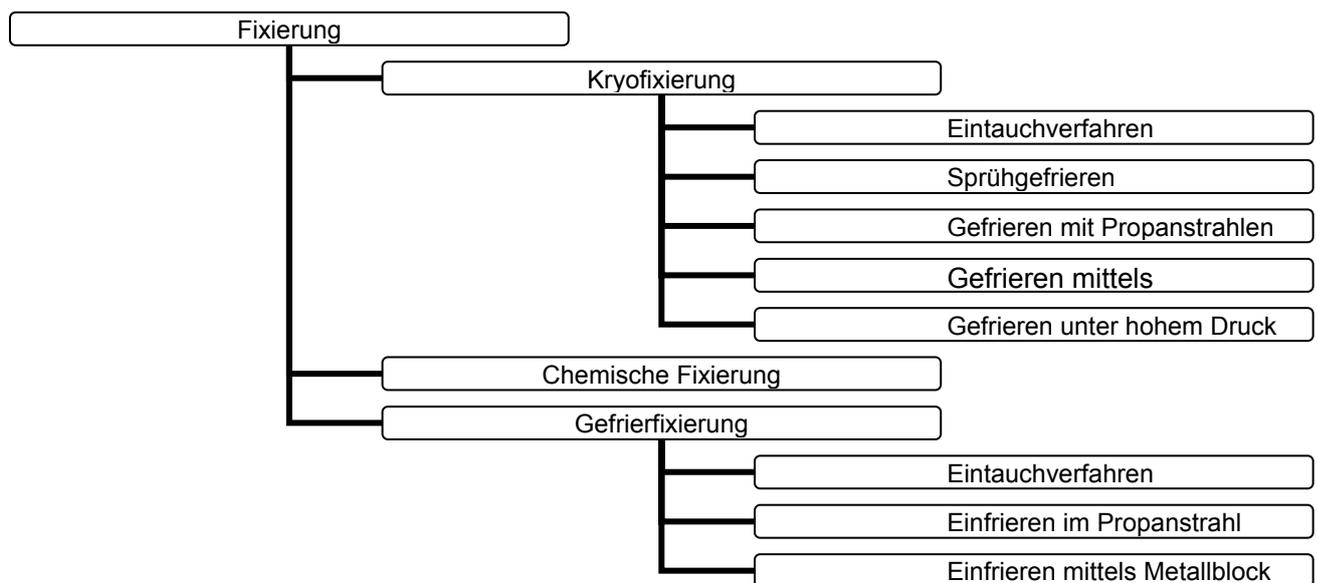


Abbildung 7: Arten der Fixierung bei der TEM

Chemische Fixierung

Die chemische Fixierung besteht aus zwei Stufen, der Primär- und der Sekundärfixierung. Dazu braucht man Fixiermittel, die in der Regel in einem Verhältnis von 5:1 (oder größer) zum Gewebe am geeignetsten sind.

Bei der Primärfixierung wird mit einem Aldehyd oder einer Mischung von Aldehyden fixiert. Hierfür verwendet man entweder Glutaraldehyd, Formaldehyd oder Acrolein. Man nimmt meistens 0,5 - bis 10 - volumenprozentigen Glutaraldehyd. Bei kommerziell erhältlichen Formaldehydlösungen (Formalin) ist meistens etwa 15% Methanol zur Stabilisierung enthalten, der sich negativ auf die Probe auswirkt.

Methodische Vorgehensweise

Acrolein verwendet man in der Konzentration von 1 bis 10%, in Kombination mit anderen Aldehyden oder Puffern. Der Nachteil von Glutaraldehyd ist, dass Lipide nicht stabilisiert werden, aber auch Formaldehyd fixiert Lipide und Polysaccharide nicht gut. Am häufigsten werden Glutaraldehyd und Formaldehyd kombiniert eingesetzt. Die Primärfixierung läuft bei 0 bis 4°C ab.³⁰ Da die Substanzen nur Proteine fixieren, wird für die Fixierung von ungesättigten Fettsäuren eine Sekundärfixierung angeschlossen.³¹

Bei der Sekundärfixierung werden Osmiumtetroxid (OsO_4), Rutheniumtetroxid (RuO_4), Kaliumpermanganat (KMnO_4) oder andere Permanganate, wie NaMnO_4 oder LaMnO_4 , als Fixiermittel eingesetzt. Os aus dem OsO_4 streut Elektronen und wirkt somit gleichzeitig als Kontrastmittel und erhöht den Probenkontrast. Weiters wirkt dieses Mittel auf Lipide. Es wird in einer Konzentration von 0,5 bis 2% in wässriger Lösung verwendet. Rutheniumtetroxid ist ungiftiger und billiger als Osmiumtetroxid und wird in niedrigerer Konzentration (0,1-%ig) eingesetzt. Permanganate fixieren Lipide und Phospholipide gut.

Manchmal wird bei der chemischen Fixierung auch ein dritter Schritt angefügt, die Fixierung mit Uranylacetat. Hierfür wird eine 0,5- bis 2-%ige Lösung gebraucht.

Als Fixiermedien werden Phosphatpuffer, wie zum Beispiel Natriumhydrogenphosphat (NaHPO_4) oder Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) in Konzentrationen von 0,01 bis 0,2 M angewendet. Weiters gibt es auch noch Cacodylat, das in Wasser zu einer 0,1 bis 0,2 M Lösung aufgelöst und mit HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wird. Als dritte Gruppe von Puffern zählen sich Zwitterionenpuffer.

Ein Fixiermedium muss aber nicht nur gepuffert sein, sondern es muss sich auch im osmotischen Gleichgewicht mit der Probe befinden, hierfür werden Saccharose oder neutrale Salze hinzugefügt.

Kryofixierung

Obwohl die chemische Fixierung einige Nachteile aufweist, wie zum Beispiel unterschiedlich schnelle Fixierung der Probenbestandteile oder langsamer Rückgang der Zellaktivität, was wiederum zu Artefakten durch Verschiebungen innerhalb der Zelle führt, wird sie im Vergleich zur Kryofixierung öfter angewendet.

Bei der Kryofixierung wird durch ultraschnelles Gefrieren erreicht, dass die gebildeten Eiskristalle kleiner als die Auflösungsgrenze des Mikroskops sind.

Methodische Vorgehensweise

Bei dieser Methode unterscheidet man fünf verschiedene Verfahren. Abbildung 8 zeigt diese schematisch auf:

a) Eintauchverfahren

Die Probe wird in ein Kryogen getaucht, das nahe seinem Gefrierpunkt in einem Bad aus flüssigem Stickstoff gehalten wird. Es bildet sich eine isolierende Hülle aus gasförmigem Stickstoff um die Probe herum, was die Gefriergeschwindigkeit dramatisch erniedrigt. Als Kryogen wird flüssiges Propan oder Freon verwendet. Freon (Frigen) ist der Handelsname für Difluordichlormethan (CF_2Cl_2) und ähnlichen halogenierten Kohlenwasserstoffen.³²

b) Sprühverfahren

Die Probe wird als Aerosol auf das Kryogen, zum Beispiel auf die Oberfläche von flüssigem Propan, gesprüht, das durch Evakuieren entfernt wird. Die gefrorene Probe erhält man als Pulver, das mit einem Kryo-Bindemittel, wie zum Beispiel Butylbenzin, in eine Paste überführt wird. Bei Temperaturen von flüssigem Stickstoff lässt man die Probe erstarren.

c) Gefrieren mit Propanstrahlen

Die Probe wird zwischen zwei wärmeleitenden Trägern gehalten und auf beiden Seiten mit flüssigem Propan bei -190°C besprüht, was den Wärmefluss und die Dicke der Probe erhöht.

d) Gefrieren mittels Metallspiegels („slam“-Frieren)

Die Probe wird schnell mit einer sehr kalten, polierten Metalloberfläche in Kontakt gebracht. Als Metall wird Kupfer bevorzugt verwendet.

e) Gefrieren unter hohem Druck

Die Probe wird ultraschnell eingefroren. Hierzu wird eine Stickstoffstrahl-Gefriermaschine, in der der Druck hydraulisch erzeugt wird, benötigt. Der Druck wird auf 2100 atm erhöht, dadurch wird der Gefrierpunkt des Wasser auf -22°C erniedrigt und das Wachstum von Eiskristallen größtenteils unterbunden.

Methodische Vorgehensweise

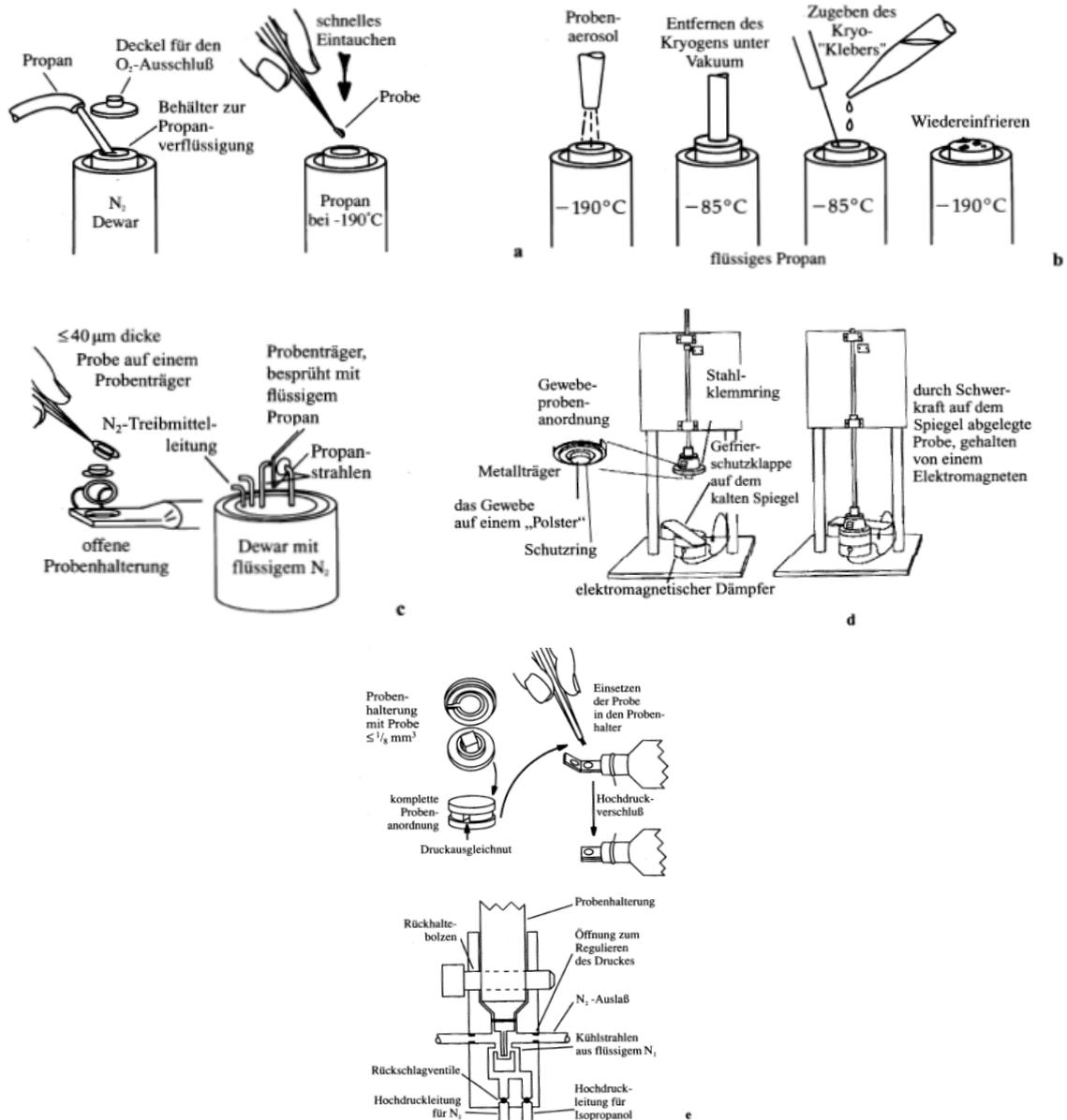


Abbildung 8: Kryofixierung

5 verschiedene Methoden: (a) Eintauchverfahren, (b) Sprühgefrieren, (c) Gefrieren mit Propanstrahlen, (d) Gefrieren mittels Metallspiegel, (e) Gefrieren unter hohem Druck

(Quelle: Flegler et al (1995). S.140.^[30])

Gefrierfixieren (für das Abdruckverfahren)

Als Gefrierschutzmittel wird Glycerol bzw. eine Mischung aus Glycerol und Glutaraldehyd eingesetzt. Wenn die Probe geätzt wird, darf kein Glycerol eingesetzt werden. Man unterscheidet drei Arten: Beim Eintauchverfahren werden kleine Goldscheibchen mit einer erhöhten Probenstützwand als Probenträger verwendet, man kann aber auch Kupfer dafür verwenden. Die Probe wird in das Kryogen eingetaucht. Beim Einfrieren im Propanstrahl werden ebenfalls ähnliche dünne

Kupferträger eingesetzt. Das Einfrieren mittels eines Metallblockes geschieht durch Träger, die aus Kupfer oder Aluminium gefertigt sind.

Aufbewahrung

Die Probe wird unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Oft ist aber zu beanstanden, dass die Probe nach anhaltender Lagerung unter flüssigem Stickstoff brüchig wird. Es können nach der Fixierung zwei Methoden verwendet werden, um das Objekt zu präparieren, entweder der Oberflächenabdruck (Gefrierbruch, -ätzung) oder die Herstellung von Ultradünnschnitten.

Ultradünnschicht-Methode:

Entwässern

Das Wasser, das die Probe beinhaltet, wird stufenweise durch Lösungsmittel ersetzt. Hierfür wird meistens Ethanol oder Aceton verwendet, aber die Entwässerung kann auch mit Hemiacetalen (2,2-Dimethoxypropan und 2,2-Diethoxypropan) durchgeführt werden.³⁰ Auch Propanol findet manchmal Verwendung.¹⁷

Die Probe wird dabei in eine konzentrationszunehmende Reihe von Lösungsmitteln (meistens mit der Steigerung von 25%, bei empfindlichen Proben in 10%-Schritten) überführt. Danach empfiehlt es sich, zwei bis drei Mal mit wasserfreiem Lösungsmittel zu waschen, um Reste von Wasser vollständig zu entfernen.³⁰

Gefriersubstitution

Bei diesem Verfahren werden die chemische Fixierung und die Entwässerung in einem Schritt durchgeführt.³⁰ Es wird Wasser allmählich durch Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar und bei der infragekommenden Temperatur (-70 bis -100°C) noch flüssig sind, ausgetauscht. Hierfür verwendet man Butylbenzol, Toluol oder Dioxan, wobei Dioxan das beliebteste von den drei erwähnten Substanzen ist. Es ist außerdem auch ratsam, Dioxan zu verwenden, wenn danach eine Gefrierätzung folgt.¹⁷

Tränken mit Kunstharz und Einbetten

Als Einbettungsmaterialien werden oft Epoxyharzmischungen verwendet. Die weit verbreitetsten Epoxidharze sind Epon 812, Araldit und Vinylcyclohexandioxid (VCD). Diese werden mit einem Vernetzer, wie zum Beispiel dem Dianhydrid einer

Methodische Vorgehensweise

organischen Säure (Dodeceny succinicanhydrid = DDSA, Nadicmethylanhydrid = NMA, Nonenylsuccinicanhydrid = NSA), einem Weichmacher (Dibutylphtalat, Epoxydiglycidylether des Polypropylenglykols = DER736) und einem Beschleuniger (2-Methylaminoethanol = S-1, Dimethylaminomethylphenol = DMP-30) vermischt.

Bei immunocytochemischen Reaktionen, wie zum Beispiel bei Markieren von Antikörpern mit Gold, sind Methacrylate von Bedeutung. Hierzu gehören Lowicryl – Harz (K4M und HM 20) und London Resin (LR) – Harz.

Nachdem die Probe vollständig in Harz überführt wurde, ist es von Vorteil, sie noch ein bis drei Mal vollständig mit Einbettungsmaterial zu tränken, damit die Probe vollständig mit diesem gefüllt ist und alle Lösungsmittelsuren entfernt werden.

Ultramikrotomie

Ein Ultramikrotom bewegt den Probenblock auf bzw. über die Schneide eines scharfen Messers.³⁰ Bei Proben mit weicher Konsistenz und hohem Wassergehalt (über 90%) stellt dieser Schritt ein Problem dar, weil sich diese Proben nicht ultradünn schneiden lassen, und weil die Hochvakuumbehandlung nicht ohne sehr starke Veränderungen überstanden werden kann. Eine Alternative für diese Objekte stellen die Druckkammer („environmental chamber“) oder die Verwendung von tiefgekühlten, gefrorenen Proben dar.¹⁷

Kontrastverbesserung

Nachdem die Proben auf die Netze aufgebracht werden, werden die Schnitte mit elektronendichten Kontrastierungsmitteln, meistens einem Schwermetallsalz, behandelt. Zuerst werden die Schnitte mit 1-%iger wässrigen oder alkoholischen Uranylacetat - Lösung behandelt. Als Kontrastierungsmittel findet auch Bleicitrat Verwendung, dieser Schritt kann auch der Methode mit Uranylacetat angeschlossen werden. Neben diesen zwei Kontrastierungsmitteln können auch Rutheniumverbindungen eingesetzt werden. Anschließend wird mit schwacher NaOH-Lösung gewaschen und mehrmals gespült, um alle Reste vom Kontrastierungsmittel zu entfernen.³⁰

Oberflächenabdruck: Gefrierbruch und Gefrierätzung:

Gefrierbruch

Nach der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff kommen die Proben in die Gefrierbruchmaschine.³⁰ Der Gefrierbruch wird bei -100°C im Hochvakuum durchgeführt. Man unterscheidet zwei verschiedene Verfahren. Entweder wird das Objekt in einen Metallhalter eingespannt und „wirklich gebrochen“, beim anderen Verfahren wird die Probe mit Hilfe einer Klinge „geschnitten“, wobei „geschnitten“ nicht ganz richtig ist, weil das gefrorene Material auf Grund der mangelnden Elastizität in Wirklichkeit gebrochen wird.¹⁷

Gefrierätzen

Das Gefrierätzen kann dem Gefrierbruch angeschlossen werden. Hierbei wird die Bruchfläche für kurze Zeit durch Sublimation des Gewebewassers geätzt.¹⁷ Der Probenstisch wird auf eine Temperatur über der von flüssigen Stickstoff (-196°C), aber unterhalb der Rekristallisationstemperatur von Eis (-80°C) aufgeheizt.³⁰ Für eine reine Eisoberfläche bei -100°C wählt man eine Geschwindigkeit von zwei nm pro Sekunde.³³

Bedampfung (Schwermetall)

Für die Bedampfung wird als Schwermetall meistens Platin verwendet.³⁰ Feinkörnige Niederschläge erreicht man durch thermische Mischverdampfung von Platin und Kohle oder durch Verwendung hochschmelzender Metalle, wie zum Beispiel Wolfram, die in einem Elektronenstoßverdampfer verarbeitet werden können.¹⁷

Ablösen der Oberflächenschicht

Die Probe wird der Vakuumkammer entnommen, und der Oberflächenabdruck wird auf die Oberfläche eines Wasserbades abgeflottet, gewaschen und auf das Netz gebracht.

Immunologisches Verfahren

Dieses Verfahren kann sowohl bei Oberflächenabdrücken als auch bei Schnitten oder bei Kombinationen der beiden angewendet werden. Bei diesem Verfahren wird Kolloidgold verwendet, das an sekundäre Antikörper oder Protein-A, einem bakteriell

hergestellten Polypeptid, gekoppelt ist. Ausgewertet wird diese Methode durch das Prinzip, dass Protein-A an Antikörper bindet.

Kolloidgold kann direkt an die Antikörper oder an Sekundärantikörper gebunden werden. Protein-A wird mit Gold markiert und an die Antikörper gebunden.

Beim Markierungsverfahren werden die nicht spezifischen Bindungsstellen auf der Probe blockiert, hierfür verwendet man gepuffertes Ovalbumin. Dann gibt man die Antikörper auf die Oberfläche. Nach der Antigen-Antikörper-Reaktion werden die Schnitte oder die Probenoberfläche mit Pufferlösung gewaschen, und man lässt mit der Protein-A-Gold- oder Sekundärantikörper-Gold-Lösung reagieren.³⁰

Negative Straining:

Mit dieser Methode kann der Kontrast einer elektronentransparenten Probe verbessert werden. Es wird die Umgebung des Objekts mit einer Verbindung getränkt, die Elektronen stark streut. Als Negativkontrastierungsmittel wird oft Uranylacetat (0,5-%ige gesättigte wässrige Lösung)³⁰ oder Uranylacetat in einer 1-%igen wässrigen oder alkoholischen Lösung verwendet, aber auch Phosphorwolframsäure oder Siliciumwolframsäure liefern gute Ergebnisse.¹⁷ Ein weiteres Negativkontrastierungsmittel ist Phosphorwolframsäure, von dem das Natriumsalz bei einem pH-Wert von 6 bis 8 und einer Konzentration von 0,5 bis 2% in Wasser verwendet wird. Ammoniummolybdat wirkt in einer 1- bis 2-%igen Lösung bei einem pH-Wert von 7 bis 7,4.

Zum Negativkontrastieren gibt es drei Verfahren. Bei der Tropfenmethode wird die Probe auf das Netz gebracht, und mit einem Filterpapier wird der größte Teil der Probe aufgenommen. Danach gibt man einen Tropfen des Negativkontrastierungsmittel dazu, lässt 30 Sekunden einwirken und nimmt die überstehende Flüssigkeit dann von der Seite mit Filterpapier wieder auf. Die Alternative dazu ist, das Netz auf die Probe zu geben und Netz und Probe dann auf das Negativkontrastierungsmittel zu legen. Das dritte Verfahren ist das Sprühverfahren, wo die Probe mit dem Negativkontrastierungsmittel in gleichem Verhältnis gemischt wird und auf das Netz gesprüht wird.³⁰

Als Ergänzung soll noch die Elektronenenergieverlustspektrometrie (EELS: electron energy loss spectrometry) erwähnt werden, bei der der spezifische Energieverlust

inelastisch gestreuter Elektronen ausgewertet wird, um streuende Atome oder Bindungsarten auszuwerten.

3.2 Präparation für REM

Allgemein kann gesagt werden, dass die Probenpräparation für die REM viel einfacher ist als die der TEM, weil nicht Schnitte, sondern ganze Proben untersucht werden. Diese Proben müssen aber frei von Wasser, Lösungsmitteln oder anderen Substanzen sein, die im Vakuum gasen, die Säule verunreinigen oder Vakuump Probleme verursachen können.

In der Abbildung 9 sieht man die Schritte der REM, die im Normalfall angewendet werden. Nach Fixierung der Probe wird diese entwässert, dann am kritischen Punkt getrocknet, anschließend montiert und beschichtet. Danach gibt es zwei große Verfahren, das Oberflächenabdruckverfahren und die Kryo-REM.

Nach der Erklärung dieser zwei Methoden werden auch Präparationen vorgeschlagen, die von diesem Grundschema abweichen.

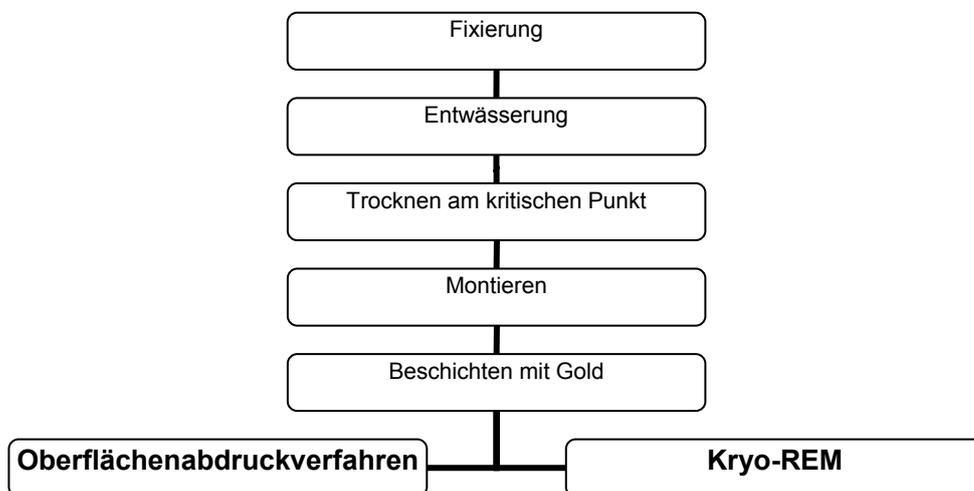


Abbildung 9: Verschiedene Methoden der Präparation bei der REM

Fixierung

Den Fixiertechniken bei der REM gleichen die der TEM mit dem Unterschied, dass die Proben für die REM gereinigt werden müssen. Außerdem reicht oft die Primärfixierung aus, wobei die Sekundärfixierung mit Osmiumtetroxid (OsO_4) häufig eventuelle Aufladungsprobleme verringert.³⁰

Methodische Vorgehensweise

Zu den formunbeständigsten Objekten gehören Gele und Emulsionen. Diese enthalten viel Wasser, und speziell bei wasserhaltigen Objekten führt eine einfache Trocknung zu einer starken Veränderung der Struktur. Manchmal kann man durch Aufbringen einer leitenden Oberflächenschicht die Untersuchung in einem Rasterelektronenmikroskop für beschränkte Zeit ermöglichen, bevor die Austrocknung im Vakuum die Struktur verändert.³⁴ In der Regel ist es aber so, dass man wasserhaltige Proben vor der Untersuchung mittels REM entwässern und trocknen muss. Damit das Objekt, das man untersuchen will, die Vorgänge möglichst unverändert übersteht, müssen die Proben vorher chemisch oder physikalisch fixiert werden.

Fixieren kann man entweder in Lösungen oder im Dampf. Für die Fixierung in Lösung sind 1-%iger OsO_4 -Lösung, Glutaraldehyd (0,1- bis 6,5-%ig) oder 10-%iger Formaldehyd geeignet, wobei Glutaraldehyd am liebsten angewendet wird, weil er der Probe Festigkeit verleiht, ohne dabei selbst koagulierend zu wirken.¹⁷ Proben, die in Glutaraldehyd fixiert werden, kann man mehrere Monate darin lagern.³⁵

Nach der Fixierung in Aldehyd und dem Auswaschen in isotonischer Pufferlösung erfolgt meistens eine Nachfixierung, damit man sicher gehen kann, dass die Proben das darauffolgende Entwässern und die Trocknung ohne größere Schäden überstehen. Für die Nachfixierung wird OsO_4 -Lösung (1-%ig), Sublimat (0,2-%ig) oder KMnO_4 (2-%ig) gewählt. Danach wird die Probe mit destilliertem Wasser gewaschen, um Reste der Fixierlösung zu entfernen. Die Fixierdauer ist von der Beschaffenheit der Probe abhängig.

Trockene Proben werden mittels der Technik der Fixierung im Dampf durch Imprägnieren mit dampfförmigen Fixantien stabilisiert. Als solche eignen sich Formalin- oder OsO_4 -Dämpfe.¹⁷

Entwässerung

Als Lösungsmittel eignen sich Ethanol und Aceton hervorragend. Ethanol hat den Vorteil der geringeren Toxizität und des geringeren Dampfdrucks. In der Regel werden große Abstufungen im Wasser verwendet. Die Probe wird mit diesen Lösungsmitteln entwässert, da das, in den Fixier- und Pufferlösungen enthaltene, Wasser sich nicht mit dem flüssigen CO_2 mischt, das beim Trocknen am kritischen Punkt verwendet wird. Zum Schluss wird die Probe mit 100-%igem Lösungsmittel gespült, damit alle Reste von Wasser entfernt werden.³⁰

CP-Trocknung (Trocknung nach der Critical-Point-Methode)

Der kritische Punkt ist durch die kritische Temperatur und dem kritischen Druck der Probe charakterisiert. Trocknet man Teilchen aus einer Suspension durch Abtrocknen der Flüssigkeit, entfaltet die Oberflächenspannung ihre deformierenden Kräfte, sobald die Teilchen aus der Flüssigkeit herausragen. Dies wird vermieden, indem man das Präparat aus der flüssigen in die gasförmige Phase eines Mediums unter Umgehung des kritischen Punktes der Flüssigkeit übertreten lässt. Für den CP-Trocknungsvorgang sind CO₂, Freon 12 oder N₂O als Trocknungsmedium geeignet. Das Wasser der Probe wird somit durch die flüssige Phase des Trocknungsmediums ersetzt.¹⁷ Dazu braucht man noch ein Austauschmedium, hierzu wird Aceton verwendet.³⁶

Das Trocknen am kritischen Punkt kann man in drei Phasen unterteilen. Es beginnt mit dem Abkühlen der Metallkammer auf 5-10°C. Die Proben werden in die Kammer eingelegt, und sie wird mit einem Deckel verschlossen. Dann wird die Kammer mit flüssigem CO₂ gefüllt, und in der Kammer bildet sich ein Gemisch aus Lösungsmittel und flüssigem CO₂. Da man nur flüssiges CO₂ in der Kammer haben will, öffnet man Auslass- und Einlassventil für kurze Zeit, um die Kammer zu „spülen“. Der zweite Schritt ist die Aufheizphase, wo die Dichte der Flüssigkeit abnimmt bzw. die der Gasphase zunimmt, da es sich ja um ein geschlossenes System handelt. Beim kritischen Punkt wird die Dichte der flüssigen Phase gleich der der Gasphase, das heißt, dass die Probe in einem sehr dichten Gas gehalten wird. Sie ist dabei trocken und unverzerrt, da am kritischen Punkt keine Oberflächenspannung vorherrscht. Die letzte Phase, die Entspannungsphase, beginnt nach Erreichen der gewünschten Temperatur und des gewünschten Druckes. Das Auslassventil wird geöffnet, und man lässt den Druck langsam auf Null abfallen.³⁰

Montieren

Die meisten Proben werden auf eine Metallhalterung aus Aluminium montiert. Dazu werden Kleber oder Kleberfolien benutzt. Als Kleber sind schnell trocknende Epoxydharze am verbreitetsten, weil diese stabil gegenüber Stahl, viskos und schnell trocknend sind, außerdem gasen sie nur minimal aus und haben eine gute mechanische Festigkeit.³⁰ Als Kleber kann eine Emulsion aus Kupfer, kolloidalem Silber oder Ruß/Grafit zum Einsatz gelangen.¹⁷

Beschichten mit Gold

Für die REM müssen die Proben elektrisch leitend sein. Nichtleitende REM-Proben werden mit einer dünnen Metallschicht versehen, um die Oberfläche leitend zu machen und eine negative Aufladung zu verhindern. Hierfür wird Gold in einem Kathodenzerstäuber auf die Probe bedampft. Dieser Goldüberzug besteht aus lauter Partikeln, die kleiner als 3 nm im Durchmesser und dadurch kleiner als die Auflösung der meisten Rasterelektronenmikroskope sind.³⁰ Es finden auch Palladium, Platin und Silber Verwendung.³⁴

Die Alternative ist eine Doppelbedampfung, wo die Probe zuerst mit Kohle bedampft wird, um eine leitende Unterlage zu schaffen und danach mit Metall (Al, Cu, Au, Au-Pd, Pt-Pd) bzw. Pt-C- Mischungen eine zweite Bedampfung durchgeführt wird.³⁷

Proben, die mit rückgestreuten Elektronen oder mittels Röntgenmikroanalyse untersucht werden sollen, dürfen nicht mit einem Schwermetall wie Gold überzogen werden, da es die Unterschiede in den Ordnungszahlen für die rückgestreuten Elektronen überdeckt und Röntgenstrahlung aus der Probe absorbiert. Stattdessen wird in diesem Fall mit Kohlenstoff beschichtet.³⁰

Oberflächenabdruckverfahren:

Wenn die Probe zu groß ist oder nicht in kleinere Stücke zerteilt werden kann, so kann man das Verfahren des Oberflächenabdrucks verwenden. Hier wird ein negativer Oberflächenabdruck der Probe gemacht, der mit Epoxydharz gefüllt wird. Das Harz härtet aus und bildet den positiven Oberflächenabdruck, der dann montiert, beschichtet und im REM untersucht wird.³⁰

Kryo-REM:

Manche Proben können nicht chemisch fixiert werden, wie zum Beispiel Öle, Fette und Nahrungsmittel wie Eis und Milch. Diese Proben würden die REM-Säule verunreinigen und Probleme in Bezug mit Vakuum verursachen. Außerdem wirkt sich die chemische Fixierung oft schädlich auf die Probe aus.

Die Probe wird bei -130°C (oder niedriger) in der REM-Kammer gehalten, sodass kein Wasser oder andere organische Substanzen verdampfen können. In diesem gefrorenen Zustand werden zwei Komponenten für die Untersuchung gebraucht: Auf der einen Seite eine Präparationseinheit, die das Gefrieren und Beschichten der

Probe erlaubt, auf der anderen Seite eine Einrichtung, die die Probe während der Untersuchung gefroren hält.

Alternativen:

Luftrocknen

Hier wird die Probe einfach an der Luft getrocknet, montiert und mit einem Metall überzogen.

Trocknen aus einem Lösungsmittel

Bei der Trocknung wird das, in der Probe enthaltende, Wasser schrittweise durch Flüssigkeiten wie Alkohol, Propylenoxid oder Aceton ersetzt. Nachdem das Objekt vollständig mit Dehydrierungsmedium getränkt wurde, kann man dieses verdunsten lassen oder einen Zwischenschritt einbauen, indem man das Objekt zum Beispiel aus 100-%igem Alkohol schrittweise in eine Flüssigkeit mit geringerer Oberflächenspannung, wie Ether, überführt.

Da aber diese Methode den Nachteil besitzt, dass bei der Eintrocknung dieser Flüssigkeiten noch Oberflächenspannungskräfte auftreten können, ist die Kritische-Punkt-Methode für die Trocknung besser geeignet. Diese bietet nämlich eine optimale Strukturierung.¹⁷

Fixieren im Dampf

Die Probe wird in einen geschlossenen Behälter mit einer kleinen Menge wässrigen Osmiumtetroxids (1- bis 4-%ig) eingebracht, und durch die Dämpfe, die mit der Probenoberfläche reagieren, wird die Probe fixiert, gehärtet und stabilisiert. Danach wird die Probe aus dem Behälter genommen, an der Luft getrocknet, montiert und beschichtet.

Vorfixieren in Dämpfen

Die Probe wird mit OsO₄-Dampf vorfixiert, dann mit Glutaraldehyd fixiert, entwässert, am kritischen Punkt getrocknet, montiert und beschichtet.

Gefrierfixation und Gefriertrocknung

Die Proben werden durch schockartiges Gefrieren fixiert. Das Eis sublimiert bei tiefer Temperatur im Hochvakuum unter Umgehung der flüssigen Phase. Vorteil dieser Methode ist, dass bei der Dehydration keine Schrumpfungen auftreten.

Die Methode kann mit oder ohne Fixierung angewendet werden. Eine Vorfixierung in Glutaraldehyd und eine Nachfixierung sind aber sinnvoll, weil sie der Probe eine höhere Festigkeit verleihen und die Probe vor dem Einfrieren sorgfältig mit bidestilliertem Wasser gewaschen werden kann.³⁸

Bei der Gefrierfixation ist es entscheidend, das Objekt schnell abzukühlen, um Schäden durch Eiskristallbildung möglichst klein zu halten. Bei geringen Abkühlungsraten kommt es vorwiegend interzellulär zur Bildung von Eiskristallen, wodurch den Zellen Wasser entzogen wird, was zu einem Anstieg der Salzkonzentration und damit zu einer Gefrierpunktserniedrigung im Zellinneren führt. Die Folge sind Verlagerungen, Schrumpfungen und Risse im Gewebe. Bei höherer Abkühlungsgeschwindigkeit werden die Eiskristalle kleiner, häufiger und entstehen intrazellulär, was eine Beschädigung der Zellstrukturen zur Folge hat. Daher ist es notwendig, die Probe innerhalb von Millisekunden unter -140°C abzukühlen. Als Kühlmittel haben sich Propan, Isopropan und Frigen12 bewährt, die mit flüssigem Stickstoff auf -140°C (Propan), -160°C (Isopropan) bzw. -158°C (Frigen12) gebracht werden. Ebenfalls verwendet man Chemikalien wie DMSO (Dimethylsulfoxid), Glycerin oder Gelatine, um das Wachstum von Eiskristallen zu reduzieren.³⁷ Auch Chloroform (2-%ig) kann verwendet werden.³⁹

Nach dem Einfrieren darf die Temperatur höchstens auf -80°C ansteigen, da sonst eine Rekristallisation des Eises einsetzt, was Schädigungen hervorruft. Die Probe wird aus dem Kühlmittel genommen und in die Gefriertrocknungsanlage gebracht, wo die vom Eis absublimierten Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe des Präparats entweder an einem, mit flüssigem Stickstoff oder einem Gemisch aus Trockeneis und Aceton gekühlten, Kühlfinger kondensieren oder von Phosphorpentoxid aufgenommen werden.

Als Alternativmethode zu der konventionellen Gefriertrocknung kann auch folgende Technik angewendet werden: Zuerst erfolgt eine Trocknungsphase mit Sublimation der Oberfläche bei -80°C , danach eine Resttrocknung bei -20°C .³⁷

Methodische Vorgehensweise

Als weitere Alternative kann die vorgeschlagene Gefriertrocknung auch aus organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Amylacetat, passieren.³⁹

Kryostat-Präparation

Die Probe wird als Ganzes in ein Kryostat eingebracht, dann eingefroren und anschließend geschnitten. Den Schnitt kann man an einer gewünschten Stelle im Präparat ausführen, und er gelingt meist sehr präzise und sauber. Danach wird das Präparat zum Auftauen in eine Pufferlösung gegeben, in einem Lösungsmittel entwässert, am kritischen Punkt getrocknet, montiert und beschichtet.

Gefrierbruch

Nach Fixierung und Entwässerung werden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und danach mit einer gekühlten Rasierklinge geschnitten. Die Technik heißt Gefrierbruch, weil die Klinge die Probe nicht schneidet, sondern sie bricht.

Einbetten in Harz

Man kann die Probe auch nach dem Fixieren in ein Epoxydharz einbetten, so wie dies bei der Präparation für TEM Usus ist. Danach werden die Proben in ein Ultramikrotom eingebracht, eins bis vier μm dicke Schnitte angefertigt, in Ethanol oder Aceton ausgewaschen, am kritischen Punkt getrocknet, montiert und beschichtet.

Immunozytochemisches Verfahren

Oberflächenzielmoleküle, wie zum Beispiel Antigene, Lektine oder Enzymsubstrate, werden mit spezifischen Identifikationsmolekülen, wie Antikörpern, Polysacchariden oder Enzymen, lokalisiert. An den Identifikationsmolekülen sind Stoffe wie Gold oder Latexkugeln gebunden.³⁰

Raster-Transmissionselektronenmikroskopie:

Ein Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM: scanning transmission electron microscopy) ist ein Elektronenmikroskop, mit dem Dünnschnitte und andere Proben in einem Abtastmodus untersucht werden können. Es stellt eine Kombination von REM und TEM dar. Die einfallenden Elektronen durchstrahlen die Probe nicht im Abbildungs- oder Scheinwerfermodus, wie das bei der TEM der Fall ist, sondern

werden als Sonde benutzt und tasten die Probe in derselben Weise wie in der REM ab.

Im Vergleich zur TEM bietet das Raster-Transmissionselektronenmikroskop den Vorteil, dass Proben nicht so dünn geschnitten werden müssen¹⁶, die Probendicke liegt zwischen 100 nm und 1 µm.³⁰

3.3 Präparation für CLSM

Zum Scannen der Oberfläche der Probe kommen zwei verschiedene Verfahren zur Anwendung, entweder wird das Objekt durch einen Piezo-Positionierer bewegt, oder es wird eine Nipkow-Scheibe – das ist eine rotierende Lochscheibe – angewendet, die die Probe punktförmig beleuchtet.⁴⁰

Harte Proben werden oft geschnitten oder geschliffen, damit diese nicht die Objektlinse zerkratzen können. Wenn Objekte mit einem Deckglas versehen werden, das einen anderen Brechungsindex wie die Probe oder das Medium vor dem Objektiv (Luft) hat, werden dicke Deckgläser und nicht die Standard-Deckgläser mit 0,17 mm Dicke eingesetzt.⁴¹

Bei der Technik des Negativ-Kontrasts werden kleine, isolierte, nicht fluoreszierende Proben mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop visualisiert, indem man die Probe in ein Medium mit einer fluoreszierenden Lösung gibt.⁴² Solche Färbemittel sind zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Acridin Orange (Detektion bei 500 nm), Cy5 (Detektion bei 630 nm), Phycocyanin (Detektion bei 630 nm), Nile Red, Nile Blue,...⁵¹

Abhängig vom Untersuchungsziel werden spezielle Färbemitteln, Detektoren und Laser verwendet.⁴²

3.4 Präparation für RKM

Bei der RKM wird die Oberfläche von ganzen, nicht geschnittenen Proben von einer feinen, mechanischen Sonde abgetastet. Die Probe wird auf einer piezoelektrischen Positionseinrichtung angebracht und bewegt. Auf einem dreieckigen Stück Metallfolie, dem Ausleger, ist eine sehr feine Spitze angebracht. Die Variation der Anziehungskräfte zwischen Bahnelektronen der Spitze und denen der Probe bewirkt eine Bewegung der Folie, die wiederum eine Stromänderung in der Fotodiode hervorruft. Ein Laserstrahl wird auf die Folie gerichtet, und der reflektierte Laserstrahl

wird mit Fotodioden nachgewiesen. Bei dieser Stromänderung wird ein Bild auf einer Kathodenstrahlröhre erzeugt.³⁰

Bei der Kraftmikroskopie existieren zwei verschiedene Betriebsarten: Während die ersten Rasterkraftmikroskope ausschließlich im Kontakt-Modus arbeiteten, ist mittlerweile der Nicht-Kontakt-Modus ebenfalls etabliert. Beim Kontakt-Modus (statische AFM) befindet sich die Spitze in mechanischem Kontakt zur Probenoberfläche, beim Nicht-Kontakt-Modus (dynamische AFM) hingegen schwebt die Spitze über der Probe. Ein Hybrid von beiden stellt der sogenannte intermittierende Modus dar, bei der die Spitze während jeder Schwingungsperiode einmal kurz die Oberfläche berührt.¹¹ Diese Methode findet man in der Literatur auch unter dem Begriff „Tapping-Modus“⁴³. Die Vorteile des Nicht-Kontakt-Modus sind, dass die Spitze nicht abgenutzt und die Probe nicht beschädigt wird, außerdem sind schnelle Übersichtsaufnahmen damit möglich. Der Nachteil ist die geringere laterale Auflösung im Vergleich zur Kontakt-Methode.⁴⁴

Die Probenpräparation ist nicht aufwendig, doch man muss darauf achten, dass keine Fingerabdrücke oder Staub von der Umgebung die Probe kontaminieren. Trockene Proben werden an einen Probenhalter (Metalltisch) angeklebt.

Eine andere Methode der Probenvorbereitung ist das Einlegen in Lösungen.^{45, 46} Hier kann man das Objekt, das sich in einer Petrischale in einer Flüssigkeit befindet, direkt verwendet. Wichtig dabei ist, die Temperatur der Lösung zu beachten.⁴⁷ Die Messnadel ist nämlich auf Temperaturänderungen extrem empfindlich. Nachteil dieser Methode ist, dass man nachher alle Teile reinigen muss, die mit der Lösung in Kontakt waren, damit man Kontaminationen und Verunreinigungen bei weiteren Analysen vermeidet.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Vorgehensweise bei Lebensmitteln: Vergleich von unterschiedlichen Techniken

In diesem Kapitel werden zuerst Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten von Mikroskopen in Bezug auf physikalische Parameter, technische Details,... erklärt. Der zweite Teil handelt von den unterschiedlichen Einsatzgebieten dieser Techniken im Nahrungsmittelsektor.

Allgemein kann gesagt werden, dass die Wahl der besten Methode von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Eigenschaften der Probe, Größe der Probe, Ausstattung des Labors, Auflösung des Geräts, Ziel der Untersuchung, ... abhängig ist, und dass es besser ist, sich nicht nur auf eine Technik zu stützen, sondern mehrere anzuwenden, um Vergleiche anstellen zu können.

Die besprochenen Techniken werden sowohl für eine qualitative Beschreibung der Probe, als auch für eine Analyse der Verteilung der Bestandteile im Lebensmittel genutzt. Man kann mit den genannten Methoden somit auch zeigen, wie Bestandteile sich gegenseitig beeinflussen können, sowohl in positiver, als auch in negativer Hinsicht.

4.1.1 Auflösungsvermögen

Den Unterschied im Auflösungsvermögen von Licht-, Transmissions-, Rasterelektronen-, konfokaler Laser-Raster-, Rasterkraft-, Polarisationslichtmikroskopie und Magnetresonanztomografie bringt die Tabelle 6 zum Ausdruck.

Ergebnisse

Tabelle 6: Auflösungsvermögen von verschiedenen Techniken

Technik	Auflösungsvermögen
Lichtmikroskopie	200 nm ^[a]
Transmissionsmikroskopie	0,2 – 0,3 nm ^[a] , bis 0,1 nm ^[g]
Rasterelektronenmikroskopie	50 – 200 Å ^[b] ≡ 3-20 nm
Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	bis 0,25 µm ^[c] bzw. 0,2 µm ^[g]
Rasterkraftmikroskopie	2-10 nm ^[f] , bis 0,1 nm ^[d]
Magnetresonanztomografie	bis 0,1 nm ^[e]
Polarisationslichtmikroskopie	bis 0,1 µm ^[h]

(Quelle:

^[a] Lange, R. H. und Blödorn, J. (1981). Das Elektronenmikroskop TEM+REM. Thieme. Seite 1.^[17]

^[b] Reimer, L. und Pfefferkorn, G. (1973). Raster-Elektronenmikroskopie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Seite 3.^[37]

^[c] Flegler, S. L., Heckman, J. W. und Klomparens, K. L. (1995). Elektronenmikroskopie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford. Seite 120.^[30]

^[d] http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=968943179&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=968943179.pdf ^[48]

^[e] <http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Olaf.Anhenn/CLSM.htm> ^[19]

^[f] http://www.veeco.com/pdfs/appnotes/AN48r2_SPM_AFM_278.pdf ^[49]

^[g] Paddock, S. W (1999). Confocal Microscopy Methods and Protocols. Humana Press Totowa, New Jersey, S. 1. ^[50]

^[h] Rao, M. A. und Hartel, R. W. (1998). Phase/State Transitions in Foods. Marcel Dekker, Inc. Seite 202-206. ^[171]

Natürlich stellen die Werte für das Auflösungsvermögen der einzelnen Geräte nur Richtwerte dar, da die Auflösung von vielen physikalischen Parametern und Einflussfaktoren abhängig ist.

Aus der Tabelle geht aber hervor, dass das Auflösungsvermögen von REM nur um circa eine Zehnerpotenz besser als das der Lichtmikroskopie und um etwas mehr als einer Zehnerpotenz schlechter als das der Transmissionselektronenmikroskopie ist.³⁴

Die Auflösung bei der TEM ist durch Präparation und Bestrahlung auf 0,1 nm begrenzt. Beim Rasterelektronenmikroskop ist die verbesserte Tiefenschärfe für die guten Aufnahmen verantwortlich¹⁷, bei einem Lichtmikroskop nimmt die Schärfentiefe bei zunehmender Vergrößerung stark ab.³⁴

Ergebnisse

Zwei weitere Verfahren kommen im Kontext mit TEM, REM, RKM und CLSM immer wieder vor, das sind Magnetresonanztomografie und Polarisationslichtmikroskopie. Auf diese Verfahren wird aber im Laufe der Arbeit nicht eingegangen, weil die Magnetresonanztomografie im Vergleich zur Licht- oder Elektronenmikroskopie zwar eine sehr gute Auflösung besitzt⁵¹, jedoch für das Forschungsziel dieser Arbeit schon zu weit in den molekularen Bereich reicht und im Lebensmittelbereich für Zwecke wie Analyse von Bewegungen und Verteilungen⁵² von Komponenten und nicht für die Untersuchung von Textur und Struktur brauchbar ist. Für die Herstellung von anatomischen Schnitten von Menschen und Tieren⁵³ ist die Magnetresonanztomografie sehr beliebt und findet in diesem Gebiet wohl die größte Anwendung.

Auch die Polarisationslichtmikroskopie wird im Lebensmittelbereich bei der Strukturaufklärung nicht häufig eingesetzt, weil die Vergrößerung oft nicht ausreicht, um bestimmte Teile zu visualisieren und man mit den anderen erwähnten Techniken Details von kleinerer Größe auflösen kann¹⁷¹.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass man mit der CLSM und Elektronenmikroskopie den molekularen bzw. submolekularen Bereich untersucht und die RKM und die Magnetresonanztomografie hingegen den atomaren und molekularen Level abdecken⁵⁴.

4.1.2 Probengröße und -dicke

In der Tabelle 7 wird die Probengröße und die Probendicke für die verschiedenen Methoden behandelt.

Tabelle 7: Probengröße bzw -dicke bei verschiedenen Methoden

Methode	Probengröße / Probendicke
REM	3mm x 8 mm ^[a]
TEM	100 nm ^[a]
CLSM	-
RKM	-

(Quelle:

^[a] Flegler, S. L., Heckman, J. W. und Klomprens, K. L. (1995). Elektronenmikroskopie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford.^[30])

Anm.: - ... kein Schneiden notwendig

Ergebnisse

Für die Transmissionselektronenmikroskopie ist die Präparation der Probe ziemlich schwer, weil für diese Methode eine Probengröße bzw. – dicke von 100 nm erforderlich ist.

Bei der CLSM und RKM ist keine bestimmte Probendicke bzw –größe notwendig, was einen großen Vorteil bezüglich Präparation bringt. Die RKM schafft eine hohe Vergrößerung bei großer Auflösung mit kurzen Probenvorbereitungen^{55,56}, was sie sehr beliebt macht. Darauf wird aber in den weiteren Kapiteln noch näher eingegangen.

4.1.3 REM vs. RKM

Den Vergleich zwischen REM und RKM zeigt die nachfolgende Tabelle. Wie man daraus erkennen kann, ist RKM vor allem für die Analyse von dreidimensionalen Strukturen geeignet.

Ergebnisse

Tabelle 8: Unterschiede zwischen REM und RKM

Charakteristiken der Probe	REM	RKM
Präparation ^[a]	aufwendig	leicht
Probenbeschaffenheit ^[a]	vakuumentauglich	„normal“, eventuell Größenveränderung
Arbeitsumgebung ^[a]	Vakuum	trocken, flüssig, Vakuum
Analyse ^[a]	Oberflächenanalyse	Oberflächenanalyse
Fokustiefe ^[a]	klein	klein
Tiefenschärfe ^[a]	groß	mittel
Auflösung (xy-Achse) ^[a]	5 nm	0,1 – 1 nm
Auflösung (z-Achse) ^[a]	-	0,01 nm
Vergrößerung ^[a]	$1 * 10^7$	$5 * 10^2 - 10^8$
Bild ^[b]	2-dimensional	3-dimensional
Schnelligkeit des Verfahrens ^[b]	schnell	langsam

(Quelle:

^[a] Braga, P.C. und Ricci, D. (2004). **Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Application.** Humana Press Inc.. Seite 181.^[10]

^[b] Lapshin, R. V. (2004). **Feature-oriented scanning methodology for probe microscopy and nanotechnology.** Nanotechnology, Vol. 15, iss. 9. S. 1135-1151.^[57]

Lapshin, R. V. (2007). **Automatic drift elimination in probe microscope images based on techniques of counter-scanning and topography feature recognition.** Measurement Science and Technology, Vol. 18, iss. 3. S. 907-927.^[58]

Die Vorteile der RKM gegenüber der REM zeigen sich laut Tabelle 8 in der Möglichkeit der Aufnahme von 3-dimensionalen Oberflächenprofilen der Probe, was durch die gute Auflösung in der xy- bzw. z-Achse ermöglicht wird¹⁰. Die REM liefert dagegen „nur“ 2-dimensionale Bilder. Während bei der RKM keine Probenvorbereitung notwendig ist, müssen die Proben bei der REM aufgrund der Probenumgebung im Vakuum aufwändig präpariert werden, was zur Schädigung der Probe führen kann. Da bei der RKM nicht im Vakuum gearbeitet wird, kann man auch lebende Organismen oder biologische Makromoleküle damit gut untersuchen.

Die Nachteile der RKM im Vergleich der REM zeigen sich in der Tiefenschärfe und in der Schnelligkeit des Verfahrens: Während man für eine Analyse mittels RKM einige Minuten braucht, arbeitet REM bei niedriger Qualität beinahe „real-time“. Ein weiterer Nachteil der RKM zeigt sich in der Hysterese des piezoelektrischen Materials⁵⁹.

4.1.4 TEM vs. REM

Je nach Ziel und Aufgabenstellung wird die REM oder TEM als Analysenmethode angewendet.

In Abbildung 10 wird der Unterschied zwischen REM und TEM in Bezug auf Vergrößerung deutlich. Beide Bilder zeigen einen Mausmuskel, im Speziellen die T-Tubuli. Das obere Bild (A) erhielt man durch die REM, das untere (B) durch die TEM.

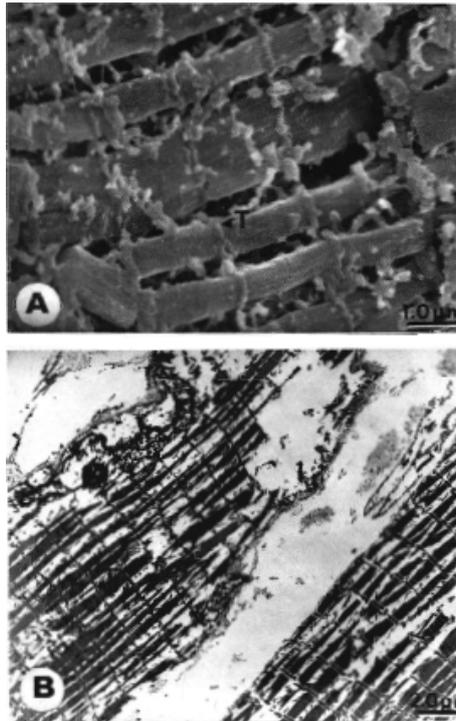


Abbildung 10: Mausmuskel: (A) REM - Bild, (B) TEM - Bild; T=T-Tubuli
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.49.^[16])

Anm.: Der Strich im rechten unteren Eck stellt bei (A) 1 μ m und bei (B) 2 μ m dar.

Hiermit soll gezeigt werden, dass die REM eher den Bereich Makro- und Mikrostruktur, TEM dagegen den Mikro- und Ultrastruktur⁶⁰ abdeckt.¹⁶ Zur Makrostruktur zählen das allgemeine Aussehen der Probe, die Oberfläche, Kanten,... , während die Mikrostruktur kleinere Merkmale, wie Zellgrößen, -längen, -stärken und die Verteilung und Orientierung von Zellen beschreibt. Die Ultrastruktur deckt einen noch kleineren Bereich, wie zum Beispiel Oberflächenstrukturen und -beschaffenheit, ab.⁶¹ Wie schon anfangs erwähnt, muss man daher im Vorhinein festlegen, in welchem Bereich man arbeiten möchte und wählt dann das geeignetste Elektronenmikroskop aus.

Es gibt auch einen Unterschied bei der für die REM bzw. TEM eingestellten Spannung: Während bei der REM 3 bis 20 kV Spannung verwendet wird, wird bei der Untersuchung mit TEM 60 bis 80 kV gebraucht.⁶²

4.2 Einsatzbereiche der Methoden im Nahrungsmittelsektor

4.2.1 Immunchemische Methoden

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln werden unter anderem immunchemische Methoden eingesetzt, wo spezifische Proteine und Polysaccharide in der Probe lokalisiert werden. Es werden dazu markierte Antikörper oder Lektine verwendet. Während früher Ferritin oder Diaminobenzidin als Marker verwendet wurden, werden mittlerweile Goldpartikel für die Elektronenmikroskopie genommen. Diese haben den Vorteil, dass sie in allen Größen produziert werden können und innerhalb einer Probe zwei oder mehrere verschiedene Komponenten kennzeichnen.

Das Prinzip, das dahintersteckt, ist folgendes: Primäre mono- und polyklonale Antikörper binden an spezifischen Antigenen in der Probe. Die sekundären Antikörper sitzen auf den Goldpartikeln, manchmal verwendet man auch das Protein A von *Staphylococcus aureus*. Die Goldpartikel reagieren dann mit den primären Antikörpern und kennzeichnen jene Bestandteile, die von Interesse sind.

Zum Beispiel kann man Molkenproteine (β -Lactoglobulin) in Fleischprodukten lokalisieren. Dies zeigt Abbildung 11. Auf dem oberen Bild ist erkennbar, dass primäre, spezifische Antikörper mit β -Lactoglobulin reagieren und sekundäre, nicht spezifische Antikörper β -Lactoglobulin mit Gold maskieren. Im unteren Bild ist Gold erkennbar, was auf β -Lactoglobulin im Fleisch hinweist.

Ergebnisse

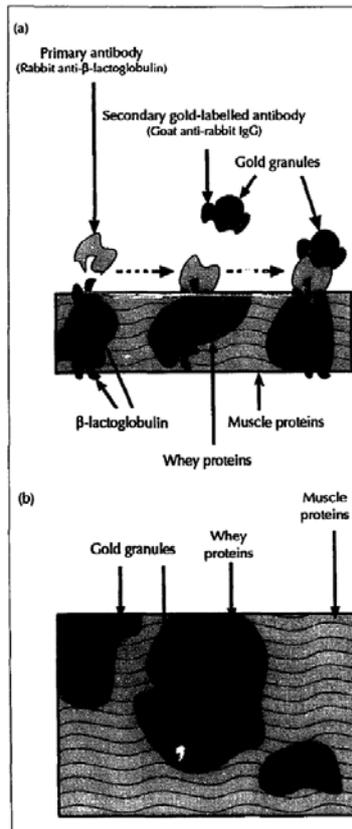


Abbildung 11: Immunchemische Methoden

(a) Reaktion zwischen primären, spezifischen Antikörpern mit β -Lactoglobulin; sekundäre, nicht-spezifische Antikörper (auf den Goldpartikel) markieren β -Lactoglobulin mit Gold.

(b) Verteilung von Gold (welches anzeigt, dass β -Lactoglobulin im Fleisch vorherrscht)

(Quelle: Kaláb, M. et al. (1995). S. 182.^[13])

4.2.2 Fraktale Analyse

Die fraktale Analyse dient zur Bildanalyse und macht Schätzungen über den Grad der Unregelmäßigkeit bzw. Abweichung einer Struktur. Weiters kann man Entwicklung von Strukturen untersuchen und Veränderung während Prozessen, wie zum Beispiel Agglomeration oder Kristallisation, beschreiben. Die fraktale Analyse stellt auch die Porosität und Rauheit bzw. Oberflächenbeschaffenheit von Lebensmitteln dar.¹³

Nach Peleg kann man den Grad von agglomerierten Kaffeepartikeln und ihre Tendenz, nicht zu verklumpen, ebenfalls durch fraktale Analyse bestimmen. Hierzu wird die fraktale Dimension von den Partikel-Silhouetten gemessen.¹³

4.2.3 Gefrieren von Lebensmitteln

Die Lokalisation von Eiskristallen ist vor allem von der Schnelligkeit des Gefrierens abhängig. Langsames Gefrieren ist für die Bildung von Eiskristallen in extrazellulären Bereichen verantwortlich. Diese Kristalle sind sehr groß und haben meistens eine verminderte Qualität der Lebensmittel zur Folge. Auf der anderen Seite führt schnelles Gefrieren zur Bildung von kleinen Eiskristallen, was auch die Qualität des Produktes verschlechtert. Abbildung 12 zeigt den Unterschied zwischen langsamem und schnellem Gefrieren am Beispiel der Erdbeere. Durch die REM konnte dieser Gegensatz sehr gut visualisiert werden.

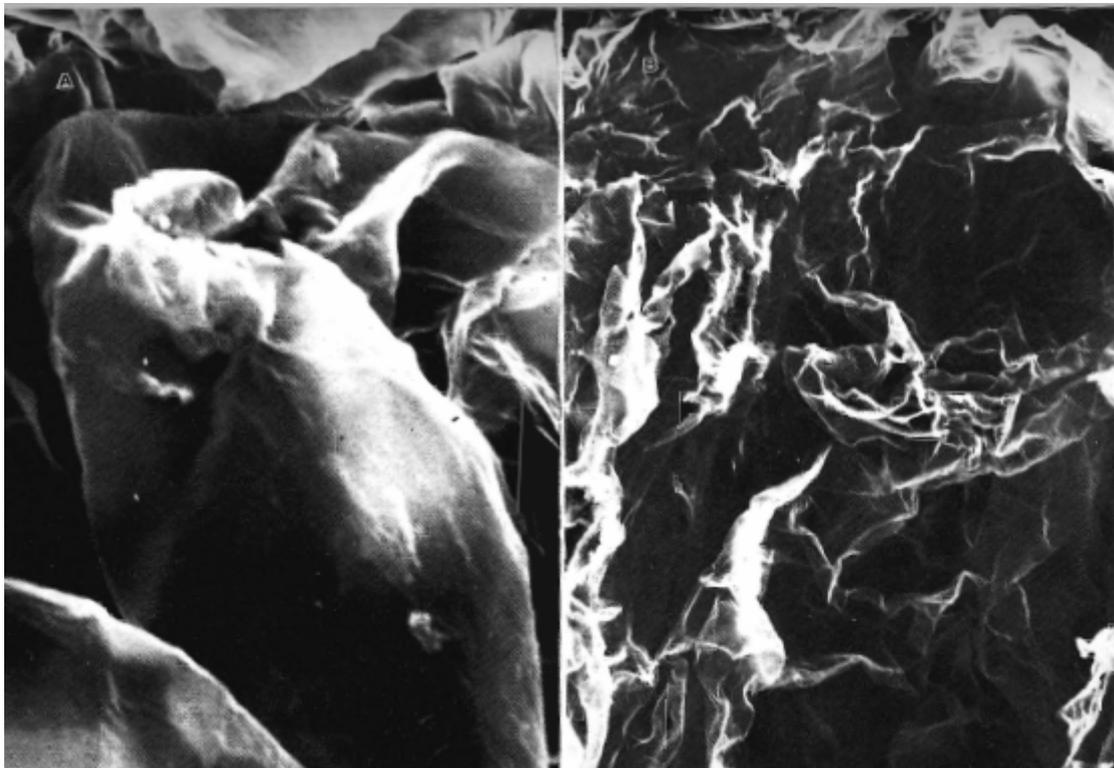


Abbildung 12: Erdbeeren / REM: (A) schnelles Gefrieren, (B) langsames Gefrieren
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.73.^[16])

In der linken Abbildung sieht man intakte Zellen mit kleinen Eiskristallen, verursacht durch schnelles Gefrieren, während rechts die Zerstörung der Zelle in Folge langsamen Gefrierens erkennbar ist.

4.2.4 Untersuchung von Lebensmittelgruppen

Milch und Milchprodukte

Die Mikrostruktur von Milchprodukten ist reich an Fettkügelchen, Membranen, kolloidalen Aggregaten und Kristallen. Durch die heterogene Zusammensetzung von Lebensmitteln ist es oft schwer, die Struktur derselben zu erfassen und zu analysieren, und es sind Techniken entstanden, die versuchen, auch die Struktur problematischer Lebensmittel zu erfassen. Zu diesen Produkten gehören vor allem Fette und fettreiche Lebensmittel, weil ihre Mikrostruktur im Vergleich zu anderen Lebensmitteln enorm temperaturabhängig ist.¹⁶

Gerade Milch und Milchprodukte sind für die Elektronenmikroskopie auf Grund des ähnlichen Gehalts an flüssigem Fett und Wasser schwer zu präparieren.

In der nachfolgenden Tabelle wird erklärt, für welche Milchprodukte TEM bzw. REM angewendet werden.¹⁶

Tabelle 9: Elektronenmikroskopische Techniken bei der Analyse von Milch und Milchprodukten

Technik	Probenbeschaffenheit		Milchprodukt
REM	Trocken		Milchpulver, Molke, Buttermilch ^{63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73}
	Getrocknet		fettreduzierte Milchprodukte ^{74,75,76,77,78,73}
	Frieren und mit Gold repliziert		Viskose Milchprodukte und Milchprodukte mit hohem Fettanteil (Creme, Butter, ...) ⁷⁹
	Frieren und mit Gold oder Kohlenstoff behandelt		Eiscreme, Schlagobers, Butter ^{80,81,82,83}
TEM	Negativbild	Suspension	Flüssige Milch, Creme ^{84,85,191,86,87,88,89,90,91,92}
	Metallschatten-Technik	Suspension	Flüssige Milch, Creme ^{86,93,94,95,96,97}
	Dünne Schnitte	Suspension, fest	Flüssige Produkte, Käse, Creme (mit Agar) ^{62,178,98,99,100,71,74,75,76,101,102,73,103,88,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121}

(Quelle: Káláb, M. (1981).^[153])

Ergebnisse

Wie man daraus erkennen kann, wird REM eher für getrocknete und viskosere Milchprodukte, wie Milchpulver, Creme, Butter,..., eingesetzt. TEM hingegen gibt Aufschluss über Suspensionen. Weiters kann gesagt werden, dass die Gefrierbruchtechnik bei der TEM grundsätzlich für alle 83,88,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,,137,138,139,140,141,142,143-144-145,146,147 und die Replikation von getrockneten Proben für proteinreiche Milchprodukte^{148,147} angewendet werden kann.

Die CP-Trocknung bietet viele Vorteile. Bei Produkten mit geliertes Stärke¹⁴⁹ sollte sie jedoch nicht angewendet werden, weil diese nicht fixiert werden können. Ein Lebensmittel dieser Art wäre zum Beispiel Joghurt mit Stabilisator⁷⁴.

Milch

RKM kann für die Untersuchung von Milch verwendet werden.

In der folgenden Abbildung sind Caseinmizellen von Kondensmagermilch dargestellt.

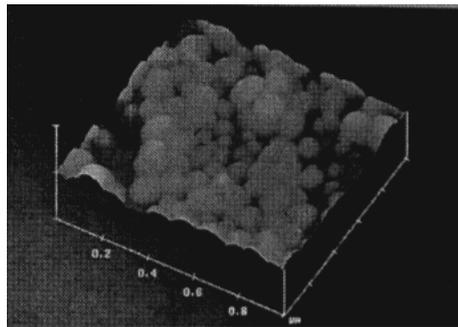


Abbildung 13: Caseinmizellen von Magermilch / RKM

(Quelle: Kaláb, M. et al. (1995). S.181.^[13])

Die Probenvorbereitung zur Analyse der Caseinmizellen ist nicht aufwendig: Ein Tropfen von Kondensmilch wird auf ein Deckglas gebracht und 15 Minuten bei Raumtemperatur gewartet, danach wird die Probe unter Raumbedingungen gescannt.¹³

Milchpulver

Bei diesen Partikeln handelt es sich um hohle Bereiche mit einer feinen Oberfläche. Unter einem Rasterelektronenmikroskop sieht man die kristallisierte Laktose. Die REM wird verwendet, um zu schauen, ob Laktose nach dem Sprühtrocknen (während der Lagerung) nadelähnliche Kristalle ausbildet und bei der

Ergebnisse

Vorkristallisation ohnehin keine atypischen Formen entstehen. Die Partikel werden mit heißer Luft getrocknet, und man kann sie noch mit einer oberflächenaktiven Substanz (Lecithin) überziehen.¹⁶

Mit CLSM hat man ebenfalls die Oberfläche von Milchpulver untersucht. Für diesen Zweck wurde das Milchpulver in einer Glycerol-Lösung mit einem fettlöslichen, fluoreszierenden Färbemittel verteilt.¹⁵⁰

Milchsäume

Elektromikroskopische Untersuchungen werden genutzt, um detaillierte Erkenntnisse über den Aufbau der Grenzfläche Luft / Wasser in Milchsäumen zu erhalten. Der erste Schritt der Probenvorbereitung ist das Aufschäumen von Milch. Nach einer Standzeit von 20 Minuten werden die Proben in flüssigem Propanstrahl eingefroren. Hierfür wird eine Spatelspitze Schaum auf ein Goldträgernetzchen aufgebracht, welches dann auf ein kupfernes Trägerplättchen platziert wird. Ein zweites Trägerplättchen wird oben draufgesetzt. Dieses „Präparat-Sandwich“ wird in den Probenhalter eingesetzt und in ein Gefriergerät überführt, indem die Probe bei -180°C durch flüssiges Propan eingefroren wird. Anschließend werden die Präparate aus dem Einfriergerät entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt. Die Proben werden danach in eine Hochvakuum-Gefrierätzanlage gegeben, und es wird ein Präparatabdruck (Gefrierbruchtechnik) hergestellt. Der Objektträgertisch der Vakuumkammer wird zur besseren Kälteübertragung mit flüssigem Frigen bepinselt. Die Brechung der Probe erfolgt bei -120°C entlang innerer Oberflächen. Im Vakuum werden Platin und Kohlenstoff im Winkel von 45° verdampft, wobei sich eine dünne Schicht auf dem Objekt niederschlägt. Zur Verstärkung des Kontrastes wird mit Kohlenstoff im Winkel von 90° beschattet. Anschließend wird die Probe in destilliertes Wasser gegeben und somit die Abdruckschicht isoliert, welche in Chlorbleichlauge, danach wieder in destilliertes Wasser, Aceton und nochmals in destilliertes Wasser gegeben wird. Anschließend wird der Abdruck auf Papier getrocknet.^{151, 152, 153, 154}. Danach werden die hergestellten Präparate bei einer Spannung von 80 kV mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.¹⁵⁵

Säume aus unerhitzter Magermilch weisen eine raue, unregelmäßige, porenähnliche Struktur auf. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Säumen aus pasteurisierter Magermilch eine gleichmäßige, gekörnte Struktur auf der Luftblasenoberfläche.¹⁵⁵

Ergebnisse

Es wird außerdem beobachtet, dass bei Schäumen aus erhitzten Proteinlösungen, im Vergleich zu solchen aus nativen, nicht erhitzten Proteinlösungen, eine erhöhte Proteinmenge an der Grenzfläche Luft / Wasser adsorbiert.¹⁵⁶

Joghurt

In der nachfolgenden Abbildung, die mit konfokaler Mikroskopie erstellt wurde, sieht man Joghurt, das mit verschiedenen hohen Drücken homogenisiert wurde. Der höhere Druck führt zur Ausbildung von vielen, kleinen Fettkügelchen, während das Homogenisieren mit niedrigerem Druck große Fettkugeln hervorbringt.

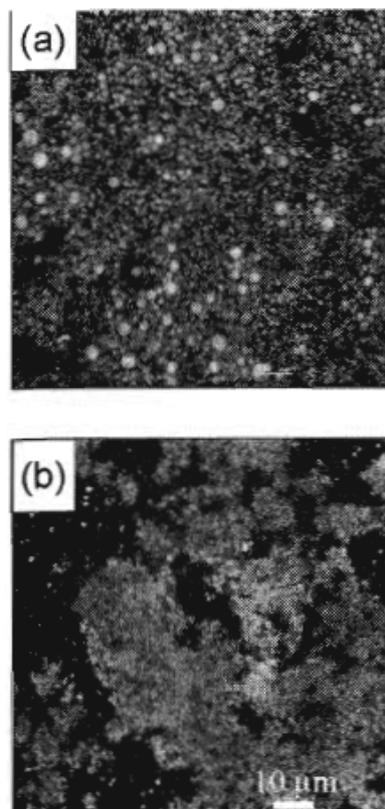


Abbildung 14: Joghurt / CLSM

(a) Homogenisierung bei hohem Druck; (b) Homogenisierung bei niedrigem Druck

(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.247.^[157])

Im oberen Bild sind die Fettkügelchen klein, da mit hohem Druck gerührt wurde, im unteren Bild finden sich auf Grund der Homogenisierung bei niedrigem Druck große Fettkügelchen.

Dieser Unterschied in der Mikrostruktur macht sich äußerlich bzw. makroskopisch in der Konsistenz bzw. im Wasserhaltevermögen erkennbar. Weiters kann die

Ergebnisse

Veränderung der Struktur auch ein ungewohntes sensorisches Gefühl im Mund auslösen und dadurch vom Konsumenten abgelehnt werden.

Weiters ist die Temperatur bei der Joghurtherstellung entscheidend. Hierzu wurden zwei Joghurtsorten bei 5°C und 35 °C mit der CLSM untersucht, und die zwei Proben wurden auch nach Kauen bzw. Einnahme in den Mund analysiert.

Abbildung 15 zeigt den Unterschied in der Struktur bei diesen unterschiedlichen Bedingungen.

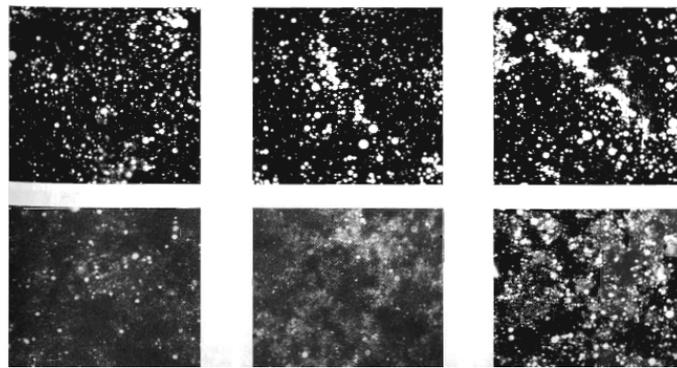


Abbildung 15: Zwei Joghurtsorten / CLSM
Gekaut (links), bei 35°C (Mitte) und bei 5°C (rechts)
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.247.^[157])

Bei der ersten Joghurtsorte (obere Reihe) ist eine Ähnlichkeit zwischen dem Joghurt, das auf 35°C erhitzt wurde (mittleres Bild) und dem Joghurt, das bereits im Mund war (linkes Bild), ersichtlich, während sich diese Vergleichbarkeit in der unteren Reihe (bei Joghurtsorte 2) nicht findet.¹⁵⁷

Das Beispiel des Joghurts soll bewusst machen, wie stark Prozessänderungen, wie Kochen, Frieren, mechanische Belastungen,..., die Struktur von Lebensmitteln beeinflussen können.

Käse

Die nachfolgende Abbildung zeigt Käse, der durch das Oberflächenabdruckverfahren präpariert und elektronenmikroskopisch (TEM) untersucht wurde. Hierzu wurde ein Abdruck mit Platin und Kohlenstoff gemacht.¹³ Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen den Fettkügelchen und der Proteinmatrix.

Ergebnisse

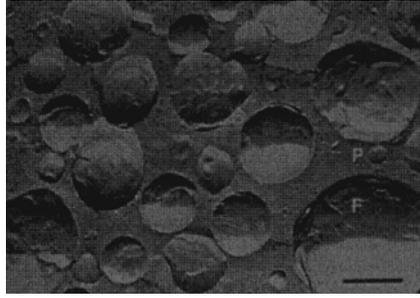


Abbildung 16: Käse / TEM: gefroren, mit Platin und Kohlenstoff behandelt.

Homogene Verteilung der Fettkügelchen (F) in der Proteinmatrix (P)

(Quelle: Kaláb, M. et al. (1995). S. 182.^[13])

Für die Untersuchung mittels REM wird der Käse in 1,4-%iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert, in einer Ethanol-Reihe dehydratisiert, mit Chloroform behandelt und CP-getrocknet. Die getrocknete Probe wird gebrochen, mit Kohlenstoff und Gold behandelt und mittels REM visualisiert.

Die Struktur von Hartkäse besteht aus einem dichten Casein - Netzwerk mit kristallinen Milchfettkügelchen, die in einem „Geflecht“ inkludiert sind.

Abbildung 17 zeigt den Verlauf einer Gefrierbruchtechnik bei einem Gouda, die Visualisierung erfolgte durch konfokale Mikroskopie.

Ergebnisse

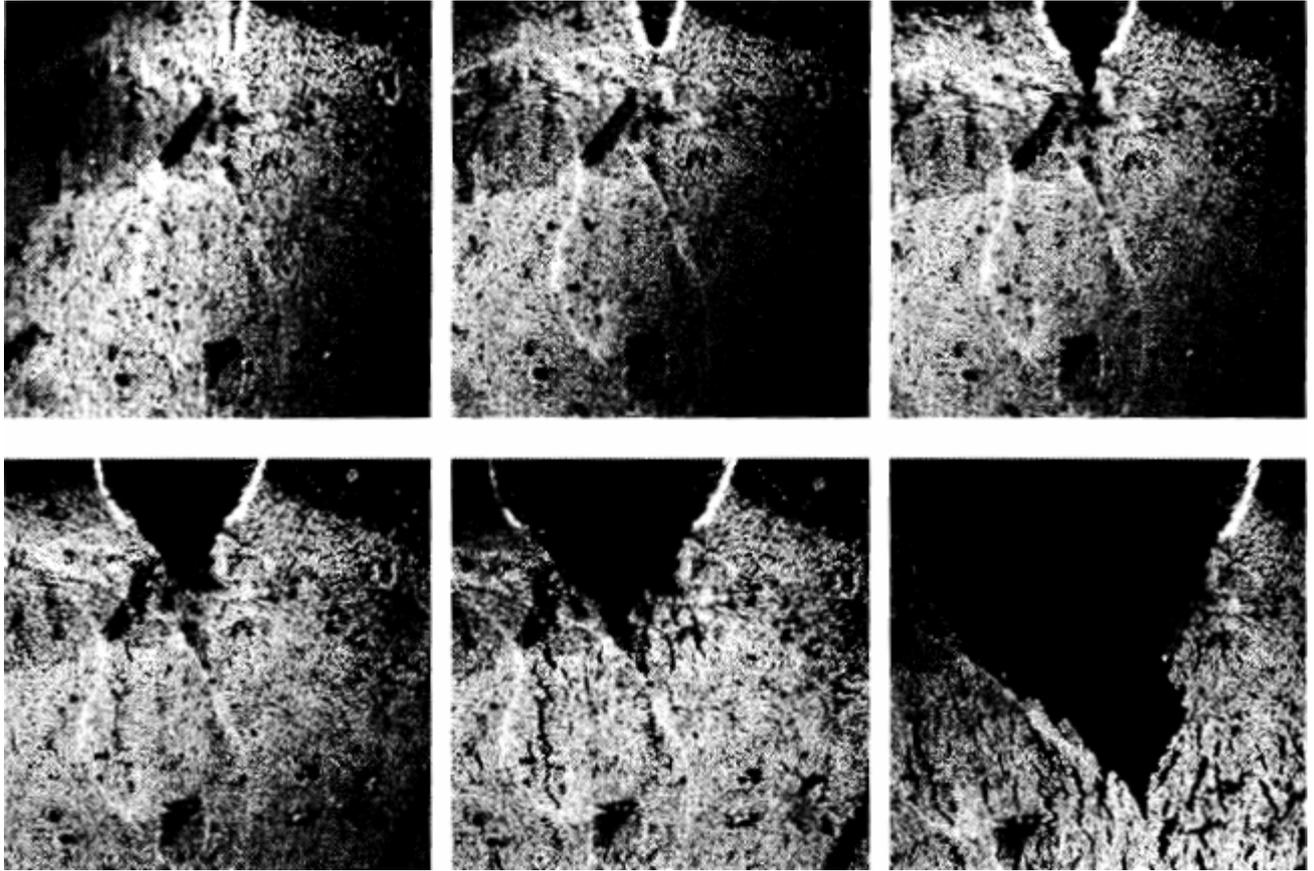


Abbildung 17: Gouda: Bruch - Ausbreitung nach Einschnitt / CLSM.

(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.250.^[157])

In diesen Bildern wird ein Phänomen sichtbar, das im Methodikteil bei der Gefrierbruchtechnik erwähnt wurde. Bei dieser Technik unterscheidet man zwei Arten, und bei einer Art wird die Probe mit einem Messer „geschnitten“. In der Abbildung wird aber ersichtlich, dass es sich nicht um ein Schneiden im üblichen Sinn handelt, sondern dass die Probe auf Grund ihrer Konsistenz in Wirklichkeit gebrochen wird. Nach dem Einschnitt breitet sich der Bruch durch die schwächsten Stellen in der Struktur aus.

Joghurt, Topfen, Käse

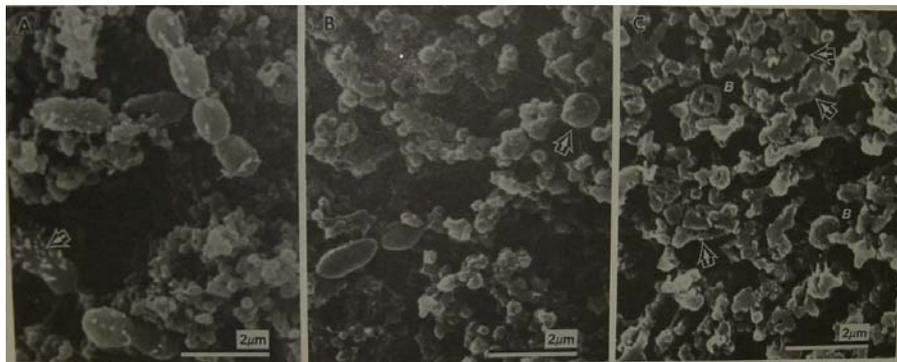
Um gute Bilder mit REM zu erreichen wird die Trocknung nach der Critical-Point-Methode angewendet. Zuerst werden die Proben in 1 x 1 x 10 mm große Prismen geschnitten, die danach in einer Ethanol-Reihe dehydratisiert werden. Nachdem man sie mit 100% Ethanol behandelt hat, werden sie durch flüssigen Stickstoff gefroren. Danach werden die Proben gebrochen, in Ethanol gegeben und CP-getrocknet.

Ergebnisse

Für Tofu gilt die gleiche Probenvorbereitung. Fettreiche Produkte, wie Topfen oder Käse, werden mit Chloroform oder n-Hexan behandelt, ansonsten wird die oben genannte Methode angewendet.

Cottage Cheese

In Abbildung 18 sieht man den Unterschied von drei verschiedenen REM-Präparationsmethoden von Hüttenkäse („Cottage Cheese“). In der linken Abbildung sieht man ein REM-Bild von Käse, der in Glutaraldehyd fixiert, gefriergetrocknet und dann gebrochen wurde. Das mittlere Bild zeigt den gleichen Käse, dieser wurde aber in Glutaraldehyd fixiert, in einer Ethanol-Reihe bis zum absoluten Ethanol dehydratisiert, in Freon eingefroren, durch flüssigen Stickstoff gefriergetrocknet, in absoluten Ethanol aufgeschmolzen und CP-getrocknet. Auf dem rechten Bild sieht man den Käse, der mit 30% Glycerol behandelt, in Freon eingefroren, durch flüssigen Stickstoff gefriergetrocknet, in Glutaraldehyd fixiert, in einer Ethanol-Reihe dehydratisiert und CP-getrocknet wurde.



**Abbildung 18: Hüttenkäse / REM: durch drei verschiedenen Techniken untersucht
(Quelle: Peleg, M. und Bagley, E.B. (1983). S.53.^[158])**

Wie aus den Bildern zu erkennen ist, sind alle drei genannten Methoden für die Untersuchung von „Cottage Cheese“ anwendbar.

Eiscreme

Die Textur von Eiscreme ist abhängig von der Größe der Eiskristalle, vom Gehalt und der Verteilung von Fett und der Proportion und Größe von Lufträumen. Um kleine Eiskristalle zu bekommen, wird rasch gefroren. Während der Lagerung von Eiscreme können sich durch Temperaturänderungen große Kristalle bilden. Kristalle, die größer als 40 bis 50 µm sind, werden im Mund als störend wahrgenommen.¹⁶

Ergebnisse

Abbildung 19 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) von Eiscreme. Hergestellt wurde das Präparat durch die Kryo-Technik.

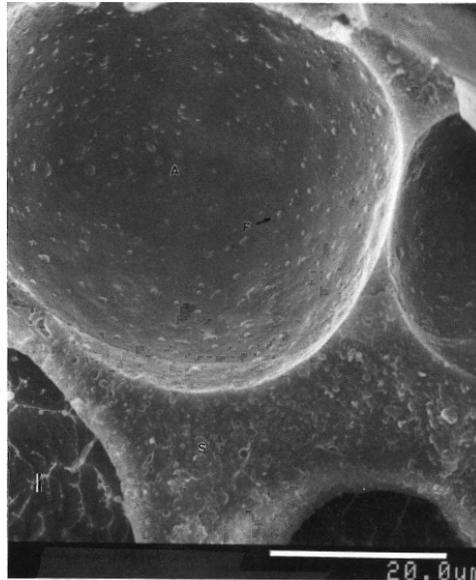


Abbildung 19: Eiscreme / REM (Kryopräparation)
F=Fettkügelchen, A = Luftblase, I = Eiskristallansatz
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.150.^[16])

Einsatzbereiche von Elektronenmikroskopie, konfokaler Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie bei Milchprodukten (allgemein)

Die Einsatzbereiche von Elektronenmikroskopie und konfokaler Mikroskopie bei der Untersuchung von Milchprodukten ist unterschiedlich.

CSLM wird vor allem für die Analyse der Bildung von Gelen benutzt. Man untersucht die Mikrostruktur von Milchprodukten, die gelartige Konsistenz haben, wie Eierscreme, Pudding, Vanillesoße, gelierte Milch,..., und Topfen. Hier widmet man sich vor allem der Veränderung der Struktur während Temperaturänderungen, der Wechselbeziehung zwischen Milchproteinen und Polysacchariden, der Analyse von Exopolysacchariden, der Lokalisation von Proteinen und Fett und der Untersuchung von Emulsionen in Milchprodukten. Fettkügelchen in Käse zum Beispiel können mit Nile Blue oder Nile Red identifiziert werden.

Abbildung 20 zeigt ein Bild von Käse, die Proteine sind vom Fett deutlich zu unterscheiden.

Ergebnisse

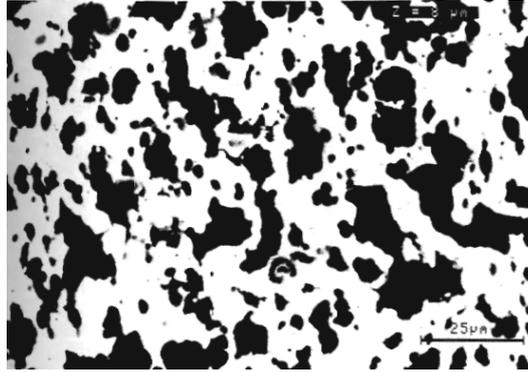


Abbildung 20: Käse: Proteine und Fett / CLSM
(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.65.^[51])

Proteine werden durch Anfärben leicht erkennbar, die Fettphase wird durch Negativ-Kontrast sichtbar gemacht.

Die Qualität von Cremes kann ebenfalls durch CLSM überprüft werden. Diese wird durch Pasteurisieren, Lagern und anderen Prozessschritten verändert bzw. beeinflusst. Die Qualität kann am fettfreien Gehalt und am Grad der Verbindungen der Kügelchen gemessen werden.⁵¹

Zur Veranschaulichung zeigen die drei folgenden Abbildungen typische Einsatzbereiche für Elektronenmikroskopie und konfokaler Mikroskopie.¹⁵⁷ In der Abbildung 21 sieht man die Struktur von Magermilch, die durch die CLSM visualisiert wurde. Bei den beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die geronnenes Gel und Topfen darstellen, kann man Wasser, Fett und Proteine deutlich auseinanderhalten, und man hat somit die Struktur im Detail vorliegen.

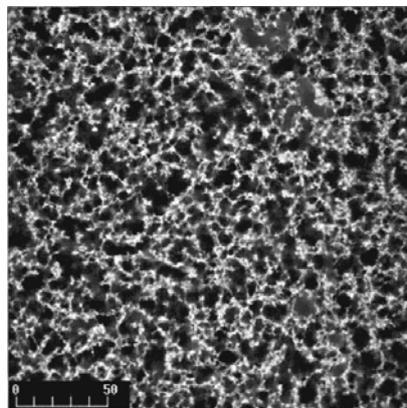


Abbildung 21: Gel (durch Chymosin) aus Magermilch / CSLM
weiß = Proteine, schwarz = Wasser
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.604.^[157])

Ergebnisse

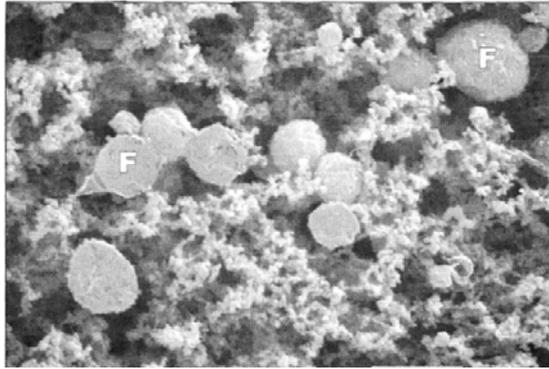


Abbildung 22: Geronnenes Gel mit Fettkügelchen (F) / REM
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.603.^[157])

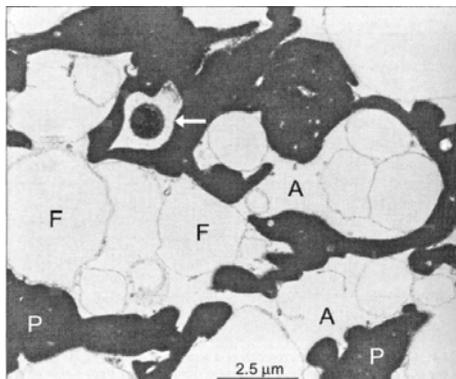


Abbildung 23: Topfen / Elektronenmikroskopie
A = Wasser, F = Fett, P = Protein
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.604.^[157])

Mit der RKM wurden Molkenproteine untersucht. Dafür wurden sie auf einem Film mit 40-%igen Glycerol aufgetragen, 72 Stunden getrocknet und danach mittels RKM analysiert.¹⁵⁹ Abbildung 24 zeigt das Ergebnis dieser Probenvorbereitung. Das Bild wurde durch den Kontakt-Modus aufgenommen, dieser erlaubt höhere Bildqualitäten als der Nichtkontakt-Modus. Zu sehen sind drei große Proteinglobuline, links unten im Bild sieht man mehrere kleine Proteine.¹⁶⁰

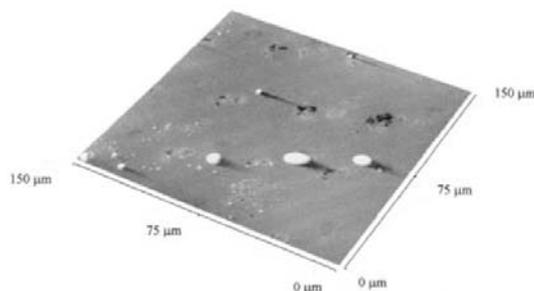


Abbildung 24: Molkenproteinfilm / RKM
(Quelle: Lent, L. E. (1998). S.2.^[160])

Ergebnisse

Röntgenstrukturmikroanalyse

Bei der Röntgenstrukturmikroanalyse werden Röntgenstrahlen durch das Zusammentreffen von Elektronen im Mikroskop emittiert. Diese haben ein bestimmtes Energieniveau, charakteristisch für das Element, welches sie generiert haben. Durch Detektion kann man feststellen, um welches Element es sich handelt, weiters kann man qualitative und quantitative Aussagen über Lebensmittel aufgrund der Elementanalyse machen. Elemente mit geringem Atomgewicht, wie zum Beispiel Bor, Stickstoff und Fluor, sind schwerer zu detektieren als Elemente mit höherem Atomgewicht.

Bei den Röntgenstrahlendetektoren unterscheidet man zwei verschiedene Systeme, energie - dispersive und wellenlängen – dispersive, wobei die wellenlängen – dispersiven Systeme für den Lebensmittelanalysenbereich nicht eingesetzt werden. Die energie – dispersive Röntgenmikrobereichsanalyse wird hingegen für diesen Bereich sehr gerne verwendet. Diese Technik ermöglicht es, das ganze Spektrum der Elemente abzudecken.

Elektronenenergieverlustspektroskopie

Abbildung 25 zeigt die Verteilung von Kalzium in einer Caseinmizelle von Milch. Erstellt wurde das Bild durch Elektronenenergieverlustspektroskopie. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass die Nachweisgrenze bei wenigen einzelnen Atomen liegt. In Verbindung mit einem TEM kann man die genaue chemische Zusammensetzung auf einer sehr lokalisierten Stelle bestimmen¹⁶¹. Die Präparation der zu untersuchenden Proben ist dann aber aufwändig, da es notwendig ist, dass die Probe extrem dünn ist, um Vielfachstreubeträge zu minimieren. Außerdem ist eine homogene Probendicke wünschenswert.¹⁶²

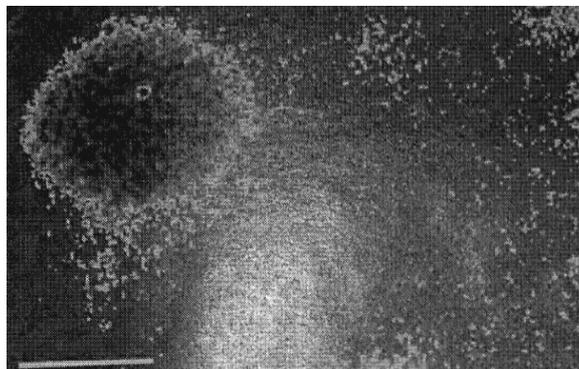


Abbildung 25: Verteilung von Kalzium in einer Caseinmizelle in Milch / EELS

Größe des Balkens: 0,25 µm

(Quelle: Kaláb, M. et al. (1995). S.181.^[13])

Ergebnisse

Das Prinzip von EELS beruht auf dem Verlust von Energie, wenn schnelle Elektronen auf oder durch eine Probe treffen. Verschiedene Wechselwirkungen in der Probe führen dazu, dass einige Elektronen Energie abgeben. Dadurch verringern sie ihre Geschwindigkeit und werden im Analysator stärker abgelenkt.¹⁶¹

Feldemissionsrasterelektronenmikroskop

Die Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie ist eine Art der REM. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Auflösung aus. Man nutzt sie für die Untersuchung von Casein-Mizellen.¹⁵⁷

Stärkehaltige Produkte

Stärkekörner

Stärke ist ein Reservekohlenhydrat bei Pflanzen und ein Gemisch aus zwei Glycanen, nämlich Amylose und Amylopektin. Stärkekörner werden in den Amyloplasten gebildet¹⁶³ und sind je nach Pflanzenart verschieden aufgebaut. Sie sind in kaltem Wasser unlöslich. Durch Kochen schwellen die Stärkekörner an, bei einer gewissen Temperatur (65 – 80°C) wird die semikristalline Struktur zerstört, und die Gelatinisierung tritt ein.¹⁶

Mit der REM kann man Stärkekörner sehr genau analysieren. Das zeigt die folgende Abbildung, wo man Stärkekörner von Getreide, Tapioka (Maniok), Weizen und Kartoffeln unterscheiden kann.

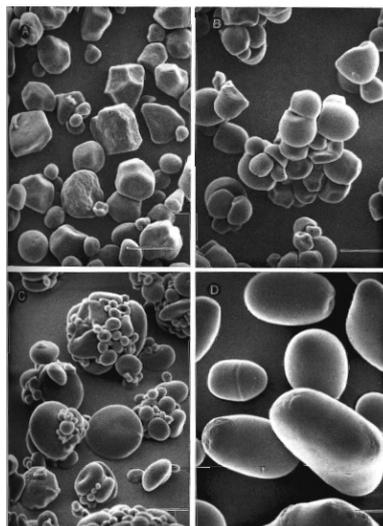


Abbildung 26: Stärkekörner / REM

(A) Getreide, (B) Tapioka, (C) Weizen, (D) Kartoffeln
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.77.^[16])

Ergebnisse

Die Stabilität und Festigkeit von Stärkekörnern können durch RKM sichtbar gemacht werden. Dies zeigt Abbildung 27.

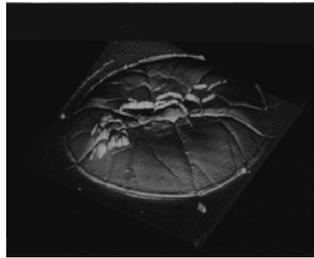


Abbildung 27: Stärkekorn / RKM

Größe: 30 x 30 µm

(Quelle: Dickinson, E. (1995). Fig. 3.6.^[51])

Verglichen mit der REM und TEM⁵¹ kann man mit der RKM viele Prozesse verfolgen, ohne Schädigungen durch Elektronen befürchten zu müssen, und die Probenvorbereitung ist leichter. Früher wurden die Objekte für die RKM fixiert oder getrocknet.¹⁶⁴ Bei zellulärem Material wurde auch luftgetrocknet, fixiert oder bis zum kritischen Punkt getrocknet.^{164,165,166,167,168}

Kartoffeln

Werden Kartoffeln gekocht, entstehen zwei wichtige Strukturen: Zuerst gelatiniert die Stärke bei 58 bis 70°C, danach zerfällt die Zelle auf Grund der Zerstörung der Mittellamelle. Wenn die gelatinierte Stärke anschwillt, platzt die Zellwand, und man erkennt diesen Fehler an einer matschigen (nicht festen) gekochten Kartoffel. Durch Gefriertrocknung und Untersuchung mit der REM konnte man diesen Prozess verbessern, indem man das Vorkochen der Kartoffel bei 71°C auf 20 Minuten ausgedehnt hat.¹⁶

Getreideprodukte, Backwaren und Süßigkeiten

Getreideprodukte können mit der CLSM sehr gut untersucht werden. Stärkekörner werden mit Nile Blue bei 630 nm detektiert. Man kann auch Backwaren und Süßigkeiten während Prozessänderungen beobachten.

Getreidesnacks

Für die Untersuchung von trockenen Snacks aus Getreide kann die REM verwendet werden.¹⁶⁹ Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Struktur von Laktose in

Ergebnisse

Milchpulver und dem a_w -Wert gefunden. Diese Beziehung hat sowohl Einfluss auf die Qualität als auch auf die Textur des Lebensmittels¹⁷⁰. Für die Analyse wird die Probe auf eine Aluminiumplatte gegeben und auf einen a_w -Wert von 0,11 getrocknet. Dann werden die Snacks mit Gold und Palladium (60% und 40%) bedampft und mittels REM bei 6 kV und bei einer Punktgröße von 320-640 Å untersucht.

Brot

Brot kann für die Untersuchung mittels REM unterschiedlich präpariert werden. Eine Möglichkeit ist eine Fixierung in 5-%igen Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit einer Endfixierung in gepufferten 1-%igen Osmiumtetroxid. Nachdem die Probe in Wasser gespült wird, wird sie in Ethanol dehydratisiert und luftgetrocknet.¹⁷²

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis dieser Präparationstechnik.

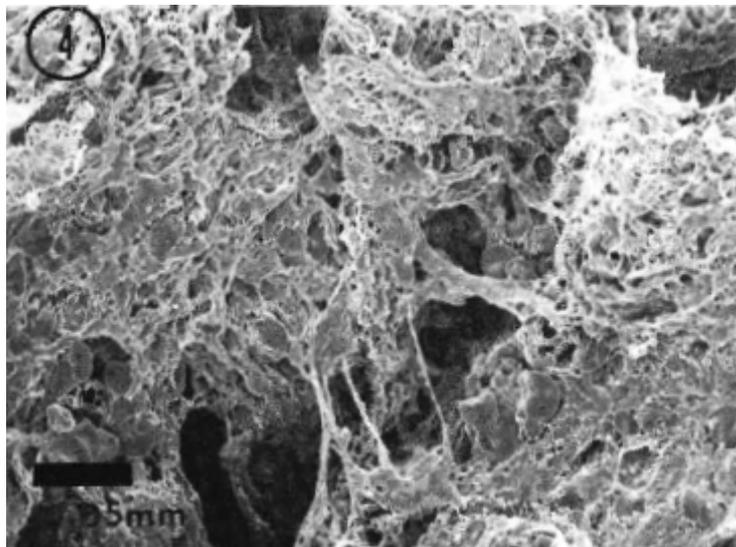


Abbildung 28: Brot / REM (Lufttrocknung)
(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.236.^[172])

In der Abbildung erkennt man, dass Stärke und Proteine keine kontinuierliche Phase bilden. Man erkennt die Oberfläche von Stärkekörnern, die sich als lange, scheibenförmige, wie als kleine, runde Körnchen zeigen.

Eine andere Möglichkeit nach der Fixierung in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid und Dehydratisierung in Ethanol ist die CP-Trocknung¹⁷², das Ergebnis sieht man in Abbildung 29.

Ergebnisse

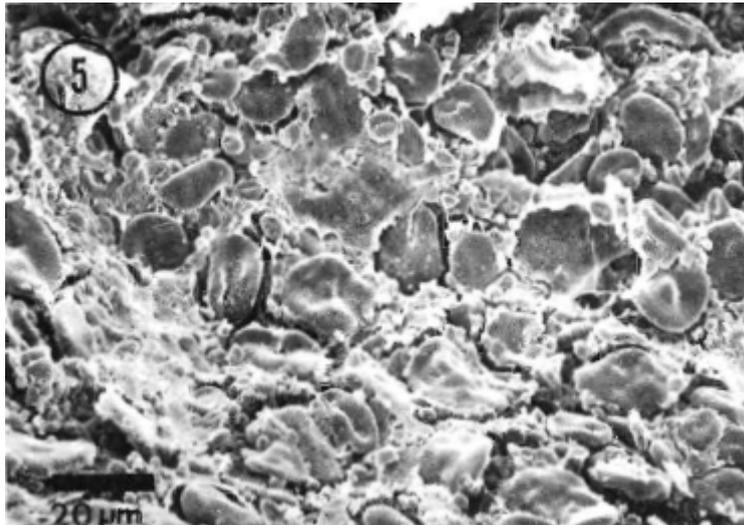


Abbildung 29: Brot / REM (CP-Trocknung)
(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.236.^[172])

Weiters kann nach der Dehydratisierung auch eine Gefriertrocknung erfolgen¹⁷², wie dies in Abbildung 30 der Fall ist.

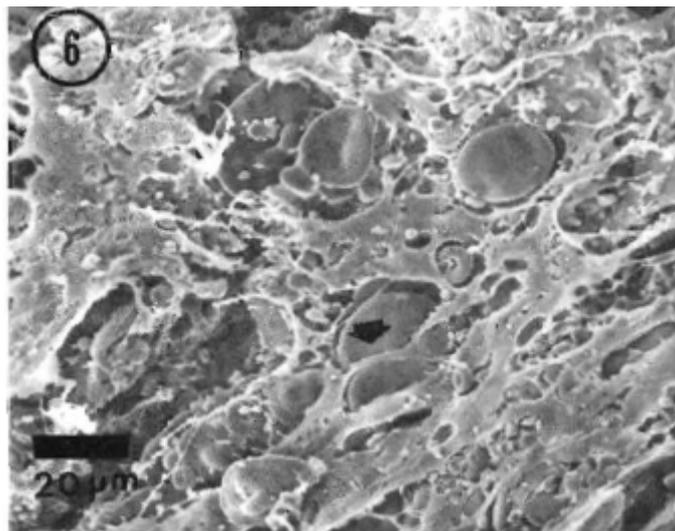


Abbildung 30: Brot / REM (Gefriertrocknung)
(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.236.^[172])

Fetthaltige Lebensmittel

Bei der Analyse von Fett werden je nach Ziel der Untersuchung verschiedene Methoden angewendet. Um das Verhältnis flüssiger Anteil zu festem Anteil oder den festen Anteil zu untersuchen, kommen die Dilatometrie, die NMR (Kernresonanzspektroskopie) und die MRI (Magnetresonanztomografie) in Einsatz. Um die Fettkristalle zu analysieren, finden spektroskopische Techniken (Raman-Spektroskopie, Infrarot-Spektroskopie) oder mikroskopische Techniken (Polarisationslichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie) Anwendung.¹⁷¹

Ergebnisse

Margarine und Butter

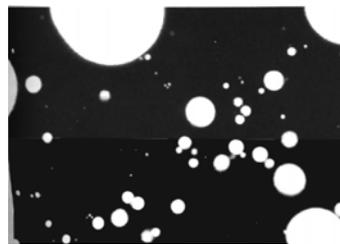
CLSM wird vor allem für fettreiche Lebensmittel verwendet, zum Beispiel für Butter und Margarine. Es wird eine große Menge von der Probe genommen, damit das Präparieren der Probe die Größe und Position der Fettkugeln nicht beeinflusst. Hierzu werden Nile Red zum Färben der Lipide und Fluoresceinisothiocyanat für Proteine verwendet.¹³ Statt Nile Red finden auch andere Fluorochrome, wie zum Beispiel Acridin Orange, Congo-Rot, Alexa-Fluor, Nile Blue, Fast Green FCF und Texas-Red, Verwendung.¹⁵⁷ Die unterschiedlichen Bestandteile können danach durch Fluoreszenz identifiziert und lokalisiert werden.

Dieselbe Technik wird auch für Weizenteig beschrieben.¹³

Emulsionen

Bei Emulsionen wird das Verfahren des Negativ-Kontrasts verwendet.

Abbildung 31 zeigt Salatdressing, welches mit Nile Red und Fast Green FCF eingefärbt wurde.



**Abbildung 31: Salatdressing / CLSM (Negativ-Kontrast)
gefärbt mit Nile Red und Fast Green FCF
(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.61.^[51])**

Bei Emulsionen untersucht man vor allem die Größe und Verteilung der Wassertröpfchen, die hauptverantwortlich für die Textur und Stabilität des jeweiligen Lebensmittels sind. Fettkristalle sind auch sehr interessant, doch dadurch, dass sie sehr klein sind und sie nur einen kleinen Öl-Anteil besitzen, ist es sehr schwer, sie mittels CLSM zu untersuchen.

Für die Untersuchung mittels REM werden zwei mm³ Probe in einem Fläschchen mit 4-%igen Glutaraldehyd in 0,07 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7 über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach werden die Proben drei Mal für je fünf Minuten in Phosphatpuffer und anschließend für vier Stunden in Phosphatpuffer mit 1-%igen

Ergebnisse

Osmiumtetroxid gegeben, um die Lipide zu stabilisieren. Folgend wird die Probe in Ethanol, danach in Amylacetat dehydratisiert. Anschließend erfolgen eine CP-Trocknung und eine Gold/Palladium-Behandlung. Mit einem REM wird die Probe bei einer Spannung von 20 kV angeschaut.

Die Technik der Gefriertrocknung kann hier nicht angewendet werden, weil die Emulsion dem Gefriervorgang nicht standhält.¹⁷²

Bei der Untersuchung mit TEM wird circa ein Gramm der Probe in 5 ml wässriger Lösung, die 2% Agar und 1% Glycerol enthält, gelöst. Wenn sie fest ist, werden kleine Stücke (circa zwei mm³) runtergeschnitten und in 5-%igen Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,2) zwei Stunden lang bei Raumtemperatur fixiert und in 1-%igen Osmiumtetroxid in Phosphatpuffer nachfixiert. Danach wird in einer Ethanol-Reihe dehydratisiert und in einer gesättigten Lösung von Uranylacetat in 70-%igen Ethanol für drei Stunden gefärbt. Dann wird die Probe in Propylenoxid und eine Mischung aus Propylenoxid und Luft's Epon im Verhältnis 1:1, danach für 90 Minuten in reines Epon gegeben. Mit einem Ultramikrotom werden dünne Schnitte (Scheiben) angefertigt und bei einer Spannung von 80 kV mittels TEM betrachtet.¹⁷²

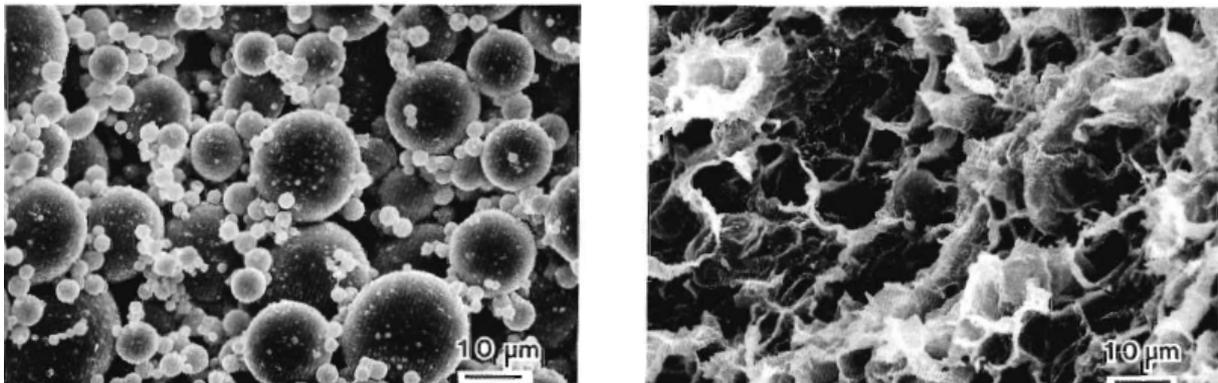


Abbildung 32: Mayonnaise / REM

(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.233 ^[172])

Aus der Abbildung 32 wird deutlich, dass REM angewendet werden kann, um die Tropfengrößenverteilung von Emulsionen, zum Beispiel von Mayonnaise, zu bestimmen.¹⁷²

Das ist auch in Abbildung 33 ersichtlich. Hier wurde die Struktur von Salatdressing visualisiert.

Ergebnisse

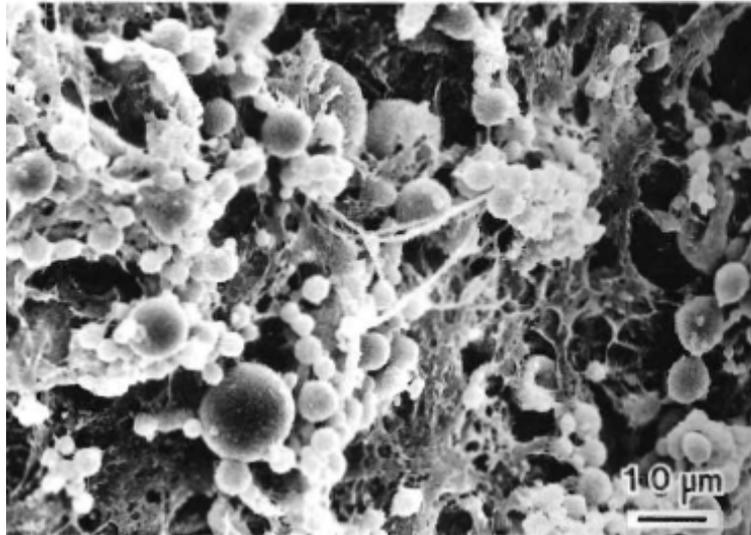


Abbildung 33: Salatdressing / REM

(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.236 ^[172])

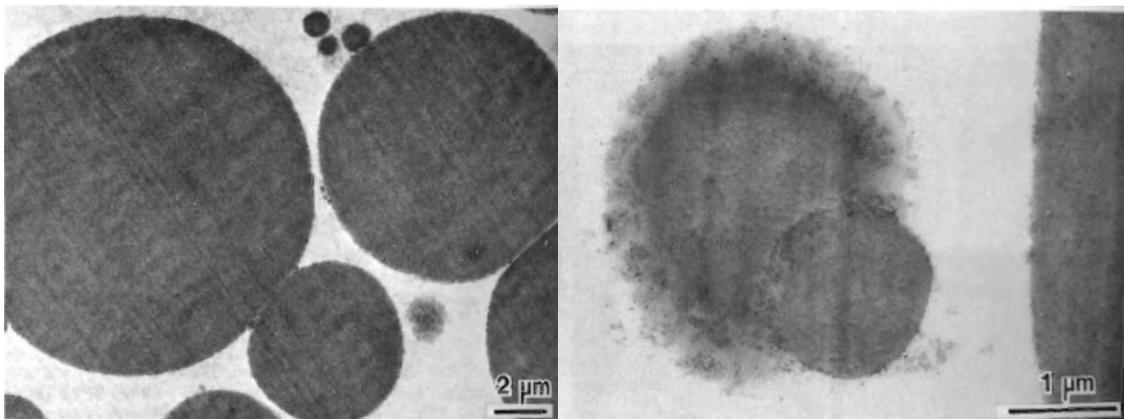


Abbildung 34: Mayonnaise / TEM

(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.234 ^[172])

Abbildung 34 zeigt Mayonnaise, die mit TEM untersucht wurde. Diese Methode eignet sich nicht für die Bestimmung der Verteilung der Tropfengrößen, weil dazu entweder viele Bilder nötig wären oder man auf Grund der dünnen Schnitte Korrekturen bei der Angabe der Tropfendurchmesser machen müsste.

Eiweißhaltige Lebensmittel

Fleisch

Für die Untersuchung mittels TEM wird Rindfleisch in 2-%igem Glutaraldehyd in 0,15-%iger Natriumchlorid-Lösung bei einem pH-Wert von 7 fixiert und danach in 1-%igem Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer beim pH-Wert von 7 nachfixiert. Danach wird die Probe mit Ethanol dehydratisiert, in Epon gelagert und mit Bleicitrat und Uranylacetat gefärbt.¹⁷²

Ergebnisse

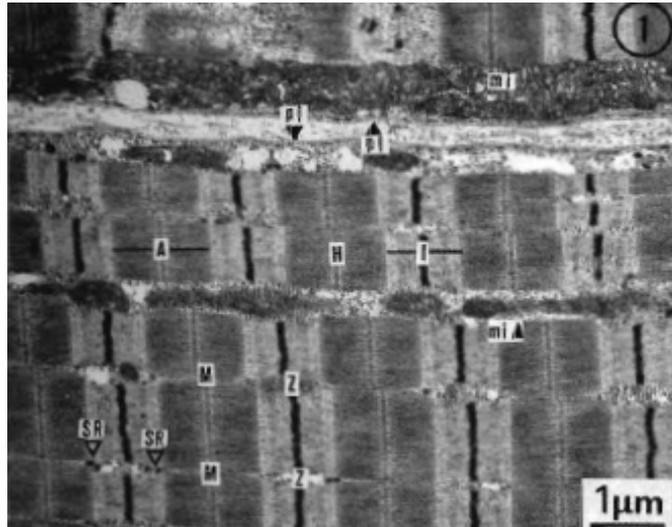


Abbildung 35: Fleisch / TEM

(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.53.^[172])

In Abbildung 35 sind A- (A), I-Bänder (I), die M-Linie (M), Z-Scheiben, die H-Zone (H), Mitochondrien (mi), das Plasmalemma (pl) und das sarkoplasmatische Retikulum (SR) zu sehen.

Für die Untersuchung mittels REM wurde Rindfleisch in 2,5-%igem Glutaraldehyd fixiert, in Ethanol dehydratisiert und mit Amylacetat gefärbt.¹⁷²

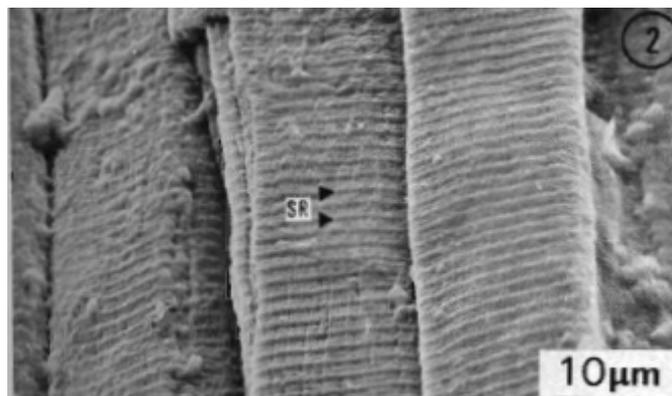


Abbildung 36: Fleisch / REM

(Quelle: Cohen, S. H. et al. (1981). S.53.^[172])

Die meist verwendeten Fixiermittel bei der Fixierung von Fleisch bei der TEM und REM sind Glutaraldehyd³⁵ und Karnovsky'sche Lösung¹⁷³, die eine Kombination von Glutaraldehyd (3%) und Paraformaldehyd (1,5%) ist. Die Karnovsky'sche Lösung ist für die TEM erfunden worden, aber sie wird genauso für die Analyse mittels REM

Ergebnisse

verwendet.^{174,175} Die Konzentration von Glutaraldehyd sollte zwischen 1,7 bis 3,3% betragen.^{176,177}

Bei der Präparation von Fleisch kann man sagen, dass sowohl bei der REM, als auch bei der TEM zwei Schritte gleich sind, das sind die Fixierung mit entweder 1,7- bis 3,3-%igem Glutaraldehyd oder der Kombination von Glutaraldehyd (3%) und Paraformaldehyd (1,5%) und die Dehydratisierung mit Ethanol oder Aceton. Während bei der TEM danach eine Lufttrocknung und eine Lagerung in Epon erfolgt, wird bei der REM entweder CP- oder gefriergetrocknet, danach erfolgt der Gefrierbruch und eine Au-Pd-Behandlung.¹⁷²

Viskose Lebensmittel

Bei viskosen und flüssigen Lebensmitteln, wie zum Beispiel Emulsionen oder Suspensionen, Joghurt, Cremen, Mayonnaise⁶², Milch^{178, 100} und Orangensaft¹⁷⁹ kann die Technik der Verkapselung genutzt werden.

Die Proben werden in Agar-Kapseln gebracht.⁶² Nachdem sie dicht verschlossen werden, werden sie wie feste Proben behandelt, man kann also zum Beispiel dünne Schnitte anfertigen und diese mikroskopieren. Diese Methode kann sowohl für die REM, als auch für die TEM angewendet werden, mit dem Unterschied, dass bei der TEM kleinere Kapseln (dünnere Kapillaren) notwendig sind. Bei der TEM verwendet man Kapillaren mit einem Durchmesser von 0,3 bis 0,5 mm, während man bei der REM einen Durchmesser von 1 mm bevorzugt.

Bei der REM wird Agar (3%) in destilliertem Wasser gelöst, gekocht und dann auf circa 40°C gekühlt. Die Probe saugt man mit einer Pasteurpipette auf, und die Spitze der Pipette taucht man danach in den Agar. Anschließend taucht man die Pipette seitlich in den Agar, sodass eine Art Hülse von 0,5 mm Dicke um die Probe entsteht. Nachdem der Agar fest ist, wird die Hülse entfernt, und die Hülse wird mit der Probe befüllt und mit Agar verschlossen.

In Abbildung 37 ist der Verlauf der Verkapselung schematisch dargestellt.

Ergebnisse

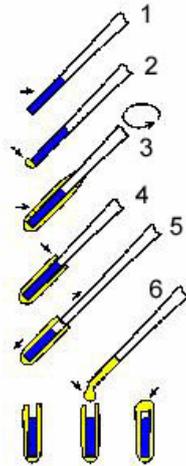


Abbildung 37: Verkapselung

1: Aufsaugen der Probe, 2: mit Agar verschließen, 3: Hülle herstellen, 4: Hülle entfernen, 5: Hülle mit Probe füllen, 6: Hülle verschließen.

(Quelle: <http://www.magma.ca/~scimat/foodmicr.htm>^[31])

Diese beschriebene Methode der Verkapselung ist für Milch nicht anwendbar.¹⁸⁰ Weiters kann die Struktur von manchen Lebensmitteln, wie zum Beispiel Creme und Mayonnaise, durch die Wärme zerstört werden. Bei diesen empfindlichen Lebensmitteln wird eine andere Methode der Verkapselung angewendet, mit der auch zum Beispiel Eidotter untersucht werden kann.¹⁸¹ Bei diesem Verfahren braucht man zwei Spritzen, wobei eine Spritze eine Doppelnadel besitzen muss. Die Probe fließt durch die innere Nadel der einen Spritze, und in der anderen Spritze befindet sich eine 3-%ige Natriumalginat-Lösung, die in der äußeren Nadel die Probe umkleidet. Die Probe und die Lösung werden in eine 0,05 M Calciumchlorid-Lösung bei einem pH-Wert von 6,5 eingeleitet, wo das Natriumalginat ein Gel formt. Die folgende Abbildung zeigt diese Methode der Verkapselung, die vor allem bei wärmeempfindlichen Lebensmitteln Anwendung findet.³¹

Ergebnisse

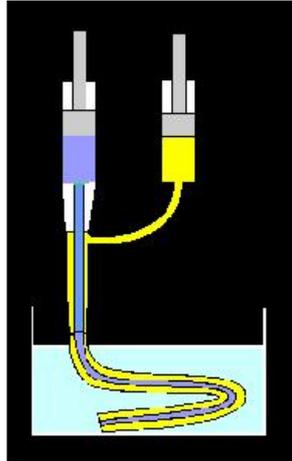


Abbildung 38: Verkapselung

In der linken Spritze in der innen Nadel befindet sich die Probe. Von der rechten Spritze wird Natriumalginat in die äußere Nadel der linken Spritze geleitet.

(Quelle: <http://www.magma.ca/~scimat/foodmicr.htm>.^[31])

Schokolade

Natürliche Fette haben lange, unpolare Ketten, die untereinander Kristalle formen, nachdem die Fette nach dem Schmelzen abgekühlt werden. Man unterscheidet α -, β -, und β' - Kristalle. α - Kristalle haben den niedrigsten Schmelzpunkt im Vergleich zu β - und β' - Kristallen, außerdem wachsen sie am schnellsten, und sie sind die instabilsten der drei Kristallformen. β - Kristalle haben den höchsten Schmelzpunkt und stellen die stabilste Form dar, die β' - Kristalle liegen in Bezug auf die zwei Parameter (Stabilität und Schmelzpunkt) zwischen den α - und β - Kristallen.

Kakaobutter hat sechs Kristallformen, die sich je nach Temperatur ausbilden.

Abbildung 39 zeigt die sechs Kristallformen von Kakaobutter. Die Kakaobutter wurde mit der Gefrierbruchtechnik präpariert und anschließend durch die REM analysiert.

Ergebnisse

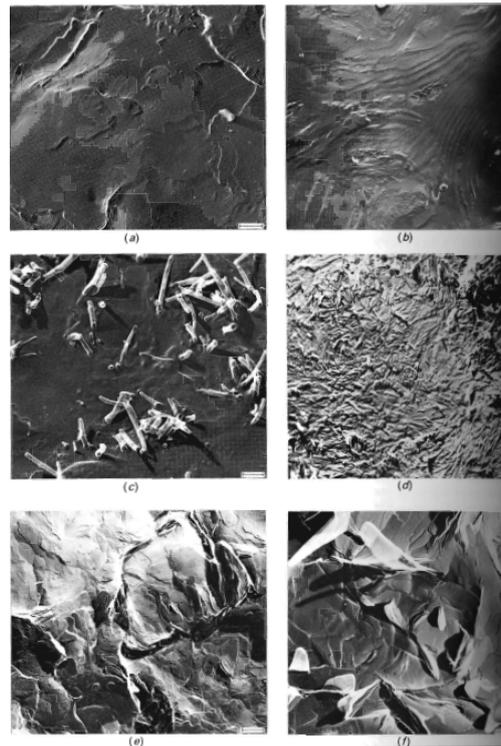


Abbildung 39: Die sechs Kristallformen von Kakaobutter / REM (Gefrierbruchtechnik)
(Quelle: Blanshard, J. M. V. und Mitchell, J. R. (1998). S.288.^[182])

Ein Fehler in der Schokoladenherstellung ist die Ausbildung von Fettbereichen, die an der Oberfläche durch weiße oder graue Bereiche erkennbar sind. Dafür verantwortlich ist die Kristallform VI, die polymorphe Form, welche die stabilste von den sechs Formen darstellt und sich durch lange Kristallnadeln auszeichnet, wie dies in den zwei folgenden Abbildungen ersichtlich ist.¹⁶ Mit der REM kann man diesen Fehler in der Schokolade sehr gut darstellen.

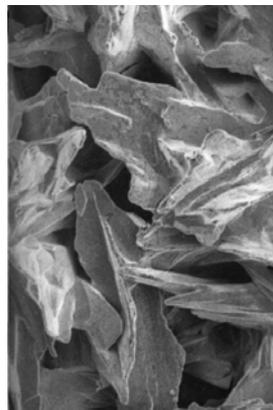


Abbildung 40: Schokoladenfehler: Ausbildung von Kristallnadeln
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.65.^[16])

Ergebnisse

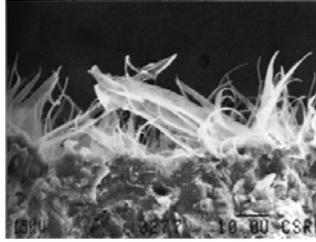


Abbildung 41: Schokoladenfehler an der Oberfläche einer dunklen Schokolade / REM
(Quelle: Blanshard, J. M. V. und Mitchell, J. R. (1998). S.285.^[182])

Es ist auch möglich, Schokolade mit konfokaler Mikroskopie zu untersuchen. Mit Nile Red wird das Fett angefärbt, mit der Methode des Negativ-Kontrasts wird das Bild sichtbar gemacht.

Abbildung 42 zeigt ein Bild von Schokolade, die man in geschmolzenen Zustand mit Nile Red angefärbt hat. Kakao, Zucker und Milchproteine sind durch den Negativ-Kontrast sehr gut zu erkennen.

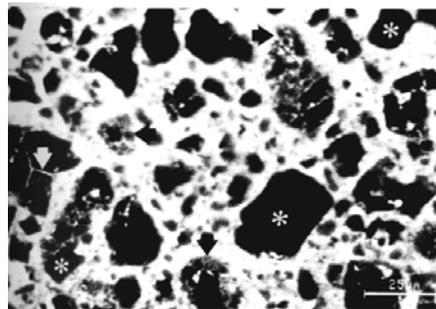


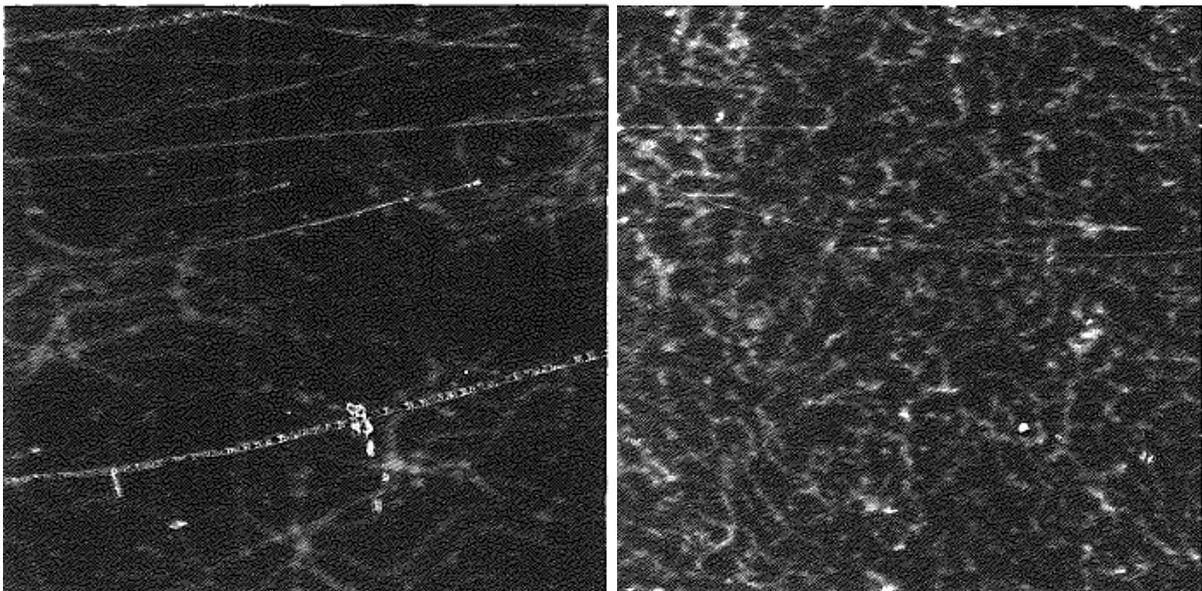
Abbildung 42: Schokolade: Kakao, Zucker, Milchproteine / CLSM (Negativ-Kontrast)
(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.59.^[51])

Die grauen Bereiche stellen die Milchproteine dar, die am Kakao und Zucker hängen. Kakao und Zucker sind die eckigen Strukturen im Bild. Sie schauen sehr ähnlich aus, was die Unterscheidung auf Grund ihrer Morphologie erschwert. Auseinanderhalten kann man die beiden Substanzen aber dadurch, dass Kakao bei 630 nm eine leichte Eigenfluoreszenz aufweist.

Nachteil der CLSM ist, dass es Probleme beim Färben des Präparats gibt. Es ist natürlich viel einfacher, die Schokolade im geschmolzenen als im kristallisierten Zustand einzufärben. Zu beachten ist aber, dass durch diesen Vorgang die innere Struktur angegriffen und verändert wird.

Polysaccharide und Gele

Im Lebensmittelbereich können mit der RKM Gelprozesse von Polysacchariden, wie Pektin, Carrageen, Alginat, Gellan, betrachtet werden, weiters werden auch gute Ergebnisse bei der Untersuchung von Protein- und Polymergelen von verschiedenen Komponenten erzielt.⁵⁴ Bei der Untersuchung von Polysacchariden kann mit der RKM eine höhere Auflösung erreicht werden, als wenn die Analyse mit der Elektronenmikroskopie erfolgen würde.^{54,183,184} Außerdem ist die Untersuchung dieser Lebensmittelgruppe mit der Elektronenmikroskopie nicht beliebt, weil die Proben metallbedampft werden müssten. In der Abbildung 43 sieht man Xanthan-Moleküle auf dem linken Bild und Pektin-Moleküle auf dem rechten Bild. Aus den Bildern erkennt man, dass Pektin eine irregulärere Struktur als Xanthan aufweist. Mit RKM ist es möglich, einzelne Moleküle aus einer heterogenen Substanz zu analysieren.



**Abbildung 43: Xanthan-Moleküle (links), Pektin-Moleküle (rechts) / RKM
(Quelle: Kirby, A. R. (1995). S. 362.^[54])**

Für die Untersuchung mit der RKM wurde Butanol¹⁸⁵ verwendet. Wenn die Analyse an der Luft stattfinden würde, könnte nämlich Wasser (aus der Atmosphäre) auf der Oberfläche der Probe kondensieren.¹⁸⁶

Nachteil dieser Technik ist, dass es eine Zeit lang (ca. 45 Minuten) braucht, bis das System kalibriert wird bzw. stabil ist.⁵⁴

Gemüse

Die REM wird für die Untersuchung von Karotten und Kartoffeln verwendet. Bei diesen Proben wäre es am sinnvollsten, wenn man das Wasser im Gewebe lässt und die Oberfläche ohne Probenfixierung betrachtet. Mit der REM ist das aber natürlich nicht möglich, weil dazu dehydratisierte Proben vorliegen müssten. Daher werden die Karotten mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, in Aceton oder Ethanol dehydratisiert und CP-getrocknet.¹⁴⁹

Bei der Analyse von Tomaten wurde die Kryotechnik mit flüssigem Stickstoff vor der Fixierung angewendet, und danach wurden sie mittels TEM visualisiert.¹⁸⁷

Schäume

Der Faktor, die die Qualität bei Schäumen ausmacht, ist die Verteilung von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und anderen oberflächenaktiven Substanzen. Weiters wichtig sind die Blasengrößenverteilung, der Luftgehalt und die Diffusion¹⁸⁸. Allgemein kann man sagen, dass ein Schaum entsteht, wenn man Gas mit einer Flüssigkeit, die eine oder mehrere oberflächenaktive Substanzen enthält, mischt. Es entsteht dann ein Zweiphasengemisch aus Gasblasen und der flüssigen Matrix. Zur Untersuchung der Druckänderung der Schäume mit der CSLM wird der Schaum auf folgende Weise präpariert: Er wird gemixt und mit Riboflavin gefärbt. Danach wird 0,5 ml davon in eine Druckkammer gegeben, welche 11 bar absoluten Druck erreicht und mit einem CSLM verbunden ist. Mit einem Krypton / Argon-Laser wird die Probe bei einer Wellenlänge von 488 nm abgescannt.¹⁸⁹

Die folgende Abbildung zeigt den Schaum unter einem CSLM.

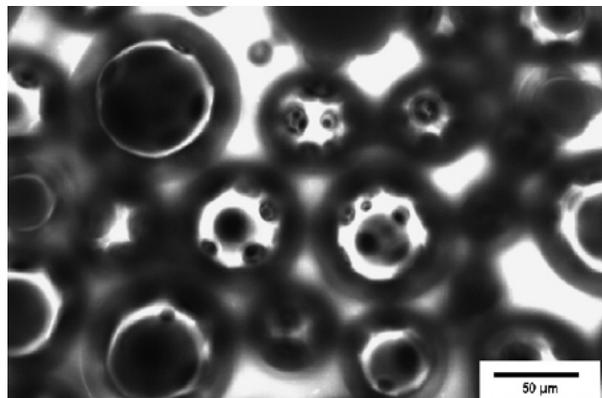


Abbildung 44: Schaum / CSLM
(Quelle: Heuer, A. et al (2007). S.116.^[189])

4.2.5 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Allgemein kann gesagt werden, dass die TEM für die Analyse innerer Strukturen genutzt wird.⁶²

Probenvorbereitung für TEM

Zur Fixierung werden meistens Aldehyde und Osmiumtetroxid verwendet. Natürlich hängt die Auswahl der Substanzen, die zum Fixieren verwendet werden, von der Struktur und der Zusammensetzung der zu untersuchenden Lebensmittel ab.¹⁶ Glutaraldehyde sind notwendig, um Proteine quervernetzen. OsO_4 kann Schwermetalle oxidieren und wird für die Stabilisierung von ungesättigten Fettsäuren genutzt. Somit sind Lebensmitteln mit großem Milchanteil, wie zum Beispiel Milch oder Milchprodukte, leicht zu fixieren, aber Produkte mit hohem Fettanteil bzw. mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren machen Probleme, weil OsO_4 zwar die ungesättigten Fettsäuren fixiert, jedoch die gesättigten auf diesem Weg nicht stabilisiert werden können. Bei der Reaktion zwischen gesättigten Fettsäuren und OsO_4 entstehen zuerst OsO_3 und dann Dirole. Imidazol wird dann eingesetzt, um die von OsO_4 fixierten Fettsäuren zu stabilisieren.

Chemisch schwer zu fixieren sind Lebensmittel mit hohem Polysaccharidgehalt, vor allem mit hohem Gehalt an modifizierter (gelierter) Stärke, also zum Beispiel Pudding, Pasta, Backwaren,... . Bei diesen Produkten wählt man an Stelle der chemischen Fixierung die Kryo-Fixierung.¹³

Ultradünnschichtmethode

Diese Technik wird verwendet, um die Struktur von Wasser-in-Öl- bzw. Öl-in-Wasser-Emulsionen und von Schäumen zu untersuchen. Wassertröpfchen werden bei Lebensmitteln wie zum Beispiel Margarine oder Butter durch Emulgatoren, wie Monoacylglycerole oder Lecithine, stabilisiert.

In der folgenden Abbildung sieht man solche Wassertröpfchen in Margarine. Die weißen Bläschen stellen die Wassertropfen dar, der umliegende Bereich ist Fett.

Ergebnisse

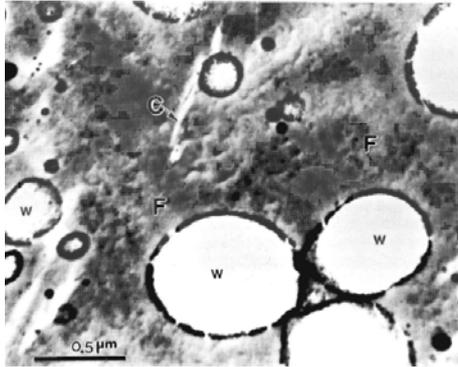


Abbildung 45: Wassertröpfchen in Margarine / TEM (Ultradünnschichtmethode)

W=Wassertröpfchen, F=Fett

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.4.^[51])

Es können genauso Öl-in-Wasser-Emulsionen dargestellt werden. Dies zeigt Abbildung 46, wo Öltröpfchen in homogenisierter Milch zu sehen sind.

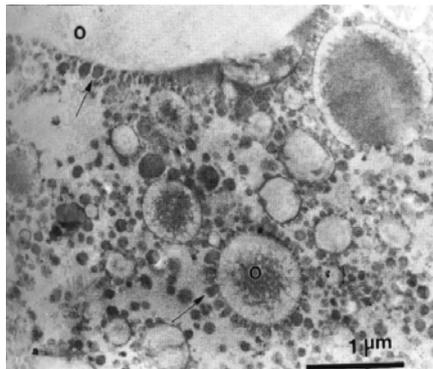


Abbildung 46: Öltröpfchen in homogenisierter Milch / TEM (Ultradünnschichtmethode)

O=Öltröpfchen

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.5.^[51])

Außerdem kann man mit derselben Technik Luftzellen in Nahrungsmitteln, wie zum Beispiel Eiscreme, untersuchen, was in Abbildung 47 sichtbar ist. Die schwarzen Kreise stellen Fettkügelchen, der weiße Bereich in der Mitte Proteine dar.

Ergebnisse

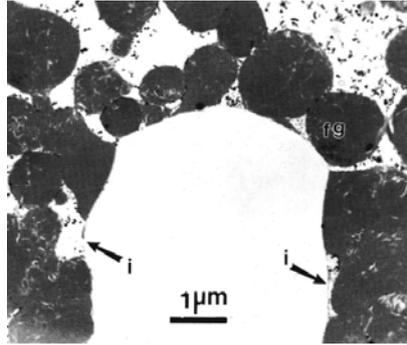


Abbildung 47: Luftzelle in Eiscreme / TEM (Ultradünnschichtmethode)

fg=Fettkügelchen, i=Protein

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.6.^[51])

Negative Straining

Bei dieser Methode gibt es viele Ein- bzw. Beschränkungen.¹⁹⁰ Vor allem hohe Salzkonzentrationen und pH-Wert-Änderungen führen zu falschen Ergebnissen. Polymerfasern, Polysaccharide, Caseinmizellen^{89, 158, 191} und Proteine lassen sich durch diese Technik sehr gut präparieren und darstellen.

Abbildung 48 zeigt Polysaccharidfasern in einem Kurdlan-Gel. Die Probe wurde mit der Technik des Negative Strainings präpariert und anschließend mit einem TEM analysiert.

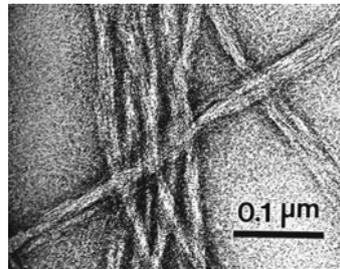


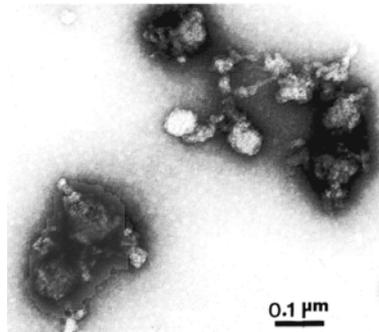
Abbildung 48: Polysaccharidfaser in Kurdlan-Gel / TEM (Negative Straining)

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.9.^[51])

Weiters kann Negative Straining auch eingesetzt werden, um bei Milchprodukten die Verbindung zwischen dem Molkenprotein β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen oder κ -Casein zu untersuchen. Dieser Zusammenhang hat nämlich eine Bedeutung für die Eigenschaften der Milchprodukte. Diese Molkenproteine wurden in Abhängigkeit mit dem pH-Wert untersucht. Während bei einem pH-Wert von 6,5 β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen stark interagieren, gibt es bei einem pH-Wert von 7 keine Reaktion. Diesen Unterschied sollen die zwei nächsten Abbildungen verdeutlichen. Das obere

Ergebnisse

Bild zeigt eine starke Interaktion zwischen β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen, während im unteren Bild nur eine schwache Reaktion erkennbar ist.



**Abbildung 49: Starke Interaktion zwischen β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen / TEM
(Negative Straining)**

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.10.^[51])

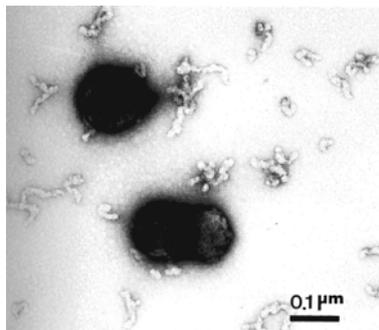


Abbildung 50: TEM / Negative Straining: Schwache Interaktion zwischen β -Lactoglobulin und Casein-Mizellen

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.11.^[51])

Oberflächenabdruck

Mit dieser Methode können Makromoleküle, wie zum Beispiel DNA, Polysaccharide, wie zum Beispiel Xanthan oder Carrageen, Proteine und Fettkristalle, untersucht werden. Sie wird vor allem für die Analyse von Wasser-in-Öl- bzw. Öl-in-Wasser-Emulsionen, Proteinen in Milch, Gelen von Biopolymeren und stärkehaltigen Lebensmitteln genutzt.

Die folgende Abbildung zeigt Wassertröpfchen in Margarine.

Ergebnisse



Abbildung 51: Wassertröpfchen in Margarine / TEM (Oberflächenabdruck)

S=Oberfläche, C=Wassertröpfchen.

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.24.^[51])

Kryotechnik

Mit dieser Methode kann zum Beispiel Eiscreme untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine komplexe Struktur von großen Eiskristallen, Luftzellen, Öltröpfchen, Zucker und Biopolymeren.

Folgende Abbildung zeigt Eiscreme, gut ersichtlich sind die großen Luftblasen.

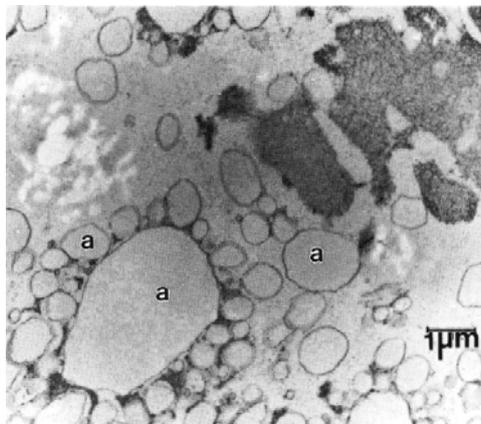


Abbildung 52: Luftzellen in Eiscreme / TEM (Kryotechnik)

a=Luftzellen

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.28.^[51])

Weiters sind die Fettverteilung und die dichte Proteinmatrix in Käse durch diese Methode analysierbar.

Abbildung 53 zeigt diese zwei Faktoren bei einem Low-fat-Käse.

Ergebnisse

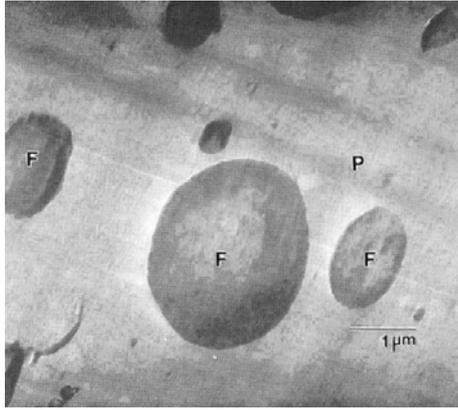


Abbildung 53: Verteilung von Fett und Protein in einem Low-fat-Käse / TEM (Kryotechnik)

F=Fett, P=Protein

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.26.^[51])

Für die Analyse von Wasser-in-Öl-Emulsionen ist diese Methode ungeeignet.⁵¹

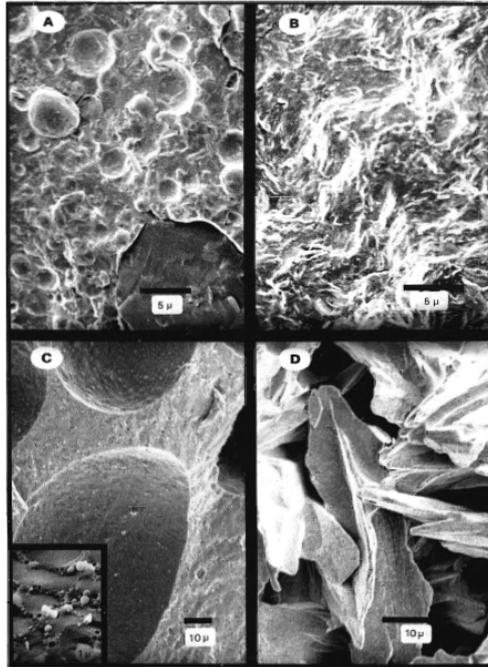
4.2.6 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die REM eignet sich besonders gut dazu, die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Objekt und Elektronenstrahl zu studieren.¹⁷

Kryo-Technik

Die nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung von Brot, Butter, Eiscreme und Schokolade.

Ergebnisse



**Abbildung 54: (a) Brot, (b) Butter, (c) Eiscreme, (d) Schokolade / REM (Kryotechnik)
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.36 ^[16])**

Für die Untersuchung von Fett bzw. fettreichen Produkten wird die Kryo-REM am häufigsten angewendet, weil deren Präparation für eine andere mikroskopische Technik zu aufwendig ist.¹³ Noch häufiger wird die Methode der polarisierten Lichtmikroskopie benutzt, doch die Kryo-REM bietet den Vorteil, dass vor allem auch fettreiche Proben mit hohem Fett-Feststoffanteil analysiert werden können, was mit der Lichtmikroskopie nur beschränkt möglich ist und oft Probleme bereitet. Trotzdem ist die Technik der polarisierten Lichtmikroskopie beliebter, weil die Probenpräparation einfach ist und die Methode schärfere und bessere Bilder erzeugt.¹⁵⁷

Nachteil der Kryo-REM ist, dass sich Eiskristalle bilden können, welche die natürlichen Bestandteile des Lebensmittels „verdrängen“ und somit die innere Struktur verändern. Um das Risiko dieses Problems zu reduzieren, wird eine kleinere Menge an Probe bei sehr tiefer Temperatur verwendet.¹³

Atmosphärisches Rasterelektronenmikroskop

Hier betrachtet man die Probe in gasförmiger Atmosphäre bei schwachem Unterdruck. Bei dieser Methode braucht man die Probe nicht zu trocknen, außerdem ist ein weiterer Vorteil, dass die Präparation des Lebensmittels für die Analyse einfacher und unkomplizierter ist.

Ergebnisse

Fixierung

Stärkereiche und eiweißarme Lebensmittel, wie zum Beispiel gekochte Spaghetti, braucht man nicht zu fixieren, weil es keine passende Technik für die Fixierung von Stärke gibt, da diese in Lebensmitteln meistens in gelierter Form vorliegt¹⁵⁸. Stärkehaltige Lebensmittel werden in der Regel gefroren, gefriergebrochen⁸⁹ und – getrocknet.

Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Proteinen müssen hingegen fixiert werden. Der Gefrierbruch kann vor oder nach der Fixierung passieren.

Lebensmittel, die viel Fett enthalten, wie Butter oder Mayonnaise, oder Produkte mit gelierter Stärke wie Backwaren, ebenfalls Schäume und Produkte, die im gefrorenen Zustand gegessen werden, wie beispielsweise Eiscrème, können für die Analyse mit REM nicht ohne Weiteres dehydratisiert und getrocknet werden. Entweder sie werden schnell gefroren und gefriergebrochen, oder man hat eine eigene Einrichtung am REM, die es erlaubt, die Proben bei -70°C gekühlt zu halten, während sie gefriergebrochen und mit Kohlenstoff und / oder Gold bedampft werden.¹⁵⁸

Lufttrocknen

Die Technik des Lufttrocknens wird bei Brot¹⁴⁹, Sojabohnen^{192, 193} und Fleisch¹⁹⁴ angewendet.

Abbildung 55 zeigt ein Bild von Mehlpartikel, deutlich zu erkennen sind die Stärke und Proteine.

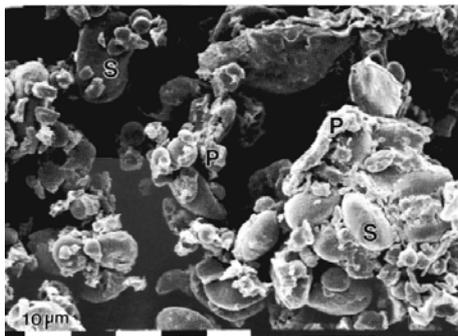


Abbildung 55: Mehlpartikel / REM (Lufttrocknen)

S=Stärke, P=Protein

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.30.^[51])

Gefriertrocknung

Diese Methode wird bei Joghurt sehr gerne angewendet.

Ergebnisse

Die folgende Abbildung zeigt Joghurt, man sieht Bakterien, extrazelluläre Polysaccharide und Proteine.

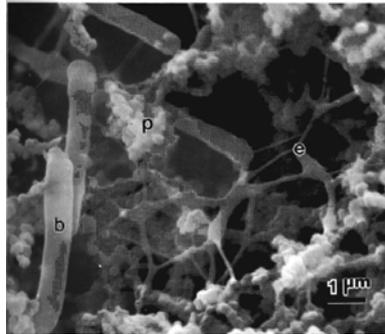


Abbildung 56: Joghurt / REM (Gefriertrocknung)

b=Bakterien, e=extrazelluläre Polysaccharide, P=Proteine.

(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.31.^[51])

CP-Trocknung

Die Trocknung am kritischen Punkt wird vor allem für eiweißreiche Produkte verwendet, wie zum Beispiel für Fleisch¹⁹⁴, Milchprodukte⁵¹ und pflanzliche Proteine¹⁹⁵. Lebensmittel, die gelierte Stärke enthalten, werden nicht mit dieser Technik behandelt, da hier Probleme auftreten können. Das gilt zum Beispiel für Pasta, Pudding, Backwaren, aber auch für Salatdressings, einige Joghurts,...¹⁵⁸ Bei Vorliegen solcher Produkte greift man auf die Technik der Gefriertrocknung zurück.¹⁴⁹

Lebensmittel

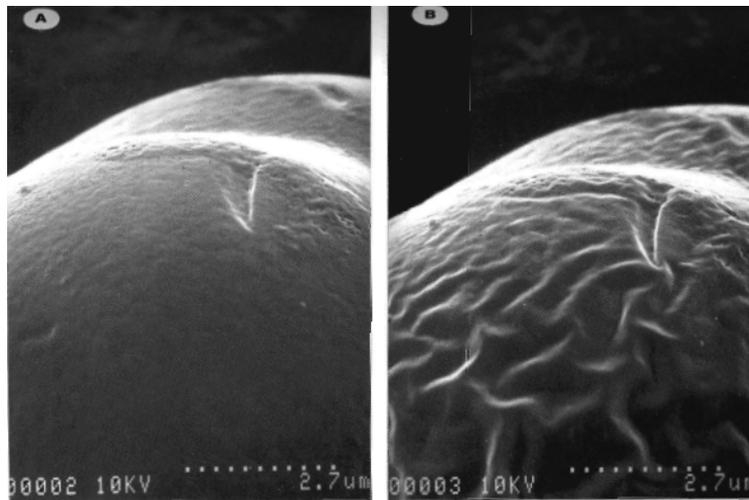
Die REM wird für die Untersuchung von Fleischprodukten, Milchprodukten, Sojabohnenprodukten, Gemüse, Teig, Getreideprodukte, Spaghetti,... genutzt. Die Präparationsmethoden unterscheiden sich bei den jeweiligen Produkten. Grundsätzlich werden die Proben von Bereichen von ein bis zwei cm Tiefe genommen, weil die Oberfläche durch äußere Effekte verändert sein kann. Bei wasserhaltigen Proben muss getrocknet oder gefroren werden. Bei der Analyse innerer Mikrostrukturen pulverförmiger Lebensmittel werden die Partikel mit einem Messer oder in einem Mörser gebrochen.¹⁵⁸ Proben wie Joghurt, Tofu, Pasta und einige Käsearten werden in Teilen von 0,5 x 5 x 5 mm geschnitten, wovon wiederum 0,5 x 1 x 5 mm große Prismen entnommen werden. Fleisch und Mozzarella werden in 0,5 x 0,5 x 5 mm große Stücke geschnitten.¹⁹⁴ Bei der Probenvorbereitung von

Ergebnisse

Fleisch ist erwähnenswert, dass die Proben entweder parallel oder senkrecht zu den Fasern geschnitten werden sollen.¹⁵⁸ Eine andere Technik bei Fleisch ist, es in Harz einzubetten und die Methode des Gefrierbruchs anzuwenden.¹⁹⁶

Mögliche Veränderungen

Bei der Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop gibt es zwei kritische Punkte, einerseits mögliche Veränderung durch den Elektronenstrahl, andererseits Schädigungen der Probe durch das Vakuum. Abbildung 57 zeigt zwei Bilder von Stärkekörnern, wobei am rechten Bild Stärkekörner erkennbar sind, die durch Elektronenstrahlen beeinträchtigt wurden.



**Abbildung 57: Stärkekörner (A) nicht beschädigt, (B) beschädigt durch den Elektronenstrahl
(Quelle: Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). S.39.^[16])**

4.2.7 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln, insbesondere von Emulsionen, muss man beachten, dass der Brechungsindex von Lebensmitteln, die mit CLSM untersucht werden, den Winkel, mit dem die Lichtstrahlen auf das Produkt fallen, beeinflusst. Wo Licht gebrochen wird, wird es auch reflektiert. In Abbildung 58 wird der Verlauf von Lichtstrahlen durch die Probe schematisch dargestellt.

Ergebnisse

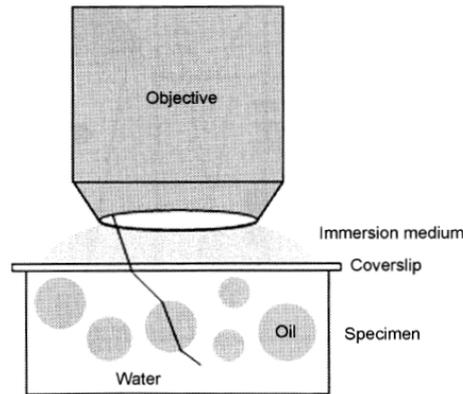


Abbildung 58: Verlauf der Lichtstrahlen auf Grund des sich ändernden Brechungsindex
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.240.^[157])

Es wird eine Wasser-in-Öl-Emulsion untersucht. Das Deckglas hat den gleichen Brechungsindex wie das Objektiv, doch sobald die Strahlen auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe kommen, werden sie gebrochen, und sie werden wieder gebrochen, wenn sie von Wasser auf Öl bzw. wieder in die Wasserphase stoßen. Dieses Phänomen führt zu einer Verringerung der Auflösung und Intensität in der axialen Ebene, und außerdem kann es so weit kommen, dass Distanzen in der Probe geometrisch falsch abgelesen bzw. interpretiert werden.

Zur Veranschaulichung dieses Phänomens zeigt die Abbildung 59 die Untersuchung einer Mayonnaise, die zu 70% aus Fett besteht.

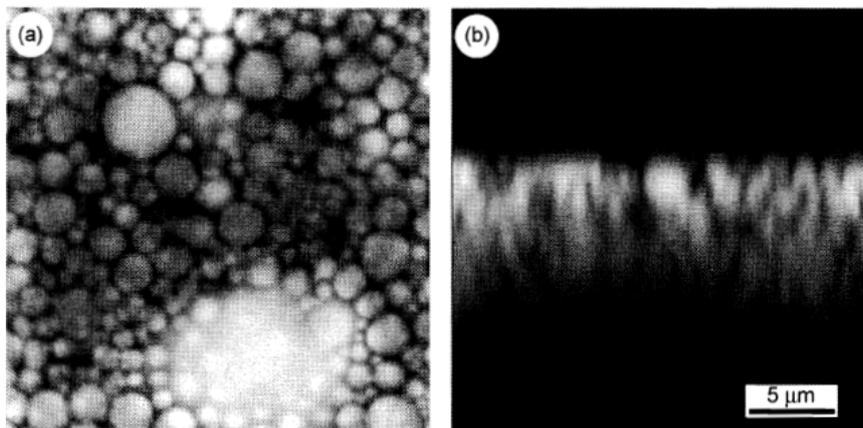


Abbildung 59: Mayonnaise (70% Fett) / CLSM
(a) x-y- Aufnahme; (b) x-z- Aufnahme
(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.241.^[157])

Links sieht man die Auflösung in der x-y-Ebene, rechts das gleiche Bild in der x-z-Ebene. Hier ist die Abnahme an Auflösung deutlich ersichtlich, aber auch im linken

Ergebnisse

Bild kann man die hellen, täuschenden Teile, die die Öltröpfen teilweise überdecken, beim genaueren Hinsehen erkennen.

Um dieses Problem zu verhindern, wird eine andere Darstellungsweise gewählt, bei der es ausschlaggebend ist, den Brechungsindex von allen Komponenten so ähnlich wie möglich zu machen. Abbildung 60 zeigt eine Analyse von einer Emulsion, die 55% Öl beinhaltet.¹⁵⁷

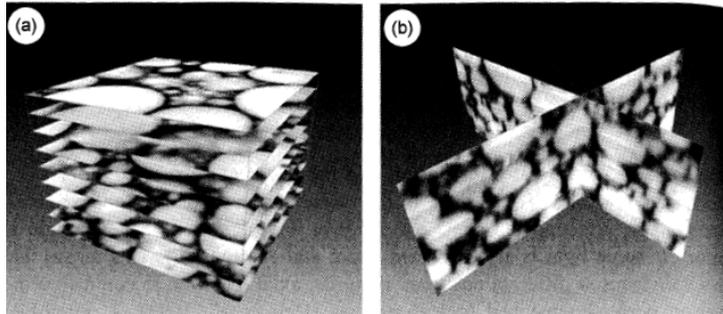


Abbildung 60: Emulsion (55% Öl) / CLSM

(a) 3-D-Bild; (b) vertikaler Querschnitt durch (a)

(Quelle: McClements, D. J. (2007). S.242.^[157])

Negativ-Kontrast

Hat man eine Ölphase im Objekt vorliegen, kann man Nile Red zur Färbung verwenden. Wenn Öl eine disperse Phase in Wasser ist, färbt man mit Nile Blue, welches bei den Wellenlängen, die für CLSM verwendet werden, nicht fluoresziert, aber kleine Mengen von Nile Red enthält, das in die Öltröpfchen migriert.⁵¹

Fettkristalle können nicht gefärbt werden, weil das Färbemittel durch das Kristallnetz nicht durchkommt. Daher verwendet man für solche Lebensmittel die Methode des Negativ-Kontrasts.

Abbildung 61 zeigt Fett, das mit Nile Red eingefärbt wurde. Die Ölphasen fluoreszieren, während die nicht gefärbten Fettkristalle und Kristallaggregate durch die Methode des Negativ-Kontrasts sichtbar gemacht wurden.

Ergebnisse

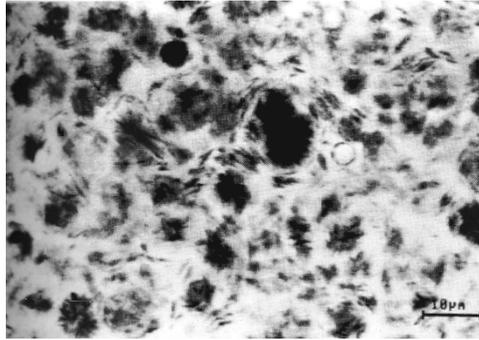


Abbildung 61: Fett / CLSM (Negativ-Kontrast)
Fett, fluoreszierende Ölphasen und Fettkristalle
(Quelle: Dickinson, E. (1995). S.57.^[51])

Bei der Anschaffung eines CLMS sollte auf ein Gerät mit stufenverstellbaren Zusatzinstrumenten geachtet werden, womit die Probe direkt unter dem Mikroskop verändert werden kann. Hierzu zählen zum Beispiel Zeit-Temperatur-Schalter. Zusätzlich sollte auch die umgebende Atmosphäre und der Druck kontrolliert werden können.

4.2.8 Rasterkraftmikroskopie (RKM)

Mit der RKM erzielt man im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie eine höhere Auflösung. Mit dieser Technik ist es möglich, Chromosomen von Menschen anzuschauen. Man hat diese Technik auch genutzt, um die Struktur des Moleküls Myosin zu untersuchen.

Die RKM ist besonders für die Analyse der Oberfläche von Lebensmitteln geeignet. Es können bakterielle Biofilme und Oberflächenbewuchs eines Lebensmittels von Mikroorganismen einerseits, wie auch Schäume, Emulsionen und Proteinoberflächen untersucht werden.⁵⁴

4.3 Überblick über spezielle Lebensmittelgruppen und dazugehörigen Technik und Diskussion

4.3.1 Allgemein

Allgemein kann gesagt werden, dass es sehr schwer ist, Nahrungsmittel elektronenmikroskopisch zu visualisieren. Jeder Schritt bei der Präparation der Probe verändert in gewissem Maße die Probe. Außerdem wird die Probe durch

Ergebnisse

beabsichtigtes und auch unbeabsichtigtes Zugeben von Wasser, Fett oder anderen Substanzen umgeformt, indem einzelne Bestandteile modifiziert werden.¹³

Bei der Identifikation und Analyse von Strukturen ist es wichtig, dass man mehrere Techniken anwendet, um Vergleiche anstellen zu können und nicht falsche Schlüsse zieht. Außerdem ist es von Bedeutung, eine Methode zu finden, die die Aufgabenstellung zufriedenstellend erfüllen kann. Zum Beispiel hat es keinen Sinn, eine sehr hohe Vergrößerung zu wählen, wenn man sich Makroelemente und –strukturen anschauen möchte. Dieses Vorgehen wäre nur kostenspielig und zeitaufwendig und hat nichts mit dem eigentlichen Untersuchungsziel zu tun. Man sollte am Anfang auch entscheiden, ob man eine Oberflächenmethode wählt oder die inneren Strukturen einer Probe betrachten möchte. Während bei der REM die Oberfläche der Probe untersucht wird, werden bei der TEM die inneren Strukturen analysiert und visualisiert.¹³ Dazu muss die Probe aufwändig präpariert werden.

Die Vorbereitung der Proben für die TEM ist schwerer und komplizierter als für andere Typen von Mikroskopen, weil die Probe in sehr dünne Teile geschnitten werden muss, gewöhnlich handelt es sich um 50 bis 100 nm dicke Proben. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie, wo man es mit Dicken zwischen 500 und 1000 nm zu tun hat, ist dies eine Herausforderung. Wenn die Probe nämlich zu dick ist, kann der Elektronenstrahl nicht durch die Probe durchdringen, und man erzielt kein Ergebnis. Die Dicke der Probe geht aber mit dem Kontrast einher: Beim Lichtmikroskop konnte man dieses Problem durch Einfärben der Präparate lösen. Der Elektronenstrahl bei der Elektronenmikroskopie macht jedoch keinen Unterschied zwischen Farben. Daher werden Substanzen verwendet, die die molekulare Dichte von bestimmten Bestandteilen erhöhen. Dazu zählen Schwermetalle wie zum Beispiel Osmium, Blei, Wolfram und Uransalze.

Weiters ist darauf zu achten, dass man sich eine Struktur in verschiedenen Vergrößerungen anschaut, und vor allem ist eine große Anzahl von Proben von Bedeutung. Abhängig vom Forschungsziel ist es auch wichtig, dass man sich nicht in Details verliert, sondern den Überblick über die Organisation der Gesamtstruktur bewahrt.

Die Auflösung ist auch eine entscheidende Größe für die Entscheidung über das anzuwendende Verfahren. Im Vergleich zur CSLM, mit der man Strukturen bis 0,2 μm ⁵⁰ betrachten kann, ist dies mit der TEM und REM bis 0,2 bzw. 1 nm möglich¹⁵⁷.

Ergebnisse

In den folgenden Tabellen findet sich ein Überblick von den verschiedenen Lebensmittelgruppen und der dazu passenden Techniken zur Untersuchung dieser Produkte. Unter dem Punkt „Analyse“ werden genaue Anwendungsbereiche der Methoden bei speziellen Lebensmitteln aufgezählt.

Tabelle 10: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik - Milch und Milchprodukte

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung	
Milch und Milchprodukte I	Milchprodukte (allgemein)		REM (CP-Trocknung)		
	Getrocknete und viskose Milchprodukte (Milchpulver, Creme, Butter,...)		REM (Trocknen / Trocknen / Gefrieren und Replikation mit Gold / Gefrieren und Gold- oder Kohlenstoff-Behandlung)	Komplexe Präparation	
	Suspensionen (Flüssige Milch, Creme, ...)		TEM (Negative Straining / Metallschatten-Technik / Ultramikrotomie)	Komplexe Präparation	
	Milch	Caseinmizellen		RKM	Einfache Präparation
		Proteine in der Milch		TEM (Oberflächenabdruck)	
		Struktur von Magermilch		CLSM	
	Milchpulver	Nadelähnliche Kristalle von Laktose		REM (Trocknen mit heißer Luft)	
		Oberfläche		CLSM (Negativ-Kontrast)	
	Milchsäume	Aufbau der Grenzfläche Luft/Wasser		TEM (Oberflächenabdruck)	

Ergebnisse

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung
Milch und Milchprodukte II	Joghurt	Einflüsse durch Prozessänderungen (Temperatur- und Druckänderungen)	CLSM	
			REM (Gefriertrocknung)	
	Käse	Gefrierbruch	TEM (Oberflächenabdruck)	
			REM (CP-Trocknung)	
			CLSM (Negativ-Kontrast)	
			CLSM (Negativ-Kontrast)	
	Verteilung von Proteinen und Fett in Käse	TEM (Kryo-Technik)		
Joghurt, Topfen, Käse, Tofu		REM (CP-Trocknung)	Zusätzliche Behandlung (Chloroform, n-Hexan) für fettreiche Produkte (Käse, Topfen)	
Cottage Cheese		REM (CP-Trocknung / Gefrierfixation und Gefriertrocknung / Gefrierbruch)		

Ergebnisse

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung
Milch und Milchprodukte III	Eiscreme	Größe von Eiskristallen	REM (Kryo-Technik)	
		Analyse von Fett und Proteinen	TEM (Ultradünnschichtmethode / Kryotechnik)	
	Gele, Creme (z.B. Eierscreme, Pudding, Vanillesoße, gelierte Milch, Topfen)	Veränderung der Struktur während Temperaturänderungen, Wechselbeziehung zwischen Milchproteinen und Polysacchariden, Analyse von Exopolysacchariden, Lokalisation von Proteinen und Fett, Untersuchung von Emulsionen	CSLM	
	Pudding		REM (Gefriertrocknung)	
		CSLM		

Ergebnisse

Tabelle 11: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik - Stärkehaltige Lebensmittel

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung
Stärkehaltige Lebensmittel	Allgemein		TEM (Oberflächenabdruck)	
	Stärkekörner	Stabilität und Festigkeit von Stärkekörner	RKM	
			REM	
	Kartoffeln	Kochprozess (Matschigwerden)	REM	
	Getreideprodukte		CLSM	Färbung mit Nile Blue
	Getreidesnacks		REM	
	Süßigkeiten		CLSM	
	Backwaren		CLSM	
			REM (Gefriertrocknung)	
	Weizenteig		CLSM	Färbung
	Brot		REM (CP-Trocknung / Kryo-REM / Lufttrocknung / Gefriertrocknung)	
Pasta		REM (Gefriertrocknung)		

Ergebnisse

Tabelle 12: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Fetthaltige und eiweißhaltige Lebensmittel

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung	
Fetthaltige Lebensmittel	Fett bzw. fettreiche Produkte (Butter)		REM (Kryo-REM)	Bildung von Eiskristallen	
		Analyse von Fettkristallen	TEM (Oberflächenabdruck)		
	Margarine und Butter		CLSM	Färbung mit Nile Red	
			REM (Kryo-REM)		
	Emulsionen (z. B. Salatdressing, Mayonnaise)	Größe und Verteilung der Wassertröpfchen		CLSM (Negativ-Kontrast)	
				REM (CP-Trocknung / Gefriertrocknung)	
		Öltröpfchen in homogenisierter Milch		TEM (Ultradünnschichtmethode)	
				RKM	
Eiweißhaltige Lebensmittel	Pflanzliches Eiweiß (z. B. Sojabohnen)		REM (Luftrocknung / CP-Trocknung)		
	Fleisch		TEM (Ultradünnschicht-Methode / Luftrocknung)		
					REM (Luftrocknung / CP-Trocknung / Gefriertrocknung)

Ergebnisse

Tabelle 13: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Viskose Lebensmittel, Schokolade, Polysaccharide und Gele, Proteine und Polysaccharide, Gemüse, Schäume

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung
Viskose Lebensmittel	Joghurt, Cremen, Mayonnaise, Milch, Orangensaft		TEM / REM (Verkapselung)	
Schokolade		Kristallformen von Kakaobutter	REM (Kryo-REM / Gefrierbruch)	
		Analyse von Kakao, Zucker und Milchproteine	CLSM (Negativ-Kontrast)	Probleme beim Färben (Nile Red)
Polysaccharide und Gele	Polysaccharide (z.B. Pektin, Carrageen, Alginat, Gellan)		RKM	Präparation mit Butanol
			TEM (Oberflächenabdruck)	
	Polysaccharidfasern		TEM (Negative Straining)	
Proteine und Polysaccharide	Lokalisation von Proteinen und Polysacchariden	Molkenproteine in Fleischprodukte	Immunchemische Methode	
	Molkenproteine		RKM	

Ergebnisse

Lebensmittelgruppe	Anwendung / Beispiele	Analyse	Methode	Anmerkung
Gemüse	Karotten, Kartoffeln		REM (CP-Trocknung)	
	Tomaten		TEM (Kryo-Technik)	
Schäume		Verteilung von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und anderen oberflächenaktiven Substanzen	CLSM	Druckkammer
			RKM	
			REM	

Ergebnisse

Ergebnisse

Anm. zu Tabelle 13:

Alle angeführten Techniken in der Spalte „Methode“ mit Ausnahme der Technik „Verkapselung“ und „Immunchemische Methode“ können im Methodik-Teil nachgelesen werden. Die Beschreibung der „Verkapselung“ und der „Immunchemischen Methode“ findet man im Ergebnissteil, unter dem Unterpunkt „viskose Lebensmittel“ („Verkapselung“) und „Immunchemische Methode“ („Immunchemische Methode“).

Tabelle 14: Lebensmittelgruppe und dazu passende Technik – Überblick

Lebensmittelgruppe	TEM	REM	CLSM	RKM
Milch und Milchprodukte	++	++	+	+
Stärkehaltige Lebensmittel	~	~	+	+
Fetthaltige Lebensmittel	~	+	++	+
Eiweißhaltige Lebensmittel	~	~	-	+
Viskose Lebensmittel	+	+	-	-
Schokolade	-	+	~	-
Polysaccharide	~	-	-	+
Gemüse	+	+	-	-
Schäume	-	+	+	++

Anm.:

- ++ sehr geeignet für die Analyse dieser Lebensmittelgruppe**
- + geeignet für die Analyse dieser Lebensmittelgruppe**
- ~ mittelmäßig geeignet für die Analyse dieser Lebensmittelgruppe**
- nicht geeignet für die Analyse dieser Lebensmittelgruppe**

In der Tabelle 14 sieht man einen Überblick über verschiedene Methoden, die sich für die Untersuchung unterschiedlicher Lebensmittelgruppen eignen. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der vorherigen Tabelle und der Ergebnisse dar.

4.3.2 Elektronenmikroskopie (TEM, REM)

Die Elektronenmikroskopie gibt Aufschlüsse über die Struktur vieler Lebensmittel, ist aber für bestimmte Produkte, wie zum Beispiel größere Proteine oder Polysaccharide, nur beschränkt einsetzbar. Die Elektronenmikroskopie eignet sich für die Untersuchung von Milch und Milchprodukte hervorragend, wobei die TEM eher für flüssige und die REM für feste bzw. viskose Produkte eingesetzt wird.

Da Lebensmittel mit hohem Fettanteil bzw. mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren und auch Lebensmittel mit hohem Polysaccharidgehalt, vor allem mit

Ergebnisse

hohem Gehalt an modifizierter (gelierter) Stärke, schwer zu fixieren sind, ist es nicht ratsam, die TEM für diese Produkte zu verwenden. Milch und Milchprodukte hingegen sind mit der TEM leicht zu fixieren.

Die REM ist für stärkehaltige Produkte ebenfalls nicht üblich, weil es keine passende Technik für die Fixierung derartiger Lebensmittel gibt. Sie wird aber für die Untersuchung von Fleischprodukten, Milchprodukten, Sojabohnenprodukten, Gemüse, Teig und Getreideprodukte genutzt.

Nachteilig an dieser Methode ist, dass man sich in Details verlieren kann, indem man sich durch die vorhandene Vergrößerung auf die Mikrostruktur, auf Einzelheiten oder Bestandteile konzentriert und das Lebensmittel nicht mehr als ein Kontinuum, also Ganzes, betrachtet.

Die Probenpräparation ist bei der REM viel einfacher als bei der TEM. Das heißt natürlich nicht, dass es nie Probleme in der Probenvorbereitung gibt, sondern dass die Aufbereitung im Allgemeinen leichter und unkomplizierter im Vergleich zur TEM verläuft.¹⁶

Bei der Untersuchung mittels REM¹⁹⁷ und TEM wird durch das Einstellen von großen Spannungen die Oberfläche zerstört. Daher sollte man darauf achten, dass man nur eine geringe Spannung von wenigen kV anlegt, um eine Schädigung der Probe zu verhindern bzw. zu minimieren.

4.3.3 CLSM

Vorteile in der CLSM liegen vor allem in der Untersuchung von fettreichen Lebensmitteln. Diese werden nämlich durch konventionelle Mikroskopie stark verändert, indem Fett verloren geht. Außerdem kann man mit CLSM auch große und lose Proben betrachten. Die Probe muss nicht dünn geschnitten werden, und daher wird die Grundstruktur nicht angegriffen. Die Methode ist auch beliebt, weil die Möglichkeit gegeben ist, die Probe direkt unter dem Mikroskop zu verändern und die Veränderungen dabei zu betrachten.¹⁵⁷

4.3.4 RKM

Die RKM ist besonders für die Analyse der Oberfläche von Lebensmitteln geeignet, im Speziellen für Schäume, Emulsionen und Proteinoberflächen.

Ergebnisse

Die große Vorteile der RKM sind, dass sich die Probe nicht im Vakuum befinden und sie nicht geschnitten werden muss und außerdem, dass sie für die Untersuchung nicht elektrisch leitend sein muss.

5 Zusammenfassung

Die Textur und Struktur von Lebensmitteln stellen wichtige Qualitätskriterien dar. Für eine objektive Untersuchung dieser Eigenschaften werden verschiedene Methoden eingesetzt. Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf Elektronenmikroskopie (Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie), konfokale Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie.

Während bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) die Probe mit Elektronen durchstrahlt wird, wird bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Oberfläche von einem Elektronenstrahl abgerastert. Auch die konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) und die Rasterkraftmikroskopie (RKM) stellen Oberflächenmethoden dar, bei denen die Oberfläche „abgetastet“ wird.

Für folgende Lebensmittel wurden passende Techniken zur Untersuchung deren Struktur herausgearbeitet: Milch und Milchprodukte, stärke-, fett- und eiweißhaltige Lebensmittel, viskose Lebensmittel, Schokolade, Polysaccharide, Gemüse und Schäume.

Während bei getrockneten und viskosen Milchprodukten die REM die beliebteste Methode darstellt, wird bei Suspensionen und flüssigen Milchprodukten die TEM angewendet. Bei stärkehaltigen Lebensmitteln nimmt man die CLSM und RKM, bei fetthaltigen Lebensmitteln bringt die CLSM viele Vorteile. Bei eiweißhaltigen Lebensmitteln, Polysacchariden und Schäumen wird die RKM angewendet, bei viskosen Produkten und Gemüse greift man auf die Elektronenmikroskopie zurück. Schokolade kann mit der REM analysiert werden.

Für die einzelnen Methoden gibt es verschiedene Arten der Präparation der Lebensmittel. Bei der TEM wird grob zwischen „Ultradünnschicht-Methode“, „Oberflächenabdruck“ und „Negative Straining“ unterschieden. Bei der REM gibt es zwei große Verfahren, den „Oberflächenabdruck“ und die „Kryo-REM“. Vorteil von der CLSM und RKM ist, dass die Proben nicht geschnitten werden müssen. Bei der CLSM kann man die Methode des „Negativ-Kontrasts“ anwenden, bei der RKM kann man zwischen zwei Betriebsarten (Kontakt-Modus und Nicht-Kontakt-Modus) unterscheiden. Abhängig von der Konsistenz und Struktur der Lebensmittel und vom Ziel der Untersuchung wird eine passende Methode gewählt.

6 Summary

The texture and structure of food are very important for its quality. There are different methods for an objective analysis of these qualities, this thesis gives an overview about Electron Microscopy (Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy), Confocal Laser Scanning Microscopy and Atomic Force Microscopy.

With a Transmission Electron Microscope (TEM) the sample is transilluminated by electrons, with a Scanning Electron Microscope (SEM) the surface is scanned by an electron beam. The Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and the Atomic Force Microscopy (AFM) also characterize the surface of food.

For the analysis of the food structure there are suitable methods for following products: milk and milk products, starch, fat, proteins, viscous food, chocolate, polysaccharides, vegetables and foams.

For dried and viscous milk products REM is the most popular method, for suspensions and liquid milk products TEM is used. The analysis of starch is made by CLSM and RKM, CLSM has many advantages for the study of fat. RKM is used for proteins, polysaccharides and foams, electron microscopy for viscous products and vegetables, chocolate is analysed by REM.

There are different ways of preparing food: "Thin-section-TEM", "Replica-TEM" and "Negative Straining" for TEM, "Replica-SEM" and "Cryo-SEM" for SEM. One big advantage of CLSM and RKM is that the specimens don't need to be cut. For CLSM the method of the "Neagtive-Contrast" can be used, for RKM there are two modes of operation (contact-mode and non-contact-mode). Depending on the consistency and structure of the food and on the aim of the analysis there are suitable methods for each product.

7 Literatur

- ¹ Muller, H. G. (1973). An introduction to food rheology. Heinemann, London.
- ² Scott Blair, G. W. (1958). Rheology in food research. Adv. Food Research 8. S.1 ff.
- ³ Sherman, P. (1970). Industrial rheology with particular reference to foods, pharmaceuticals and cosmetics. Academic Press London New York.
- ⁴ Stengel, E. (1999). Physikalische Beschreibung des Kauvorganges zur Bewertung von Textur fester Lebensmittel. Universität Hohenheim, Dissertation. S. 4.
- ⁵ Szczesniak, A. L. (1968). Correlations between objective and sensory texture measurements. Food Technology 22. S. 49-54.
- ⁶ Escher, F. (1986). Textur, Rheologie und Struktur in der Lebensmitteltechnologie. Juris Druck + Verlag AG, Zürich. S. 3.
- ⁷ Weipert, D. et al (1993). Rheologie der Lebensmittel. Behr's Verlag.
- ⁸ Fricker, Alfons (1984). Lebensmittel – mit allen Sinnen prüfen!. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo. S. 1-3.
- ⁹ <http://www.diss.fu-berlin.de/1999/72/kapitel2.pdf> (Stand: 21.3.2008)
- ¹⁰ Braga, P.C. und Ricci, D. (2004). Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Application. Humana Press Inc.
- ¹¹ <http://www.old.uni-bayreuth.de/departments/didaktikchemie/umat/rtm/rtm.htm> (Stand: 21.3.2008)
- ¹² Takeuchi, K. und Frank, J. F. (2001). Confocal Microscopy and Microbial Viability Detection for Food Research. Journal of Food Protection. S. 2088.
- ¹³ Kaláb, M. et al. (1995). Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. Trends in Food Science & Technology 6(6). S. 177-186.
- ¹⁴ Flint, O. (1994). Food Microscopy: a manual of practical methods, using optical microscopy. BIOS Scientific Publishers Limited. S. 1-2.

Literatur

- ¹⁵ Wallis, T. E. (1965). Analytical Microscopy: Its aims and methods in relation to Foods, Water, Spices and Drugs. J. & A. Churchill LTD. S. 108.
- ¹⁶ Aguilera, J. und Stanley, D. W. (1990). Microstructural Principles of Food Processing & Engineering. Elsevier Science Publishers LTD.
- ¹⁷ Lange, R. H. und Blödmann, J. (1981). Das Elektronenmikroskop TEM+REM. Thieme.
- ¹⁸ <http://www.uni-ulm.de/elektronenmikroskopie/REMHerbst2001.html> (Stand: 10.6.2008)
- ¹⁹ <http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Olaf.Anhenn/CLSM.htm> (Stand: 20.3.2008)
- ²⁰ Schwinn, T. (1994). Erzeugung und Charakterisierung von Nanostrukturen an Oberflächen mit dem Rasterkraftmikroskop. Technische Universität München, Physik-Department, Dissertation. S.9.
- ²¹ Magonov, S.N. und Whangbo, M.-H. (1996). Surface Analysis with STM and AFM. VCH, Weinheim.
- ²² Franzke, C. (1996). Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. B. Behr's Verlag GmbH & Co.
- ²³ Baltes, W. (2000). Lebensmittelchemie. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg.
- ²⁴ Schwedt, G. (2005). Taschenatlas der Lebensmittelchemie. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- ²⁵ Mellema et al (1999). Molecular mechanism of the renneting process of skim milk examined by viscosity and light scattering experiments and simulated by model SCF calculations, Langmuir 15, 19. S. 6304-6313.
- ²⁶ Horne, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products, Int. Dairy J. 8, 3. S.171-177.
- ²⁷ Aguilera, J. M. und Stanley, D. W. (1999). Microstructural Principles of Food Processing & Engineering. Elsevier Science Publishers LTD.
- ²⁸ http://www.univie.ac.at/nutrition/lva/vorrat/UE0708/Neuer%20Ordner/Gelieren_Dickungs-%20und%20Geliermittel%20Literatur%20aus%20TERNES%20.pdf (Stand: 13.6.2008)
- ²⁹ <http://www.zusatzstoffe-online.de/information/667.doku.html> (Stand: 13.6.2008)

- ³⁰ Flegler, S. L., Heckman, J. W. und Klomparens, K. L. (1995). Elektronenmikroskopie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford.
- ³¹ <http://www.magma.ca/~scimat/foodmicr.htm> (Stand: 20.2.2008)
- ³² <http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/naturwissenschaften/indexoffline,page=1103358.html> (Stand: 12.6.2008)
- ³³ Koehler, J. K. (1972). The freeze-etching technique. In: Principles and Techniques of Electron Microscopy – Biological Applications, Bd. II, hrsg. von M. A. Hayat. Van Nostrand, London, Reinhold, New York. S. 51-98.
- ³⁴ Echlin, P. (1978). Coating techniques for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Scanning Electron Microscopy 1978, Bd. I, hrsg. von O. Johari AMF, O' Hare/III. S. 109-132.
- ³⁵ Sabatini, D. D., Bensch, K. und Barnett, R. J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell Biol. 17. S. 19-58.
- ³⁶ Lewis, E.R., Jackson, L. und Scott, T. (1975). Comparison of miscibilities and critical-point-drying properties of various intermediate and transitional fluids. Scanning Electron Microscope 1975, hrsg. von O. Johari, I. Corvin, IITRI, Chicago. S. 317-324.
- ³⁷ Reimer, L. und Pfefferkorn, G. (1973). Raster-Elektronenmikroskopie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- ³⁸ Marszalek, D.S. und Small, E. B. (1969). Proc. 2nd Ann. SEM Symp. Chicago. S. 231
- ³⁹ Boyde, A. und Wood, C. (1969). J. Microscopy 90. S. 221.
- ⁴⁰ <https://ces.karlsruhe.de/culm/physiktechnik/bild/scanning1.htm> (Stand: 20.3.2008)
- ⁴¹ Wilson, T. (1990). Confocal Microscopy. Academic Press Limited. S. 263, 271.
- ⁴² Pawley, J. B. (1995). Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, New York.
- ⁴³ Eschrich, R. (1998). Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von natürlichen und künstlichen Lipidmembranen und daran gebundener Proteine. Max – Planck - Institut für Biochemie, Abteilung für Molekulare Strukturbiologie, Dissertation. S. 24.

- ⁴⁴ http://stilzchen.kfunigraz.ac.at/skripten/semvie02/nano3_afm1.pdf (Stand: 21.3.2008)
- ⁴⁵ Wade, T., Garst, J.F. und Stickney, J.L. (1999). A simple modification of a commercial atomic force microscopy liquid cell for in situ imaging in organic, reactive or air sensitive environments. *Rev. Sci. Instr.* 70. S.121-124.
- ⁴⁶ Lehenkari, P. P., Charras, G. T., Nykanen, A. und Horton, M. A. (2000). Adapting atomic force microscopy for cell biology. *Ultramicroscopy* 82. S. 289-295.
- ⁴⁷ Workman, R. K. und Manne, S. (2000). Variable temperature fluid stage for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 71. S 431-436.
- ⁴⁸ http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=968943179&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=968943179.pdf (S.22, Stand: 28.5.2008)
- ⁴⁹ http://www.veeco.com/pdfs/appnotes/AN48r2_SPM_AFM_278.pdf (Stand: 2.6.2008)
- ⁵⁰ Paddock, S. W (1999). *Confocal Microscopy Methods and Protocols*. Humana Press Totowa, New Jersey. S. 1.
- ⁵¹ Dickinson, E. (1995). *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*. Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall.
- ⁵² Webb, G. A. et al (2001). *Magnetic resonance in food science. A view to the future*. The Royal Society of Chemistry. S. 3-4.
- ⁵³ <http://www.nanotruck.de/service/glossar.html> (Stand: 3.6.2008)
- ⁵⁴ Kirby, A. R, Gunning, A. P. und Morris, V. J. (1995). Atomic force microscopy in food research: A new technique comes of age. *Trends in Food Science & Technology*. Vol 6, Nov. 1995. S. 359-365
- ⁵⁵ Ratneshwar, L und Scott, A. J. (1994). Biological applications of atomic force microscopy. *Am. J. Physiol.* 266, C1-C21.
- ⁵⁶ Campbell, P. A., Gordon, R. und Walmsley, D. G. (1998). Active surface modification by scanning tunnelling microscopy. *Microscopy Anal.* 56. S. 25-27.
- ⁵⁷ Lapshin, R. V. (2004). Feature-oriented scanning methodology for probe microscopy and nanotechnology. *Nanotechnology*, Vol. 15, iss. 9. S. 1135-1151.

- ⁵⁸ Lapshin, R. V. (2007). Automatic drift elimination in probe microscope images based on techniques of counter-scanning and topography feature recognition. *Measurement Science and Technology*, Vol. 18, iss. 3. S. 907-927.
- ⁵⁹ Lapshin, R. V. (1995). Analytical model for the approximation of hysteresis loop and its application to the scanning tunneling microscope. *Review of Scientific Instruments*, Vol. 66, no. 9. S. 4718-4730.
- ⁶⁰ Kirby, A. R. (1996). Visualization of Plant Cell Walls by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, Vol 70. S. 1138-1143.
- ⁶¹ http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=981765793&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=981765793.pdf (Stand: 29.5.2008)
- ⁶² Salyaev, R. K. (1968). A method of fixation and embedding of liquid and fragile materials in agar microcapsulae. *Proc. 4th Europ. Reg. Conf. Electron Microscopy*, Rome 11. S. 37-38.
- ⁶³ Buma, T. J. und Henstra, S. (1971B). Particle structure of spray-dried milk products as observed by a scanning electron microscope. *Neth. Milk Dairy J.* 25. S. 75-80.
- ⁶⁴ Buma, T. J. (1978). Teilchenporosität von sprühgetrockneter Milch. *Milchwissenschaft* 33. S. 538-540.
- ⁶⁵ Warburton, S. und Pixton, S. W. (1978A). The moisture relations of spray-dried skimmed milk. *J. Stored Prod. Res.* 14. S. 143-158.
- ⁶⁶ Warburton, S. und Pixton, S. W. (1978B). The significance of moisture in dried milk. *Dairy Ind. Internat.* 43(4). S. 23-27.
- ⁶⁷ Roetman, K. (1979). Crystalline lactose and the structure of spray-dried milk products as observed by scanning electron microscopy. *Neth. Milk Dairy J.* 33. S. 1-11.
- ⁶⁸ Jelen, P., Kalab, M. und Greig, R. I. W. (1979). Water-holding capacity and microstructure of heat-coagulated whey protein powders. *Milchwissenschaft* 34. S. 351-356.
- ⁶⁹ Saltmarch, M. und Labuza, T. P. (1980). SEM investigation of the effect of lactose crystallization on the storage properties of spray-dried whey. *Scanning Electron Microsc.* III. S. 659-665.

Literatur

- ⁷⁰ Short, J. L. The water absorption capacity of heat precipitated whey proteins. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 15. S. 167-176.
- ⁷¹ Kalab, M. (1980B). Possibilities of an electron microscopical detection of buttermilk made from sweet cream in adulterated skim milk. Scanning Electron Microsc. III. S. 645-652.
- ⁷² Buma, T. J. and Henstra, S. (1971A). Particle structure of spray-dried caseinate and spray-dried lactose as observed by scanning electron microscope. Neth. Milk Dairy J. 25. S. 278-281.
- ⁷³ Kalab, M. und Emmons, D. B. (1974). Milk gel structure III. Microstructure of skim milk powder and gels as related to the drying procedure, Milchwissenschaft 29. S. 585-589.
- ⁷⁴ Kalab, M., Emmons, D. B. und Sargant A. G. (1975). Milk gel structure. IV. Microstructure of yoghurt in relation to the presence of thickening agents. J. Dairy RE. 42. S. 453-458.
- ⁷⁵ Kalab, M., Emmons, D. B. und Sargant A. G. (1976). Milk gel structure. V. Microstructure of yoghurt as related to the heating of milk. Milchwissenschaft 31. S. 402-408.
- ⁷⁶ Glaser, J., Carroad, P. A. und Dunkley, W L. (1979). Surface structure of Cottage cheese curd by electron microscopy. J. Dairy Sci. 62. S. 1058-1068.
- ⁷⁷ Kalab, M. (1978B). Milk gel structure VIII. Effect of drying on the scanning electron microscopy of some dairy products. Milchwissenschaft 33. S. 353-358.
- ⁷⁸ Washam, C. J., Derr T. J. und Todd, R. L. (1979). Scanning electron microscopy of Blue cheese: Mold growth during maturation. J. Dairy Sci. 62. S. 1384-1389.
- ⁷⁹ Kato, M. (1979). SEM replica technique for butter and cheese. J. Electron Microscopy 28. S. 199-200.
- ⁸⁰ Schmidt, D. G., Henstra, S. und Thiel, F. (1977). Eine einfache Methode für die raster-elektronenmikroskopische Präparation von Käse bei tiefer Temperatur. Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 10. S. 415-418.
- ⁸¹ Schmidt, D. G., Henstra, S. und Thiel, F. (1979). A simple low-temperature technique for scanning electron microscopy of cheese. Mikroskopie (Wien) 35. S. 50-55.
- ⁸² Schmidt, D. H. und van Hooydonk, A. C. M. (1980). A scanning electron microscopical investigation of the whipping of cream. Scanning Electron Microsc. III. S. 653-658, 644.

- ⁸³ Kalab, M., Sargant, A. G. und Froehlich, D. A. (1981). Electron microscopical study of commercial Cream cheese. *Scanning Electron Microsc.* III. S. 473-482.
- ⁸⁴ Creamer, L. K., Berry, G. P. und Matheson, A. R. (1978). The effect of pH on protein aggregation in heated skim milk. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 13. S. 9-15.
- ⁸⁵ Calapaj, G. G. (1968). An electron microscope study of the ultrastructure of bovine and human casein micelles in fresh and acidified milk. *J. Dairy Res.* 35. S. 1-6.
- ⁸⁶ Shimmin, P. D. und Hill, R. D. (1965). Further studies on the internal structure of the casein micelles of milk. *Austral. J. Dairy Technol.* 20. S. 119-122.
- ⁸⁷ Stewart, P. S., Puppione, D. L. und Patton, S. (1972). The presence of microvilli and other membrane fragments in the non-fat phase of bovine milk. *Z. Zellforsch.* 123. S. 161-167.
- ⁸⁸ Knoop, A. – M. (1979). Milchforschung mit dem Elektronenmikroskop. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168. S. 303-313.
- ⁸⁹ Creamer, L. K. und Matheson, A. R. (1980). Effect of heat treatment on the proteins of pasteurized skim milk. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 15. S. 37.-49.
- ⁹⁰ Snoeren, T. H. M. (1976). Kappa-Carrageenan. A Study on Its Physico-chemical Properties, Sol-Gel Transition and Interaction with Milk Proteins. NIZO-Verlagen, Ede, the Netherlands. S. 64-91.
- ⁹¹ Snoeren, T. H. M., Both, P. und Schmidt, D. H. (1976). An electron microscopic study of carrageenan and its interaction with κ -casein. *Neth. Milk Dairy J.* 30. S. 132-141.
- ⁹² Keenan, T. W. et al (1970). Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. *J. Cell. Biol.* 44. S. 80-93.
- ⁹³ Carroll, R. J., Thompson, M. P. und Nutting, G. C. (1968). Glutaraldehyde fixation of casein micelles for electron microscopy. *J. Dairy Sci.* 51. S. 1903-1908.
- ⁹⁴ Rose, D. und Colvin, J. R. (1966A). Internal structure of casein micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 49. S. 351-355.
- ⁹⁵ Rose, D. und Colvin, J. R. (1966B). Appearance and size of micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 40. S. 1091-1097.

-
- ⁹⁶ Carroll, R. J., Thompson, M. P. und Melnychyn, P. (1971). Gelation of concentrated skim milk: Electron microscopic study. *J. Dairy Sci.* 54. S. 1245-1252.
- ⁹⁷ Parry, Jr. R M. und Carroll, R. J. (1969). Location of κ -casein in milk micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 194. S. 138-150.
- ⁹⁸ Henstra, S. und Schmidt, D. G. (1974). The microcapsule technique. An embedding procedure for the study of suspensions and emulsions. *LKB Application Note No.* 150.
- ⁹⁹ Henstra, S. und Schmidt, D. H. (1970). On the structure of the fat-protein complex in homogenized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.* 24. S. 45-51.
- ¹⁰⁰ Harwalkar, V. R. und Vreeman, H. J. (1978). Effect of added phosphates and storage on changes in ultra-high temperature short-time sterilized concentrated skim-milk. 2. Micelle structure. *Neth Milk Dairy J.* 32. S. 204-216.
- ¹⁰¹ Kalab, M. (1977A). Milk gel structure VI. Cheese texture and microstructure. *Milchwissenschaft* 32. S. 449-458.
- ¹⁰² Taranto, M. V., Wan, P.J., Chen, S. L. und Rhee, K. C. (1979). Morphological, ultrastructural and rheological characterization of Cheddar and Mozzarella cheese. *Scanning Electron Microsc.* III. S. 273-278.
- ¹⁰³ Emmons, D. B., Kalab, M., Larmond, E. und Lowrie, R. J. (1980). Milk gel structure X. Texture and microstructure in Cheddar cheese made from whole milk and from homogenized low-fat milk. *J. Texture Stud.* 11. S. 15-34.
- ¹⁰⁴ Kalab, M. (1977B). Milk gel structure VII. Fixation of gels composed of low-methoxyl pectin and milk. *Milchwissenschaft* 32. S. 719-723.
- ¹⁰⁵ Hobbs, D. G. (1979). An improved method for preparing bovine milk fat globules for electron microscopy. *Milchwissenschaft* 34. S. 201-202.
- ¹⁰⁶ Davies, F. L. et al. (1978). A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. *J. Dairy Res.* 45. S. 53-58.
- ¹⁰⁷ Andrews, A. T., Brooker, B. E. und Hobbs, D. G. (1977). Properties of aseptically backed ultra-heat-treated milk. Electron microscopic examination of changes occurring during storage. *J. Dairy Res.* 44. S. 283-292.

- ¹⁰⁸ Knoop, A.-M., Knoop, E. und Wiechen, A. (1973). Electron microscopical investigations on the structure of the casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.* 27. S. 121-127.
- ¹⁰⁹ Kudo, S., Iwata, S. und Mada, M. (1979). An electron microscopic study of the location of κ -casein in casein micelles by periodic acid-silver methenamine staining. *J. Dairy Sci.* 62. S. 916-920.
- ¹¹⁰ Horisberger, M. und Vonlanthen, M. (1980). Localization of glycosylated κ -casein in bovine casein micelles by lectin-labelled gold granules. *J. Dairy Res.* 47. S. 185-191.
- ¹¹¹ Horisberger, M, Rosset, J. und Vonlanthen, M. (1978/1979). Location of glycoproteins on milk fat globule membrane by scanning and transmission electron microscopy using lectin-labelled gold granules. *Nestlé Research News.* S.67-72.
- ¹¹² Green, M. L. et al. (1978A). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. 1. Preparation of representative electron micrographs. *J. Dairy Res.* 45. S. 405-411.
- ¹¹³ Green, M. L. et al. (1978B). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. II. Process of gel assembly. *J. Dairy Res.* 45. S. 413-422.
- ¹¹⁴ Kimber, A. M. et al. (1974). Electron microscope studies of the development of structure in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 41. S. 389-396.
- ¹¹⁵ Rüegg, M. und Blanc, B. (1972). Beiträge zur elektronenmikroskopischen Struktur der Labgallerte und des Käseteiges. *Schweiz. Milchwirt. Forschung* 1. S. 1-8.
- ¹¹⁶ Knoop, A.-M. und Peters, K.-H. (1973). Die submikroskopische Struktur der Labgallerte und des jungen Camembert-Käseteiges in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen. *Milchwissenschaft* 27. S. 153-159.
- ¹¹⁷ Kimura, T., Taneya, S. und Furuichi, E. (1978). Electron microscopic observation of casein particles in process cheese. *Brief Commun.* 20th Internat. Dairy Congress, Paris, France. S. 239-240.
- ¹¹⁸ Taneya, S. et al. (1980). The submicroscopic structure of processed cheese with different melting properties. *Milchwissenschaft* 35. S. 479-481.
- ¹¹⁹ Kimura, T und Taneya, S. (1975). Electron microscopic observation of casein particles in cheese. *J. Electron Microsc.* 24. S. 115-117.

Literatur

- ¹²⁰ Rayan, A. A., Kalab, M. und Ernstrom, C. A. (1980). Microstructure and rheology of process cheese. Scanning Electron Microsc. III. S. 635-643.
- ¹²¹ Brooker, B. E., Hobbs, D. G. und Turvey, A. (1975). Observations on the microscopic crystalline inclusions in Cheddar cheese. J. Dairy Res. 42. S. 341-348.
- ¹²² Schmidt, D. G., Walstra, P. und Buchheim, W. (1973). The size distribution of casein micelles in cow's milk. Neth. Milk Dairy J. 27. S. 128-142.
- ¹²³ Schmidt, D. G. und Buchheim, W. (1976). Particle size distribution of casein solutions. Neth. Milk Dairy J. 30. S. 17-28.
- ¹²⁴ Eggmann, H. (1969). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Milch und Milchprodukten. 2. Anwendung der Gefrierätztechnik. Milchwissenschaft 24. S. 479-483.
- ¹²⁵ Schmidt, D. G. und Buchheim, W. (1970). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Feinstruktur von Caseinmicellen in Kuhmilch. Milchwissenschaft 25. S. 596-600.
- ¹²⁶ Rüegg, M und Blanc, B. (1978). Influence of pasteurization on UHT processing upon the size distribution of casein micelles in milk. Milchwissenschaft 33. S. 364-366.
- ¹²⁷ Precht, D. und Buchheim, W. (1979A). Elektronenmikroskopische Untersuchung der Kristallisationsvorgänge in den Fettkügelchen während der Rahmreifung. Milchwissenschaft 34. S. 657-662.
- ¹²⁸ Precht, D. und Buchheim, W. (1979B). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die physikalische Struktur von Streichfetten. I. Die Mikrostruktur der Fettkügelchen in Butter. Milchwissenschaft 34. S. 745-749.
- ¹²⁹ Precht, D. und Buchheim, W. (1980). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die physikalische Struktur von Streichfetten. II. Die Mikrostruktur der zwischenglobulären Fettphase in Butter. Milchwissenschaft 35. S. 393-398.
- ¹³⁰ Buchheim, W. (1970B). Elektronenmikroskopische Darstellung der Struktur von Speiseeis. Süßwaren 16. S. 763-767.
- ¹³¹ Berger, K. G. und White, G. W. (1971). An electron microscopical investigation of fat destabilization in ice cream. J. Food Technol. 6. S. 285-298.

Literatur

- ¹³² Buchheim, W. (1972). Elektronenmikroskopische Präparationsmethode zur Darstellung von Oberflächen- und Innerstruktur wasserlöslicher Pulverteilchen. Kieler Milchwirt. Forsch. Ber. 24. S. 97-107.
- ¹³³ Buchheim, W. (1974). The applicability of electron microscopy for studying the structure of liquid and solid foods. Proc. IV. Internal. Congress Food Sci. Technol. II. S. 5-12.
- ¹³⁴ Buchheim, W. (1981). A comparison of the microstructure of various dried milk products by application of the freeze-fracturing technique. Scanning Electron Microsc. III. S. 493-502.
- ¹³⁵ Buchheim, W. (1976). Freeze-etching of dehydrated biological material. Proc. 4th Europ. Congr. Electron Microsc. Jerusalem, Israel. S. 122-124.
- ¹³⁶ Buchheim, W. (1979). Der Verlauf der Fettkristallisation in den Fettkügelchen der Milch. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierätztechnik. Milchwissenschaft 25. S. 65-70.
- ¹³⁷ Buchheim, W. und Prokopek, D. (1976). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultrafiltrationskonzentraten aus Magermilch und daraus hergestelltem Käse. 1. Verhalten der Caseinmicellen während der Ultrafiltration. Milchwissenschaft 31. S. 462-465.
- ¹³⁸ Kalab, M. (1978A). Cleaning replicas of freeze-fractured oil-water emulsions. Microsc. Soc. Canada Bull. 6(4). S. 24-25.
- ¹³⁹ McGann, T. C. A., Donnelly, W. J., Kearney, R. D. und Buchheim, W. (1980). Composition and size distribution of bovine casein micelles. Biochim. Biophys. Acta 630. S. 261-270.
- ¹⁴⁰ Buchheim, W. und Knoop, E. (1979). Zur Verteilung von Fett und Casein in vollhomogenisierter und teilhomogenisierter Milch. Kieler Milchwirt. Forsch. Ber. 22. S. 323-327.
- ¹⁴¹ Schmidt, D. G., Buchheim, W. und Koops, J. (1971). An electron-microscopical study of the fat-protein complexes in evaporated milk, using the freeze-etching technique. Neth. Milk Dairy J. 25. S. 200-216.
- ¹⁴² Buchheim, W. (1970C). Zur Struktur der Hülle von Milchfettkügelchen. Naturwissenschaften 57. S. 672-673.
- ¹⁴³ Pinto da Silva, P., Peixoto de Menezes, A. und Mather, I H. (1980). Structure and dynamics of the bovine milk fat globule membrane viewed by freeze fracture. Exptl. Cell Res. 125. S. 127-139.

- ¹⁴⁴ Oortwijn, H., Walstra, P. und Mulder, H. (1977). The membranes of recombined fat globules. I. Electron microscopy. *Neth. Milk Dairy J.* 31. S. 134-147.
- ¹⁴⁵ Buchheim, W. (1970A). Die molekulare Ordnung in doppelbrechenden Fettkügelchen. *Milchwissenschaft* 25. S. 223-227.
- ¹⁴⁶ Resmini, P. (1979). Struttura e microstruttura dei prodotti lattiero caseari. *Ind. Latte* 15. S. 33-60.
- ¹⁴⁷ Harwalkar, V. R. und Kalab, M. (1980). Milk gel structure. XI. Electron microscopy of glucono- δ -lactone-induced skim milk gels. *J. Texture Stud.* 11. S. 35-49.
- ¹⁴⁸ Kalab, M. (1980A). Milk gel structure. XII. Replication of freeze-fractured and dried specimens for electron microscopy. *Milchwissenschaft* 35. S. 657-662.
- ¹⁴⁹ Chabot, J. F. (1979). Preparation of food science samples for SEM. *Scanning Electron Microsc.* III. S. 279-286.
- ¹⁵⁰ McKenna, A. B. (1997). Examination of whole milk powder by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dairy Research*, Vol. 64. S. 423-432.
- ¹⁵¹ Böhler, S. (1969). *Allgemeine Präparationstechnik in der Elektronenmikroskopie*. Unterlagen von der Fa. Balzers.
- ¹⁵² Buchheim, W. (1971). Neuere Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Strukturereforchung von Milch und Milchprodukten. *Welt der Milch* 15.
- ¹⁵³ Kaláb, M. (1981). Electron microscopy of milk products: A review of techniques. *Scanning Electron Microscopy*. S. 453-472.
- ¹⁵⁴ Schmidt, D. G. und Buchheim, W. (1992). The application of electron microscopy in dairy research. *Journal of Microscopy* 167. S. 105-121.
- ¹⁵⁵ Borchering, K. (2004). *Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen*. Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Dissertation.
- ¹⁵⁶ Graham, D. E. und Phillips, M. C. (1976). The conformation of proteins at the air-water interface and their role in stabilizing foams. *Foams*. (Ed.: Akers, R.J.), Academic Press, London. S. 237-256.

Literatur

- ¹⁵⁷ McClements, D. J. (2007). Understanding and Controlling the microstructure of complex foods. Woodhead Publishing Limited.
- ¹⁵⁸ Peleg, M. und Bagley, E.B. (1983). Physical Properties of Foods, Kapitel 2: Kaláb, M.: Electron Microscopy of Foods. AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut. S. 43-95.
- ¹⁵⁹ Mate, J. I. und Krochta, J. M (1996). Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and β -lactoglobulin edible films. J. Agric. Food Chem. 44(10). S. 3001-3004.
- ¹⁶⁰ Lent, L. E., Vanasupa, L. S. und Tong, P. S. (1998). Whey Protein Edible Film Structures Determined by Atomic Force Microscope. Journal of Food Science, Vol. 63, No.5. S. 1-4.
- ¹⁶¹ <http://tem.atp.tuwien.ac.at/EELS/EELSbild.html> (Stand: 29.5.2008)
- ¹⁶² http://www.stud.uni-karlsruhe.de/~uaars/Downloads/Praktikum/REM/Protokoll_EELS.pdf (Stand: 21.3.2008)
- ¹⁶³ Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ¹⁶⁴ Butt, H. J. et al (1990). Imaging cells with the atomic force microscope. J. Struct. Biol. 105. S. 54-61.
- ¹⁶⁵ Gould, S. A. C. (1990). From atoms to integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with the atomic force microscope. J. Vac. Sci. Technol. A. 8. S. 369-373.
- ¹⁶⁶ Hoh, J. H. und Hansma, P. K. (1992). Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology. Trends Cell biol. 2. S. 208-231.
- ¹⁶⁷ Putman, C. A. J. et al (1993). Ultramicroscopy 48. S. 177-182.
- ¹⁶⁸ Radmacher, M. (1992). From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. Science 257. S. 1900-1905.
- ¹⁶⁹ Labuza, T.P. und Katz, E.E. (1981). Structure Evaluation of four dry crisp snack foods by scanning electron microscopy. Journal of Food Processing and Preservation Vol.5, Number 1. S. 119-127.

Literatur

-
- ¹⁷⁰ Saltmarch, M. und Labuza, T. P. (1980). Influence of relative humidity on the physico-chemical state of lactose in spray-dried sweet whey powders. *J. Food Sci.* 45. S.1231.
- ¹⁷¹ Rao, M. A. und Hartel, R. W. (1998). *Phase/State Transitions in Foods*. Marcel Dekker, Inc. S. 202-206.
- ¹⁷² Cohen, S. H., Davis, E. A., Holcomb, D. N. und Kalab, M. (1981). *Studies of FOOD MICROSTRUCTURE*. Scanning Electron Microscopy, Inc.
- ¹⁷³ Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Bio.* 27. S. 137A-138A.
- ¹⁷⁴ Geissinger, H. D., Yamashiro, S. und Ackerley, C. A. (1978). A preparation of skeletal muscle for intermicroscopic (LM, SEM, TEM) correlation. *Scanning Electron Microsc.* II. S. 267-274.
- ¹⁷⁵ Jones, S. B., Carroll, R. J. und Cavanaugh, J. R. (1976). Muscle samples for scanning electron microscopy: preparative techniques and general morphology. *J. Food Sci.* 41. S. 867-873.
- ¹⁷⁶ Fahimi, H. D. und Drochmans, P. (1965A). Essais de standardisation de la fixation au glutaraldehyde I. Purification et détermination de la concentration du glutaraldehyde. *J. Microscopie* 4 (1965). S. 725-736.
- ¹⁷⁷ Fahimi, H. D. und Drochmans, P. (1965B). Essais de standardisation de la fixation au glutaraldehyde II. Influence des concentrations en aldehyde et de l'osmolalite. *J. Microscopie* 4 (1965). S. 737-748.
- ¹⁷⁸ Henstra, S. und Schmidt, D. G. (1970). Ultrathin sections of milk by means of the microcapsulation method. *Naturwissenschaften* 57(5). S.247.
- ¹⁷⁹ Jewell, G. G. (1981). The microstructure of orange juice. *Scanning Electron Microsc.* III. S. 593-398.
- ¹⁸⁰ Kaláb, M. und Larocque, G. (1996). Suitability of agar gel encapsulation of milk and cream for electron microscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 29(4). S. 368-371.
- ¹⁸¹ Veliky, I. A und Kaláb, M. (1990). Encapsulation of viscous high-fat foods in calcium alginate gel tubes at ambient temperature. *Food Structure* 9. S. 151-154.
- ¹⁸² Blanshard, J. M. V und Mitchell, J. R. (1998). *Food Structure-Its Creation and Evaluation*. Butterworths.

- ¹⁸³ Kirby, A. R., Gunning, A. P. und Morris, V. J. (1995). Imaging xanthan gum by atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* 267. S.161-166.
- ¹⁸⁴ Kirby, A. R. et al (1995). Observation of the helical structure of the bacterial polysaccharide acetan by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 68. S. 359-362.
- ¹⁸⁵ Hansma, H. G et al (1992). *Science* 256. S. 1180-1184.
- ¹⁸⁶ Thundat, T. et al (1992). *Ultramicroscopy* 42-44. S. 1101-1106.
- ¹⁸⁷ Mohr, W. P. und Stein, M. (1969). Effect of different freeze thaw regimes on ice formation and ultrastructural changes in tomato fruit parenchyma tissue. *Cryobiology* 6. S. 15-31.
- ¹⁸⁸ Campbell, G. M. und Mougeot, E. (1999). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends Food Science Technology* 10. S. 283-296.
- ¹⁸⁹ Heuer, A. et al. (2007). Visualisation of foam microstructure when subject to pressure change. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and engineering aspects.* S.114-123.
- ¹⁹⁰ Hayat, M. A. und Miller, S. E. (1990). *Negative Straining.* McGraw-Hill, New York.
- ¹⁹¹ Uusi-Rauva, E., Rautavaara, J. – A. und Antila, M. (1972). Effects of various temperature treatments on casein micelles. An electron microscopic study using negative staining. *Meijeritiet. Aikak.* 31. S.15-25.
- ¹⁹² Wolf, W. J. und Baker, F. L. (1972). Scanning electron microscopy of soybeans. *Cereal Sci. Today* 17.
- ¹⁹³ Wolf, W. J., Baker, F. L. und Bernard, R. L. (1981). Soybean seed-coat structural features: pits, deposits and cracks. *Scanning Electron Microsc. III.* S. 531-544.
- ¹⁹⁴ Geissinger, H. D. und Stanley, D. W (1981). Preparation of muscle samples for electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy III.*
- ¹⁹⁵ Davis, E. H. und Gordon, J. (1980). Structural studies of carrots by SEM. *Scanning Electron Microsc. III.* S. 601-611.
- ¹⁹⁶ Józsa, L., Järvinen, M. und Reffy, A. (1980). A new preparation technique for scanning electron microscopy of skeletal muscle. *Microsc. Acta* 83. S. 45-47.

Literatur

- ¹⁹⁷ Black, J. T (1974). The scanning electron microscope: Biological Applications, Vol. 1, Hayat, M. A (Editor), Van Nostrand Reinhold Co., New York. S. 1-43.