

C. Clasen, W.-M. Kulicke

Zum Gelbildungsprozeß von (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen

Die Gelierung von (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen im Unfiltrat von Bier führt zur Verstopfung der Filtermassen während des Brauprozesses und damit zu niedrigen Filterstandzeiten, erhöhtem Verbrauch an Filterhilfsmitteln, einem verringerten Bierausstoß und damit zu erhöhten Produktionskosten. Neue Untersuchungen zum Gelbildungsmechanismus zeigen zwei unterschiedliche Typen der Gelierung. Die spontane Gelierung tritt unabhängig von der Molmasse oberhalb einer kritischen Glucankonzentration ($c = 1\%$) auf und folgt einer pseudo-athermischen Bildungskinetik mit einem mindestens zweidimensionalen Wachstum der Gelkeime. Die Bildung der Ausgangskeime über geeignete Kontaktstellen der Glucane erfolgt sehr viel schneller als die eigentliche Gelbildung und die Gelbildungsgeschwindigkeit wird allgemein durch die niedermolekularen Glucanfraktionen unterhalb 100 000 g/mol kontrolliert. Eine Gelkeimbildung erfolgt auch unterhalb dieser kritischen Glucankonzentration der spontanen Gelierung. Allerdings tritt unterhalb der kritischen Konzentration von $c = 1\%$ eine lösungsübergreifende Gelierung mit Bildung eines Gelkörpers nur dann ein, wenn eine hochmolekulare Fraktion ($M_w > 100\,000$ g/mol) der Glucanmoleküle vorliegt und eine zusätzliche Erhöhung der Assoziationskontakte u. a. durch Scherkräfteintrag eintritt. Des Weiteren konnte durch enzymatischen Abbau und polymeranalytische Fraktionierung gezeigt werden, daß die Assoziation der Glucane nicht wie bislang angenommen über lange celluloseartige Sequenzen, sondern über regelmäßige Abfolgen von Cellotrioseblöcken entlang der Glucankette erfolgt.

BC 03 Chemie

(Deskriptoren: (1→3)(1→4)-β-D-Glucan, Gel, Gelbildungsmechanismus, Filtration, Rheologie, Polymeranalytik)

Descriptors: (1→3)(1→4)-β-D-glucan, gel, gelation mechanism, filtration, rheology, polymer analysis)

1 Einleitung

Bei der Bierherstellung liegt als Produkt der Gärung und Reifung im Tank getrübes Bier vor. Um die für den Verkauf benötigte klare Form zu erhalten wird das Unfiltrat durch einen Filtrationsprozess von Kolloiden und suspendierten Festkörpern getrennt. Insbesondere gelartige Kolloidstrukturen, die in der Lagerperiode bei tiefen Temperaturen unerwartet auftreten können, führen dabei zu einer erhöhten Verstopfungsrate der Poren der Filtermasse und setzen damit die Effektivität der Filter stark herab [1]. Die daraus resultierenden niedrigen Filterstandzeiten und der erhöhte Verbrauch an Filtermaterial wie auch der verringerte Bierausstoß führen zu einer Erhöhung der Produktionskosten des Brauprozesses.

Die wesentlich für die Gelbildung im Unfiltrat des Bieres verantwortlichen Substanzen sind neben geringen Mengen anderer Polysaccharide vor allem die β-Glucane der Braugerste. Das im Endosperm der Braugerste vorhandene (1→3)(1→4)-β-D-Glucan wird während des Maisch- und Brauvorganges nicht vollständig von den endogenen Enzymen der Gerste abgebaut. Die hochmolekularen Anteile des wasserlöslichen (1→3)(1→4)-β-D-Glucans erhöhen dabei zunächst die Viskosität der Würze [2, 3] und führen deshalb zu einer Verringerung der Extraktausbeute durch eine Behinderung des Enzymangriffs und einer Verringerung der

Abläutergeschwindigkeit. Darüber hinaus kann die Assoziationsfähigkeit des (1→3)(1→4)-β-D-Glucans zu der unerwünschten Bildung des Gels führen, das bei der abschließenden Filtration eine Verstopfung der Filter hervorruft.

Eine allgemeine erhöhte Gelbildungstendenz des (1→3)(1→4)-β-D-Glucans soll durch einen hohen Stammwürzegehalt [4], einen hohen Alkoholgehalt [4, 5], niedrige Temperaturen [6] und Scherkräfte [6–8], die bei Pump- und Separationsvorgängen auftreten, verursacht werden. Durch Ultrafiltrationsexperimente konnten in Glucangelen relativ hohe Molmassen bestimmt werden [6]. Insbesondere diesen hochmolekularen Anteilen des β-Glucans, die vor allem durch unzureichende Mälzungs- und Maischprozesse begünstigt werden, wird deshalb eine verstärkte Gelbildungstendenz zugesprochen [9–11], während die niedermolekularen Anteile keinen Einfluss auf die Filtrierbarkeit haben sollen [12]. Der Gesamtgehalt an (1→3)(1→4)-β-D-Glucan in Würze und Bier kann demnach nicht direkt mit den Filtrationsproblemen korreliert werden [8, 13, 14].

Über den eigentlichen Gelbildungsmechanismus des (1→3)(1→4)-β-D-Glucans ist bislang wenig publiziert worden. Zwar wird in der Literatur die Auffassung vertreten, daß eine Assoziation der Glucanketten über bis zu 15 Einheiten lange celluloseartige β-(1→4)-verknüpfte Glucoseinheiten erfolgt [1, 7, 15, 16], dieser Hypothese wird aber u.a. von Wood et al. und Izawa et al. [17, 18] widersprochen.

Zu einem genauen Assoziationsmechanismus, der Gelkeimbildung, der Gelbildungskinetik sowie der Abhängigkeit dieser Größen von den molekularen Parametern der Lösung wie Konzentration, Molmasse und chemische Polymerkettenstruktur konnten bislang keine Angaben gefunden werden. Ziel des vorliegenden Beitrages ist deshalb, detaillierte Untersuchungen zum Gelbildungsmechanismus des (1→3)(1→4)-β-D-Glucans verschiedener Molmassen und verschiedener Nativität und damit unterschiedlicher chemischer Struktur darzulegen, die mit Hilfe polymeranalytischer Untersuchungsmethoden genau charakterisiert wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung von Glucan

Die Gerste (Braugerste aus Niedersachsen, Erntejahr 1996, 150 g) wurde in einer Siebmühle (Maschenweite 0,5 mm) gemahlen (Retsch, ZM1000, Haan). Die endogene Enzymaktivität wurde durch Kochen in 750 ml Ethanol (80 % v/v) über 30 min zerstört. Es folgte Nachwaschen in Ethanol (96 % v/v) und Trocknen bei 80 °C. Eine Aufschlämmung des Mehls in Phosphatpuffer (0,01 M, pH 6) wurde im Wasserbad bis auf 95 °C erhitzt. Bei 70 °C wurde wärmeresistente α -Amylase (3,5 ml, Sigma, A3306) hinzugefügt. Nach 1 h wurde der Rückstand durch Zentrifugieren abgetrennt und zweimal mit je 250 ml Wasser ausgewaschen.

Die gesammelten Zenträte wurden an einer Diafiltrationsapparatur (Minitan, Biomax-Membran, Ausschlussgrenze 30 000 g/mol, Millipore, Bedford, England) auf 0,5 l eingeengt. Die Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30 % (w/v) und Lagerung über Nacht bei 4 °C bewirkte die Ausfällung von β -Glucan und Eiweißen.

Die Mutterlösung wurde dekantiert und der Niederschlag mit Ethanol (20 und 96 % v/v) gewaschen. Nach Wiederauflösen in deionisiertem Wasser bei 80 °C und Filtern über Cellite (Sigma, acid-washed) wurde das β -Glucan durch Zugabe des gleichen Volumens Ethanol (96 % v/v) ausgefällt, nochmals mit Ethanol (96 % v/v) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Kommerziell erhältliche (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucane aus Gerste, (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan Standards sowie (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucane aus Lichenan und Hafer wurden von der Firma Megazyme, Bray, Ireland bezogen.

2.2 Isolierung von Glucan durch scherinduzierte Gelierung

Ultrafiltriertes Bier, von 1 l auf 200 ml eingeengt, (Minitan, Biomax-Membran, Ausschlußgrenze 30 000 g/mol, Millipore, Bedford, England) oder kommerziell erhältliche β -Glucanlösungen mit 0,25 % (w/w) β -Glucan in wässrigem Ethanol (5 % v/v) wurden in einem Homogenisator (Ultraturax T50 mit Dispergierkopf G45G, Ika, Staufen) über 90 min bei 5000 U/min starker Scherkraftbelastung ausgesetzt. Ein thermostatisierbares Gefäß stellte ein konstante Innentemperatur von 18 °C sicher.

Die gescherten Lösungen wurden anschließend für 3 Wochen bei 5 °C gelagert. Das Gel wurde durch Zentrifugation isoliert (10 min, 10 000 G), dreimal mit Ethanol (5 % v/v) gewaschen und lyophilisiert.

2.3 Molmassen- und Molmassenverteilungsbestimmung

Die Proben wurden auf drei hintereinandergeschalteten Größenausschlusschromatographie-Säulen (SEC) mit abnehmender Ausschlussgrenze fraktioniert (TSK-GelPW_{XL} G4000, G5000, G6000, Toso Haas, Stuttgart) unter Verwendung von filtrierter (Anodisc 47, Porengröße 0,02 mm, Whatman, Maidstone, England) Natriumnitratlösung (0,1 M, mit 0,02 % w/w Natriumazid) als Eluent und Probenlösungsmittel. Die Säulen waren mit einem Vielwinkel-Laserlichtstreuophotometer (MALLS)(DAWN-F, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) zur Ermittlung der Molmassen und einem Differentialrefraktometer (DRI) (Shodex RI SE 51, Showa Denko, Tokyo, Japan) zur Ermittlung der Konzentration gekoppelt [19]. Die Säulen waren auf 77,5 °C temperiert. Vor dem Vermessen in MALLS/DRI wurde das Eluat in einem Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

2.4 Ultraschalldegradation

Molmassenreduzierung durch Ultraschall erfolgte aus etwa 1 % (w/w) Lösungen der Glucane in deionisiertem Wasser mittels eines 19 mm Ultraschallresonators (W-450, Branson, Heusenstamm) bei mittlerem Energieeintrag über 2 h [20, 21].

Die Proben GG50 und HG40 wurden bei 65 °C durch Degradation bis zur Grenzmolmasse aus GG165 bzw. HG220 erzeugt, wohingegen die halbabgebaute Probe GG70 aus GG100 bei 18 °C entstand. Bei dieser niedrigen Temperatur gelierte das Glucan während der Beschallung aus und entzog sich somit der Degradation bis zur Grenzmolmasse.

Der Titanabrieb des Resonators wurde durch Zentrifugation (30 min, 10 000 G) entfernt.

2.5 Viskosimetrie

Die viskosimetrischen Daten wurden mit einer Ubbelohde-Kapillare (Typ 536 13, Schott, Hofheim) bei $25 \pm 0,1$ °C in deionisiertem Wasser (mit 0,02 % (w/w) Natriumazid stabilisiert) aufgenommen. Die Durchlaufzeiten wurden automatisch mit einem Viscoboy 2 (Lauda, Lauda-Königshofen) ermittelt. Vorhergehende rheologische Messungen stellten sicher, daß bei den eingesetzten Konzentrationen im Newtonschen Bereich gemessen wurde [22].

2.6 Rheologie

Schermessungen und parallel dazu durchgeführte Oszillationsmessungen, Multiwaveexperimente sowie Kriechversuche wurden auf einem UDS 200 (Physica, Stuttgart) vorgenommen. Alle anderen Oszillationsmessungen, Oszillationszeitversuche und Deformationssprungversuche wurden auf einem RFS 8500 (Rheometric Scientific, Bensheim) durchgeführt. Schermessungen mit Normalspannungen wurden auf zwei ARES-Rheometern (Rheometric Scientific, Bensheim) mit 10 g bzw. 2000 g Transducer detektiert. Oszillationsmessungen mit Temperaturrampen und Gelbruchexperimente erfolgten auf einem Bohlin CS 50 (Bohlin, Mühlacker).

Zum Prinzip rheologischer Messungen sei auf Referenz [23] verwiesen.

Die Proben wurden vorgelegt, mit Wasser (mit 0,02 % w/w Natriumazid zur Stabilisierung) versetzt, intensiv geschüttelt und bei 85 °C bis zur vollständig homogenen Auflösung gelagert. Erst kurz vor Gebrauch wurden die Proben im Wasserbad abgekühlt. Gelierte Proben konnten durch ca. einstündiges Erhitzen auf 85 °C wieder verwendbar gemacht werden. Für Messungen im Solzustand und für Sol-Gel-Übergänge wurden Kegel-Platte-Geometrien verwendet. Alle rheologischen Messungen fanden bei 25 °C statt, sofern nichts Gegenteiliges angegeben ist.

Für Zeit- und Temperaturversuche wurden die Proben mit Paraffinöl bedeckt, um Lösungsmittelverluste zu verhindern.

2.7 Rheo-Optik

Für rheo-optische stationäre und transiente Schermessungen zur Strömungsdichroismusbestimmung wurde eine selbstgebaute Messstrecke mit Couette-Geometrie genutzt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode ist in den Referenzen [24, 25] gegeben.

2.8 Enzymatischer Abbau von (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen und quantitative Oligomerenanalyse

Die Proben (25 mg) wurden vollständig in 5 ml Phosphatpuffer (0,05 M, pH 6,5) im kochenden Wasserbad gelöst. Nach Temperieren auf 40 °C wurden 0,5 ml Lichenase (E.C. 3.2.1.73) in Phosphatpuffer (10 U) hinzugefügt. Nach 1 h wurde nochmals 0,35 ml Lichenase zugegeben und die Digestion weitere 30 min fortgeführt. Die Umsetzung wurde durch Aufkochen beendet. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und der weiße Niederschlag abzentrifugiert (5 min, 10 000 G). Das Zentrat wurde lyophilisiert, in Natronlauge (0,1 M) aufgenommen und in einer Anionenaustauschchromatographie (AEC) analysiert bzw. in Wasser aufgenommen und in einer Größenausschlusschromatographie (SEC) aufgetrennt.

Die qualitative Analyse erfolgte auf der AEC (Dionex-System, CarboPac PA1-Säule, Dionex, Idstein) mit gepulster amperometrischer Detektion. Der Eluent bestand aus zwei Komponenten: Natronlauge (0,1 M) (a) und 0,1 M Natriumacetat in Natronlauge (0,1 M) (b). Die Säule wurde mit einem Gradienten ausgehend von a : b = 95 : 5 über 20 min, 70 : 30 über 10 min und 95 : 5 über 15 min während des 45-minütigen Zyklusses gefahren.

2.9 NMR-Spektroskopie

Die ¹³C-NMR-Spektren wurden auf einem Bruker MSL 300 bei einer Messfrequenz von 75,47 MHz und einer Temperatur von 100 °C in DMSO-d₆ bzw. bei Raumtemperatur oder 80 °C in D₂O aufgenommen. Zur quantitativen Auswertung der Spektren wurde das IGATED-Pulsprogramm mit einem 90°-Puls und einem Relaxationsdelay von 3 s gewählt [26 – 28].

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Polymeranalytik der (1→3)(1→4)-β-D-Glucane

Das wasserlösliche (1→3)(1→4)-β-D-Glucan tritt in der Natur als Zellwandbestandteil von Gersten- und Hafersamen, Lichenan (Islandmoos) und Hefen (*Saccharomyces Cerevisiae*) auf. (1→3)(1→4)-β-D-Glucan ist ein unverzweigtes Homopolymer aus D-Glucoseeinheiten, die über β-(1→3) und β-(1→4) glycosidische Bindungen in einem Verhältnis von 3 : 7 verknüpft sind [29 – 32]. Die Bindungsverteilung ist dabei nicht völlig unregelmäßig [32 – 34], Blöcke von überwiegend zwei bis drei β-(1→4) Bindungen [15], die vereinzelt aber auch bis zu 14 Einheiten lang werden [18], werden durch statistisch verteilte β-(1→3) Bindungen unterbrochen (siehe Abbildung 1).

Die Isolierung von intakten (1→3)(1→4)-β-D-Glucangelen direkt aus der Würze oder Bier stellt ein nicht unerhebliches Problem dar. Zum einen wird die Gelbildung durch die zahlreichen Inhaltsstoffe des Bieres, insbesondere durch die chemisch ähnlichen Strukturen anderer niedermolekularer Zucker beeinflusst [7], eine alleinige Beurteilung des Einflusses der molekularen Parameter des Bieres ist damit nicht mehr möglich. Darüber hinaus gibt eine Untersuchung bereits gelierter Anteile des Bieres keinen Aufschluss über die Kinetik der Gelierung. Die Gelpartikel, die aus der Filtermasse des Brauprozesses isoliert werden können, sind nicht frei von Verunreinigungen und werden während des Filtrationsprozesses in den Poren des Filtermaterials starken Dehnströmungen ausgesetzt, die die Struktur des Gelkörpers nachhaltig verändern können. Die nachfolgend dargestellten Untersuchungen sind deshalb neben aus Bier isolierten (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen insbesondere an direkt aus der Gerste isolierten und aufgereinigten Glucanen durchgeführt worden. Um den Einfluss

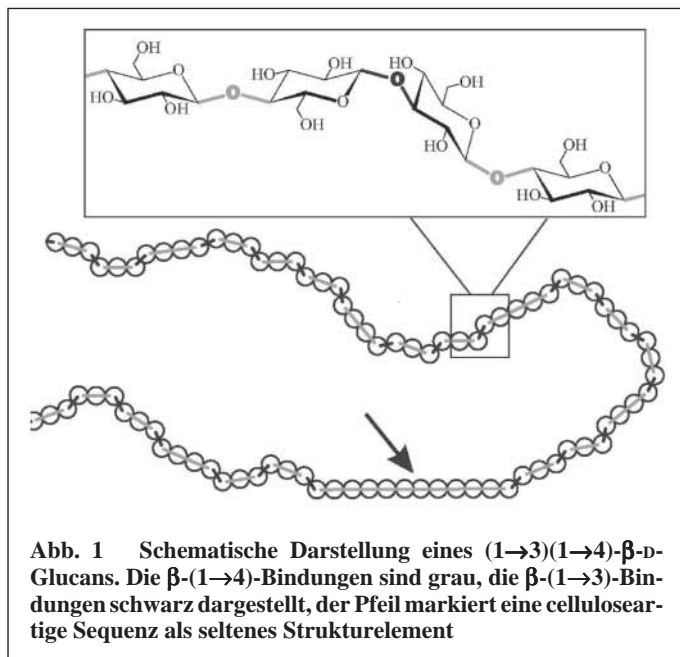


Abb. 1 Schematische Darstellung eines (1→3)(1→4)-β-D-Glucans. Die β-(1→4)-Bindungen sind grau, die β-(1→3)-Bindungen schwarz dargestellt, der Pfeil markiert eine celluloseartige Sequenz als seltenes Strukturelement

der Molmasse auf die Gelierung vertieft untersuchen zu können, sind die Proben teilweise durch Ultraschallabbau zu geringeren Molmassen degradiert worden. Durch Ultraschallabbau wird, im Vergleich zu anderen Degradationsmethoden, die Molmassenverteilung nicht verbreitert und der Polymerkettenbruch verläuft ohne Abspaltung von Monomereinheiten in der Mitte der Polymerkette [21].

Die eingesetzten Glucane sind hinsichtlich ihrer zahlen- und gewichtsmittleren Molmasse, ihrer Molmassenverteilungsbreite (Polydispersität) über kombinierte Größenausschlusschromatographie/Vielwinkellichtstreuung/Konzentrationsdetektion (SEC/MALLS/DRI) und hinsichtlich ihres Staudingerindex über Viskosimetrie charakterisiert worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

3.2 Scherinduzierte Gelierung

Unter normalen Umständen ist ein Bier stabil gegen eine spontane Gelierung des β-Glucananteils. Berichte über einen gelartigen Niederschlag im fertigen Gebinde sind dementsprechend selten und derartige „spontane“ Gele, entstanden nach der finalen Bierfiltration, konnten im Rahmen des Projektes nicht untersucht werden. Durch gezielten Scherkräfteintrag können aber auch die relativ niedrigen β-Glucankonzentrationen des Bieres als Gel abgeschieden werden [6, 8]. Durch die in Kapitel 2.2, „Isolierung von Glucan durch scherinduzierte Gelierung“, beschriebenen Techniken zur Erzeugung extremer Scherströmfelder kann bis zu 50% des im Bier enthaltenen β-Glucans ausgeliefert werden. Das auf diese Weise aus einem normalen und hinsichtlich der Gelbildungstendenz als unproblematisch angesehenem Bier abgeschiedene β-Glucan zeigt mit 56 000 g/mol eine relativ geringe gewichtsmittlere Molmasse (zum Vergleich siehe Tabelle 1).

Eine andere Methode, die das β-Glucan aus der gleichen Bierprobe durch Ausfrieren isolierte [35], ergab eine ähnlich geringe gewichtsmittlere Molmasse, die im Rahmen der Messgenauigkeit der verwendeten Größenausschlusschromatographie (SEC) mit der der scherinduzierten Gelierung übereinstimmt. Direkt aus Gerste nach der Methode von McCleary [36] isolierte β-Glucane wiesen demgegenüber mit 374 000 g/mol eine wesentlich höhere Molmasse auf, die auch den hohen Molmassen der kommerziell

Tabelle 1 Zusammenstellung der polymeranalytischen Daten aller untersuchten Proben. Gewichtsmittlere Molmasse M_w , zahlenmittlere Molmasse M_n und Polydispersität M_w/M_n berechnet aus SEC/MALLS/DRI-Daten sowie Staudingerindex $[\eta]$ aus viskosimetrischen Daten.

Code	Herkunft	M_w (10^3 g/mol)	M_n (10^3 g/mol)	M_w/M_n	$[\eta]$ (cm^3/g)
<i>Gerstenglucane</i>					
GG375	aus Gerste isoliert	374	236	1,6	509
GG300	Megazyme	298	206	1,5	458
GG275	Megazyme, St.*	274	179	1,5	444
GG200	Megazyme, St.*	202	140	1,4	333
GG165	Megazyme	166	86	1,9	255
GG140	Megazyme, St.*	140	90	1,6	256
GG100	Megazyme	103	74	1,4	211
GG70	Ultraschall-Abbau GG100	72	47	1,5	172
GG50	Ultraschall-Abbau GG165	43	33	1,3	115
GGBiergel	aus geschertem Bier	56	36	1,6	n.b.
<i>Haferglucane</i>					
HG220	Megazyme	218	152	1,43	335
HG40	Ultraschall-Abbau HG220	40	32	1,25	n.b.
<i>Lichenan</i>					
LN55	Megazyme	55	32	1,72	n.b.

* St. = Standard
n.b. = nicht bestimmt

erhältlichen, aus Gerste isolierten (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen entspricht (siehe Tabelle 1). Auch in der Literatur wird diesen hochmolekularen Anteilen der (1→3)(1→4)-β-D-Glucane das eigentliche Gelbildungspotential zugesprochen, während niedermolekulare Anteile mit Molmassen unterhalb 100 000 g/mol an der Gelierung nicht beteiligt sein sollen [12].

Zur Untersuchung des genauen Einflusses der Molmasse auf die scherinduzierte Gelbildung wurde deshalb ein Glucanstandard mit einer gewichtsmittleren Molmasse von 165 000 g/mol ge-

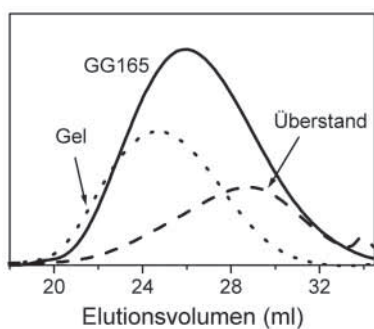


Abb. 2 Eluationsdiagramme der Größenausschluss-Chromatographie (DRI-Signale) des Gerstenglucans GG165. Die hohen Molmassen eluieren als erstes. Die durchgezogene Kurve entspricht einer frisch präparierten Lösung. Die gepunktete Linie stellt das Signal eines Glucangels dar, das durch Scherung in einem Homogenisator (90 min) und durch 7-tägige Lagerung bei 4 °C aus einer Lösung von $c = 0,0025$ g/g in 5%iger ethanolischer Lösung ausgeliefert und anschließend in 85 °C warmem H_2O gelöst wird. Die gestrichelte Linie entspricht dem im Überstand gelösten Glucan der scherinduzierten Gelierung nach der Lagerperiode

wählt der mit einer Molmassenverteilung von $M_w/M_n = 1,9$ eine relativ breite Verteilung aufweist und dementsprechend das Spektrum der in realem Bier möglicherweise vorkommenden Glucananteile abdeckt. Die Konzentration von $c = 0,0025$ g/g entspricht damit ungefähr dem Fünffachen des durchschnittlich in Bier vorhandenen Glucans, liegt aber nach der Einstein'schen Korrelation von Staudingerindex $[\eta]$ und Raumerfüllung für sphärische Polymerknäule mit konstanter Dichte

$$c_{[\eta]}^* = 2,5 \cdot \frac{1}{[\eta]} \quad (1)$$

noch einen Faktor 5 unterhalb der kritischen Konzentration $c_{[\eta]}^*$ (siehe Tabelle 1). Unterhalb der kritischen Konzentration liegen die Glucanpolymere räumlich getrennt vor, trotzdem kann aus der so präparierten Lösung das Glucan durch Scherkräfteintrag und eine Lagerperiode von 3 Wochen bei 5 °C nahezu quantitativ (Wiederfindungsrate 95%) ausgeliefert werden (Abbildung 2). Die niedermolekularen Anteile des Glucans werden demnach vollständig mit in das Gel eingebunden. Ein Abbruch des Versuches vor Abschluss der quantitativen Gelierung nach sieben Tagen und ein Vergleich der Molmassenanteile in dem Gelkörper und dem Überstand durch Fraktionierung über Größenausschlusschromatographie (SEC) ist in Abbildung 2 dargestellt. Danach enthält der Gelkörper der ersten Gelierphase nur die hochmolekularen Anteile (mit geringen Eluationszeiten), während die niedermolekularen Anteile erst in der Endphase der Gelierung an das Gel assoziiert werden. Eine scherinduzierte Gelierung wird demnach durch die hochmolekularen Anteile hervorgerufen. Eine bereits direkt nach der Scherung einsetzende Trübung lässt dabei auf eine durch die Scherung erzwungene Ausbildung von isolierten kolloidalen Assoziaten mit Größenordnungen im Bereich des sichtbaren Lichtes schließen, die in der Ruhephase der Gelierung als Keime für die Anlagerung der restlichen Glucanmoleküle dienen.

Auch ohne diese erzwungene Gelkeimbildung kann durch die Lagerzeit und die tiefen Temperaturen von 4 °C eine Gelierung hervorgerufen werden [7]. Allerdings setzt diese Methode eine Wartezeit von mehreren Wochen voraus [37] und führt auch nur bei problematischen Bieren zu einer Gelbildung. Diese Beobachtungen legen nahe, dass β-Glucanlösungen allgemein in einem instabilen Zustand vorliegen, die Gelbildungskinetik aber sehr verlangsamt ist durch sehr geringe Zahl von möglichen Assoziationskontakten in einer gering konzentrierten Lösung. Unterstützt wird diese Annahme durch die Berichte einer kritischen Konzentration, oberhalb derer eine spontane Gelierung von hochmolekularem β-Glucans aus der Lösung erfolgt [8].

3.3 Gelbildungsgeschwindigkeit

Eine spontane Gelierung des β-Glucans aus einer höher konzentrierten Lösung konnte in der Tat beobachtet werden. In Abbildung 3 ist hierzu der frequenzabhängige Verlauf des Verlustmoduls G'' , des Speichermoduls G' und der komplexen Viskosität η^* eines rheologischen Schwingungsexperimentes für eine frisch präparierte β-Glucanlösung dargestellt.

Die Module zeigen den für eine Polymerlösung typischen linearen Anstieg mit der Frequenz, der Speichermodul liegt dabei bei niedrigen Frequenzen unterhalb des Verlustmoduls [23, 38]. Demgegenüber zeigt die gleiche Lösung nach drei Tagen den typischen Verlauf einer vernetzten, gelartigen Struktur mit einem konstanten Speichermodul fast eine Dekade oberhalb des Verlustmoduls. Das Schwingungsexperiment stellt dabei, anders als eine Scherung, eine nicht-invasive Detektionstechnik dar, der Gel-

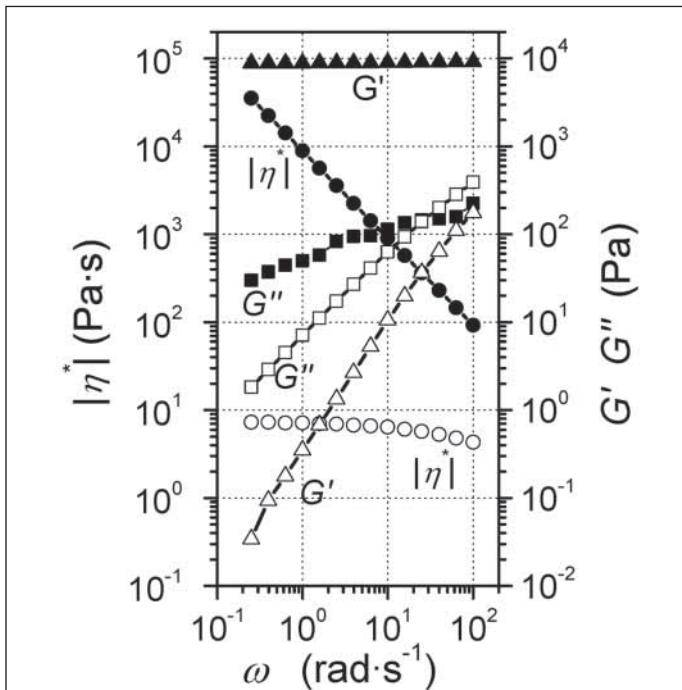


Abbildung 3 Speichermodul G' , Verlustmodul G'' und komplexe Viskosität $|\eta^*|$ als Funktion der Schwingungsfrequenz ω einer frisch präparierten Lösung des Gerstenglucans GG165 ($c = 0,06$ g/g, offene Symbole) und derselben Probe nach 72 h (geschlossene Symbole)

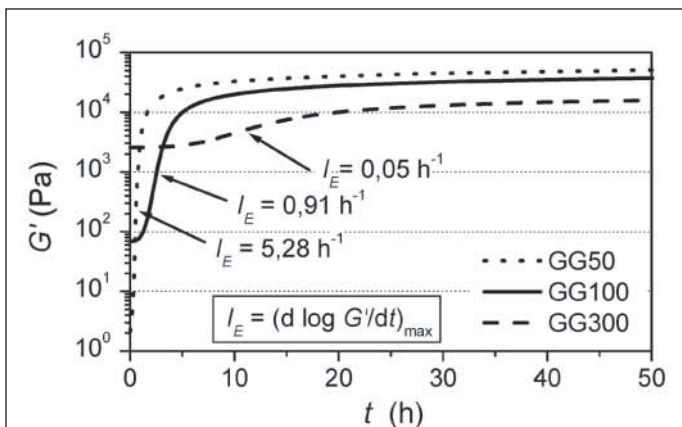


Abbildung 4 Speichermodul G' einer konstanten Oszillationsfrequenz von $\omega = 10$ rad/s und einer konstanten Deformation von $\gamma = 0,01$ als Funktion der Zeit für frisch präparierte wässrige Lösungen von Gerstenglucanen unterschiedlicher Molmasse ($c = 0,1$ g/g). Die Pfeile kennzeichnen die Punkte maximaler Steigung, die nach Gleichung (2) zur Berechnung des Elastizitätsinkrements I_E als Maß für die Geliergeschwindigkeit herangezogen werden

bildungsmechanismus wird nicht durch das Experiment beeinflusst. Darüber hinaus kann auf diese Weise auch die Struktur eines fließfähigen Mikrogels detektiert werden, bei dem keine globale Vernetzung eintritt, sondern lediglich lokale, sedimentartige Gelkörper, wie sie in den verdünnten Glucanlösungen und im Bier beobachtet werden [35].

Über das Schwingungsexperiment kann die spontane Gelierung von β -Glucanlösungen oberhalb der kritischen Konzentration

$c_{[n]}^*$ auch kontinuierlich verfolgt werden. Dabei wird das Speichermodul G' als Maß für die elastischen Anteile bei einer konstanten Frequenz ω im zeitlichen Verlauf bestimmt. Wie in Abbildung 4 dargestellt, liegt eine spontan gelierende β -Glucanlösung zunächst während einer Induktionsperiode noch als Lösung vor, bevor der makroskopische Gelierprozess einsetzt und der Speichermodul ansteigt. Der Speichermodul nähert sich dann während der vollständigen Vernetzung asymptotisch einem Grenzwert an. Zur Bestimmung einer schwingungsfrequenzunabhängigen Geliergeschwindigkeit aus diesen Kurven kann das Elastizitätsinkrement I_E verwendet werden, das, wie in Abbildung 4 angedeutet, der maximalen Steigung der Speichermodul-Zeit-Kurven entspricht:

$$I_E = \left(\frac{d \log G'}{dt} \right)_{max} \quad (2)$$

Aus der Selbstähnlichkeit der Kurven in Abbildung 4 für konstante Temperaturen folgt, dass das Elastizitätsinkrement sowohl als Maß für die Geliergeschwindigkeit als auch für den Gelbildungszeitpunkt angenommen werden kann [39]. Die so ermittelten Elastizitätsinkremente I_E sind für eine Reihe von (1→3)(1→4)- β -D-Glucanen verschiedener Molmassen und für Konzentrationsreihen im Bereich der spontanen Gelierung in Abbildung 5 dargestellt.

Wie erwartet nimmt die Geliergeschwindigkeit der spontanen Gelierung mit der Konzentration und damit der absoluten Segmentdichte des β -Glucans in Lösung zu. Allerdings wird eine Zunahme der Geliergeschwindigkeit mit abnehmender Molmasse beobachtet. Danach zeigen β -Glucane die höchsten spontanen Geliergeschwindigkeiten bei einer gewichtsmittleren Molmasse, die der hinsichtlich der Geliertendenz als unproblematisch angesehenen Glucane in Bieren entspricht. Eine mögliche Erklärung für die Dominanz der niedermolekularen Flanke bei der Gelierung aus konzentrierter Lösung liegt in der gesteigerten Beweglichkeit der kurzen Polymerketten. Die zur Ausbildung eines festen Assoziationspunktes benötigte Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen möglichen Kontaktstellen der Polymerketten wird durch die Beweglichkeit kurzer Kettensegmente erhöht. Auf der anderen Seite kann nur durch genügend lange Ketten eine weitreichende Vernetzung des Glucans erreicht und ein Gelkörper erzeugt werden. Dementsprechend ist in Abbildung 5 für hohe Molmassen von 300 000 g/mol eine geringere Geliergeschwindigkeit zu beobachten, die allerdings im Vergleich zu den geringeren Molmassen

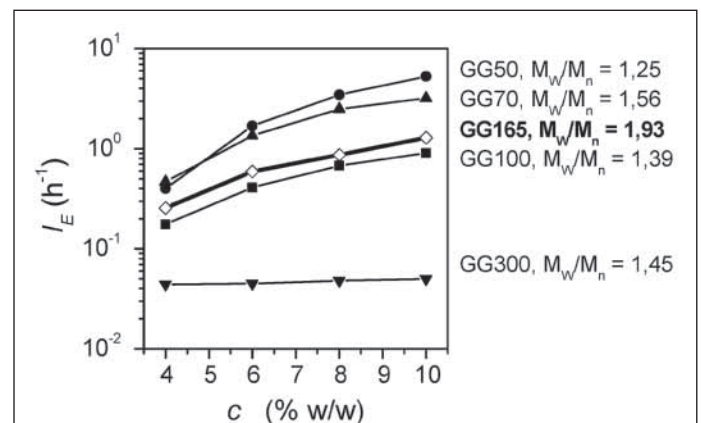


Abbildung 5 Elastizitätsinkremente I_E für unterschiedliche Konzentrationen von Gerstenglucanen unterschiedlicher Molmassen. Zusätzlich sind die Molmassenverteilungsbreiten M_w/M_n für die einzelnen Glucanproben angegeben

sehr viel weniger von der Konzentration abhängt. Die Geliergeschwindigkeit der Ausbildung eines Gelkörpers wird in diesem Fall durch die verbrückende Wirkung der langen Ketten bestimmt, die auch bei geringeren Konzentrationen durch die Ausdehnung der Polymerknäule in Lösung gegeben ist. Unterstützt wird diese Interpretation durch die beobachtete hohe Geliergeschwindigkeit der β -Glucans mit einer gewichtsmittleren Molmasse von 166 000 g/mol. Diese Probe zeigt eine höhere Geliergeschwindigkeit als die Probe der Molmasse 100 000 g/mol, hat aber eine wesentlich breitere Molmassenverteilung ($M_w/M_n = 1,93$) als die anderen Proben. Die durch die wesentlich größere niedermolekulare Flanke erhöhte Kontaktwahrscheinlichkeit führt damit zu einer schnelleren Verbrückung der hochmolekularen Anteile und somit zu einer im Vergleich zu den engverteilten Proben erhöhten Geliergeschwindigkeit und Elastizitätsinkrement I_E .

Die Kontaktwahrscheinlichkeit der Assoziationspunkte kann in spontan gelierenden Lösungen nicht nur durch eine höhere Beweglichkeit durch niedermolekulare Anteile, sondern auch durch Scherkrafteintrag erhöht werden. In Abbildung 6 ist die Kriecherholung der gleichen β -Glucanlösung aus Abbildung 4 mit einer Molmasse von 300 000 g/mol dargestellt, die nun allerdings Zyklen von konstanten Scherungen von 2 min mit einer Schergeschwindigkeit von 2 s^{-1} und Ruhephasen von 10 min unterworfen werden. Bereits nach dem dritten Zyklus und einer Zeit von 60 min ist die Probe vollständig geliert, wie an der 100%igen Rückdeformation zu erkennen ist [38, 40]. Demgegenüber befindet sich die gleiche Probe ohne Scherkrafteintrag in Abbildung 4 nach 60 min noch in der Induktionsperiode vor Einsetzen der spontanen Gelierung. Die Scherung erhöht dabei nicht alleine die intermolekularen Kontakte pro Zeit, sondern erhöht auch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Assoziation im Falle eines Kontaktes durch die Erhöhung der Anisotropie der Polymerknäule und eine Orientierung der Kettensegmente in Richtung der Hauptspannungsorientierung [41].

3.4 Gelbildungskinetik

Diese erhöhte Assoziationstendenz durch Streckung und Orientierung von hochmolekularen Glucanen führt wahrscheinlich auch in den verdünnten Glucanlösungen des Bieres zur beobachteten Assoziation und Gelbildung zunächst der hochmolekularen Anteile in Abbildung 2. Die vollständige Gelierung auch der niedermolekularen Anteile des Glucans nach Abbildung 2 erfolgt dann über die hohe Beweglichkeit der niedermolekularen Anteile durch Assoziation an den bereits bestehenden Gelkörpern. Die hohe Beweglichkeit der niedermolekularen Anteile reicht in verdünnter Lösung demnach nicht aus, um vernetzend assoziieren zu können und der hochmolekulare Anteil des Glucans in problematischen Bieren ist zur Gelkeimbildung notwendig. Die Ruhezeit nach der Scherbeanspruchung ist dabei für die Ausbildung einer haltbaren Assoziationskontaktstelle Voraussetzung. Nach Whistler [42] kann eine Assoziation nach erfolgreichem Kontakt nur bestehen bleiben, wenn die Kontaktstellen genügend lange Zeit in relativer Ruhe zur Ausbildung embryonaler Netzpunkte haben. In Übereinstimmung damit zeigt eine Probe des Glucans nach einer Dauerscherrung von 60 min bei einer Schergeschwindigkeit von 2 s^{-1} keinerlei Gelcharakteristika.

Auf eine Gelierung aus einzelnen embryonalen Gelkeimen deutet auch die Form der Speichermodulkurven in Abbildung 4 hin. Die sigmoidale Form der Kurven weist auf eine Wachstumskinetik ähnlich der Avrami-Gleichung für Kristallwachstumskinetik hin [43]:

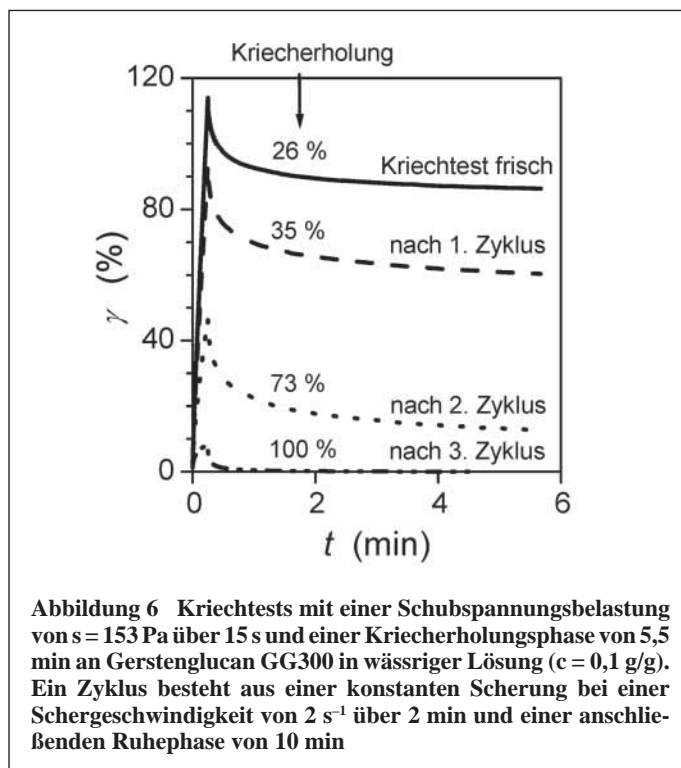


Abbildung 6 Kriechtests mit einer Schubspannungsbelastung von $s = 153 \text{ Pa}$ über 15 s und einer Kriecherholungsphase von $5,5 \text{ min}$ an Gerstenglucan GG300 in wässriger Lösung ($c = 0,1 \text{ g/g}$). Ein Zyklus besteht aus einer konstanten Scherung bei einer Schergeschwindigkeit von 2 s^{-1} über 2 min und einer anschließenden Ruhephase von 10 min

$$x = 1 - \exp(-kt^n) \quad (3)$$

x beschreibt den kristallierten Anteil. Der Avrami-Exponent n hängt dabei vom Keimbildungstyp s ($s = 0$ für eine athermische Keimbildung, $s = 1$ für eine thermische) und der Wachstumsdimension r des Keimes ab ($r = 1$ für eindimensionales Wachstum, $r = 2$ für scheibenförmiges und $r = 3$ für kugelförmiges Wachstum des Keimes):

$$n = s + r \quad (4)$$

Ein sigmoidaler Kurvenverlauf ergibt sich für Avrami-Exponenten $n > 1$. Eine generelle Einordnung in die Dimension der Gelkeimbildung ist aus den Modulkurven allein allerdings nicht möglich, da der Anteil der Gelkeime dem Speichermodul nicht direkt proportional ist.

Der vorliegende Keimbildungstyp lässt sich allerdings durch Untersuchung einer frisch präparierten Glucanlösung direkt nach dem Abkühlen bestimmen. Im Falle einer athermischen Keimbildung, wie sie unter anderem für Stärkelösungen diskutiert wird [44], sollte schon zu Beginn der Induktionsperiode die Gelkeimstruktur vorhanden sein. Zur Untersuchung der β -Glucanlösung vor Beginn der Gelierung kann durch Detektion des Strömungsdichroismus auf eine etwaige Assoziatstruktur zurückgeschlossen werden. Der Strömungsdichroismus entspricht der anisotropen Streuung und damit Absorption von polarisiertem Licht durch Partikel in Größenordnungen oberhalb der Wellenlänge des Lichtes in einem Scherfeld [45, 46]. Da die einzelnen Glucanmoleküle zu klein sind, um einen Dichroismus hervorzurufen, ist eine Detektion eines Dichroismus direkt auf das Vorhandensein von Assoziaten bzw. Gelkeimen zurückzuführen.

Ungelöste Bestandteile des β -Glucans als Ursache für einen Dichroismus können für die vorliegenden Proben ausgeschlossen werden, da mit Lichtstreuexperimenten bei den Präparationstemperaturen der Lösungen von $85 \text{ }^\circ\text{C}$ keine Überstrukturen detektiert werden konnten. Eine Abtrennung ungelöster Bestandteile

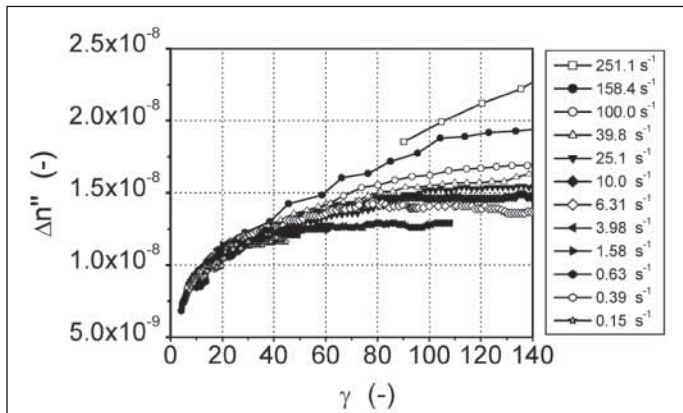


Abb. 7 Transienter Strömungsdichroismus $\Delta n''$ als Funktion der Deformation γ für Gerstenglucan der Molmasse $M_w = 285\,000$ g/mol und einer Konzentration $c = 0.03$ g/g in wässriger Lösung. Der transiente Dichroismus ist für verschiedene, konstante Schergeschwindigkeiten $\dot{\gamma}$ dargestellt

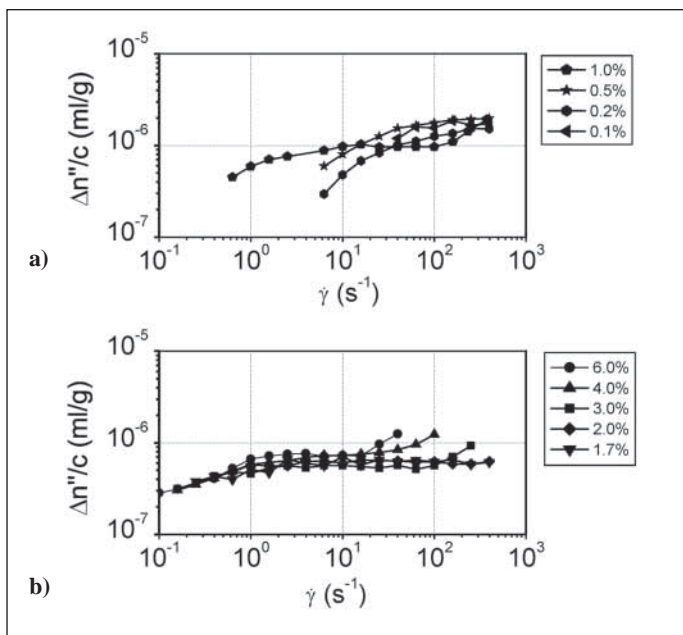


Abb. 8 Konstanter Strömungsdichroismus $\Delta n''$ des Gleichgewichtszustandes zwischen Deformation des Assoziates durch hydrodynamische Kräfte und der inneren elastischen Spannung des Assoziates für verschiedene Schergeschwindigkeiten $\dot{\gamma}$. Abbildung a) beinhaltet Konzentrationen des (1→3)(1→4)-β-D-Glucans unterhalb der kritischen Konzentration der spontanen Gelierung, Abbildung b) Konzentrationen oberhalb der kritischen Konzentration

kann dabei ausgeschlossen werden, da die Wiederfindungsrate der Größenausschlusschromatographie bei über 98 % lag [35].

Abbildung 7 zeigt, daß tatsächlich ein Dichroismus für die Glucanlösungen beobachtet werden kann.

Das transiente Dichroismussignal eines Gerstenglucans einer Molmasse von 285 000 g/mol ist für verschiedene Schergeschwindigkeiten als Funktion der Deformation dargestellt. Die äußere Grenzlinie des Gelkeimes wird dabei im Scherfeld mit zunehmender Deformation der Lösung anisotrop verformt, wie aus dem anfänglich zunehmenden Dichroismus ersichtlich ist. Mit zunehmender Verformung des Gelkeimes stellt sich dabei ein Gleichgewicht ein zwischen den angreifenden hydrodynamischen

Kräften des Scherfeldes und den innerhalb des assoziierten Gelkeimes herrschenden Kräften, die einer Deformation elastisch entgegenwirken. Nach *Vermant et al.* [47] zeigt der Verlauf des transienten Dichroismus ohne Überschießen, dass die Struktur der Gelkeime reversibel deformiert wird, ohne dabei aufzubrechen. Ebenso deutet die Unabhängigkeit des transienten Dichroismus von der Schergeschwindigkeit bei kleinen Deformationen nach *Yang et al.* auf eine intakte Struktur über den Deformationsvorgang hin [48]. Die athermisch vorhandenen Gelkeime sind danach scherestabil, zumindest in dem untersuchten Schergeschwindigkeitsbereich bis 400 s^{-1} . Diese Stabilität konnte nach Abbildung 8 über einen weiten Konzentrationsbereich gezeigt werden. Die in diesem Fall dargestellten Dichroismuswerte entsprechen dem Gleichgewichtszustand, dem der transiente Dichroismus nach genügend großer Deformation entgegenstrebt.

Die Werte werden dabei unabhängig von der Vorgeschichte der Scherung erhalten, die Gelkeime brechen bei hohen Schergeschwindigkeiten nicht auf. Auffallend ist, daß der Dichroismus oberhalb einer kritischen Schergeschwindigkeit unabhängig von dieser wird. Die Gelkeime erreichen danach einen Zustand maximaler Deformation, der von der inneren Struktur des Gelkeimes bestimmt wird. Da der Dichroismus ein integrales Signal entlang des Strahlenganges darstellt, wird er in Abbildung 8 über die Glucankonzentration normiert dargestellt, um die unterschiedlichen Plateauwerte der maximalen Deformation vergleichen zu können. Für Konzentrationen im Bereich unterhalb der spontanen Gelierung ($c < 1\%$) wird dabei ein höherer Plateauwert erreicht, die Gelkeime liegen in verdünnter Lösung unterhalb der kritischen Konzentration mit einer veränderten Struktur vor. Eine direkte Aussage über die Art der Struktur läßt das Dichroismusexperiment nicht zu, allerdings sind auch die Gelkeimstrukturen in verdünnter Lösung stabil gegen Scherkräfteintrag im untersuchten Schergeschwindigkeitsbereich.

Die Beobachtung eines Dichroismus direkt nach Abkühlen einer molekular dispers gelösten Glucanlösung deutet auf eine sehr schnelle Gelkeimbildung hin. Die Gelkeime liegen, anders als in der Avrami-Kristallkinetik, einer athermischen Keimbildung, erst unterhalb einer kritischen Temperatur vor. Allerdings kann von einer athermischen Kinetik ausgegangen werden, da die Keimzahl im transienten Dichroismusexperiment unverändert über den Deformationszeitraum und Wiederholungsexperimente auftrat. Im Unterschied zur Kristallkinetik einer Polymerschmelze wird der Gelkeim des Gelierungsprozesses auch von der lokalen chemischen Struktur der Kontaktstellen bestimmt (siehe nachfolgendes Kapitel). Wahrscheinlich treten besonders geeignete Kontaktstellen bei Abkühlung der Glucanlösung sehr schnell zum Gelkeim zusammen, die eigentliche vernetzende Gelierung erfolgt dann auch über weniger geeignete Kontaktstellen entlang der Polymerkette, die an den Gelkeim assoziieren [24]. Der Gelierungsprozess verläuft demnach wahrscheinlich nach einer pseudoathermischen Kinetik.

Aus einer athermischen Gelkeimbildung muss aber für einen sigmoidalen Kurvenverlauf die Wachstumsdimension des Gelkeimes, anders als z. B. für Stärkelösungen beobachtet [44], mindestens zweidimensional nach Gleichung (4) erfolgen.

3.5 Gelbildungsmechanismus

Die Bedeutung der lokalen chemischen Struktur der Kontaktstellen zur erfolgreichen Assoziation und der sich daraus ergebende Assoziationsmechanismus soll im folgenden am Vergleich von (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen unterschiedlicher Herkunft dargestellt werden. Zum Vergleich der Gelierungsgeschwindigkeiten wur-

Tabelle 2 Zahlenmittlere Molmassen M_n und die I_E -Werte der zum Vergleich der Gelierungsgeschwindigkeiten herangezogenen Glucane ($c = 0.01$ g/g)

Probencode	M_n (g/mol)	I_E (h^{-1})
LN55	32 000	> 50
GG50	38 000	5,3
HG40	32 000	0,86

Tabelle 3 Verhältnisse der glycosidischen Bindungen (1,3) : (1,4) in Lichenan, Hafer- und Gerstenglucan bestimmt aus den ^{13}C -NMR-Spektren in Abbildung 9

Polysaccharid	Bindungsverhältnis (1,3) : (1,4)
Lichenan	27 : 73
Gerstenglucan	28 : 72
Haferglucan	29 : 70

Tabelle 4 Relative Mengen der Hauptfraktionen der Lichenase-Digestate mit Polymerisationsgrad P aus Abbildung 10

Substanz	P=3 : P=4 : P=5
Lichenan	23 : 1 : 2,5
Gerstenglucan	2,5 : 1 : 0,12
Haferglucan	1,9 : 1 : 0,08

den hierzu Proben mit nahezu gleicher zahlenmittlerer Molmasse ausgewählt, da die spontane Gelierung nach den vorangegangenen Ausführungen durch die niedermolekularen Anteile dominiert wird. Ein Vergleich der Geliertgeschwindigkeit über die Elazitätsinkremente nach Tabelle 2 für Glucane isoliert aus Hafer, Lichenan und Gerste zeigt dabei trotz annähernd gleicher gewichtsmittlerer Molmasse für das Lichenanglucan eine annähernd eine Dekade größere Geliertgeschwindigkeit im Vergleich zum Gerstenglucan.

Das Haferglucan weist demgegenüber eine um einen Faktor 6 kleinere Geliertgeschwindigkeit auf. Die Glucane weisen ein annähernd gleiches Verhältnis der glycosidischen (1→3) und (1→4) Bindungen auf, wie aus den C-1 Signalen des ^{13}C -NMR Spektrens (Abbildung 9) ermittelt werden kann (Tabelle 3).

Als wesentlicher struktureller Unterschied der chemischen Struktur zur Erklärung der unterschiedlichen Geliertgeschwindigkeiten kommt das Bindungsverhältnis demnach nicht in Frage. Die Bestimmung der Verteilung der (1→3) und (1→4) Bindungen entlang der Polymerkette erfolgt über eine Oligomerenanalyse der durch Lichenase (E.C. 3.2.1.73) enzymatisch abgebauten Glucane. Die spezifische Spaltung von auf β -(1→3) Bindungen folgende β -(1→4) Bindungen erzeugt Oligomere, deren Bindungszahl denen der reinen β -(1→4) gebundenen, celluloseartigen Blöcke entlang der Kette entspricht [49]. Die wasserlöslichen Oligomere mit Polymerisationsgraden $P < 9$ [15] können durch Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion in basischem Medium getrennt werden, wie in Abbildung 10 dargestellt ist.

Eine exakte planimetrische Integration der Peak-Flächen in Abbildung 10 erlaubt die Bestimmung der Verhältnisse von Oligomerenanzahl mit unterschiedlichen Polymerisationsgraden P wie in Tabelle 4 dargestellt.

Danach bildet, wie aus dem Verhältnis der Bindungsarten von ~ 28:72 nach Tabelle 3 erwartet, das Oligomer mit dem Polyme-

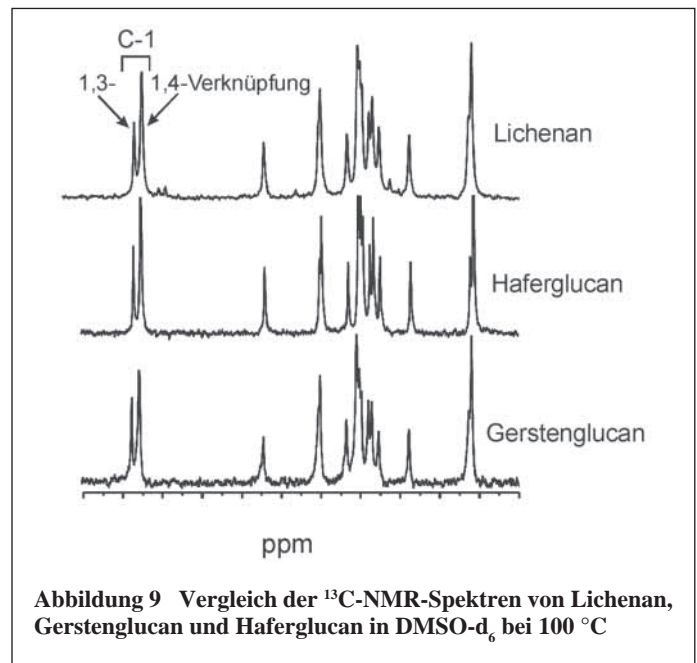


Abbildung 9 Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von Lichenan, Gerstenglucan und Haferglucan in $DMSO-d_6$ bei $100\text{ }^\circ C$

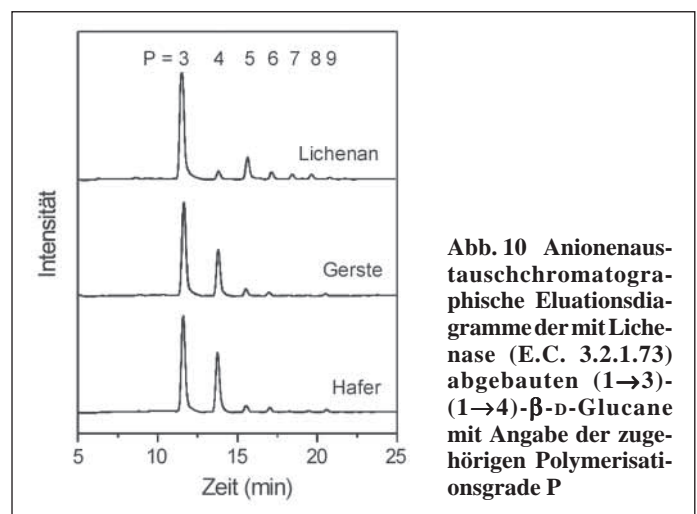


Abb. 10 Anionenaustauschchromatographische Elutionsdiagramme der mit Lichenase (E.C. 3.2.1.73) abgebauten (1→3)-(1→4)- β -D-Glucane mit Angabe der zugehörigen Polymerisationsgrade P

risationsgrad von $P = 3$, das in der Glucankette einem Block von drei über β -(1→4) Bindungen verknüpften Glucoseeinheiten entspricht (sog. Cellotrioseeinheit) den überwiegenden Anteil des Enzymabbaus dar, wie auch schon anderweitig berichtet wurde [17, 31, 50, 51]. Die Bindungsverteilung ist dabei zwar statistisch, allerdings nicht regellos [32]. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist das Verhältnis von Cellotrioseeinheiten zur nächstgrößeren Cellotetroseeinheit im Lichenan um den Faktor 10 größer als im Gerstenglucan, das wiederum ein um den Faktor 1,4 größeres Verhältnis im Vergleich zum Haferglucan aufweist. Das Lichenan stellt somit das einheitlichste Polymer dar und besteht fast ausschließlich aus Cellotrioseblöcken, die miteinander über β -(1→3) Bindungen verknüpft sind. Haferglucan weist demgegenüber die größte Uneinheitlichkeit auf, während das Gerstenglucan eine Mittelstellung einnimmt, dem Haferglucan aber ähnlicher ist als dem Lichenan.

Diese Strukturparameter korrelieren mit den beobachteten Unterschieden in der Geliertgeschwindigkeit I_E . Als ein neues Modell für den Gelbildungsmechanismus kann daraus abgeleitet werden, dass die zur Assoziation befähigten Strukturelemente die regelmäßigen Abfolgen von Cellotrioseblöcken sind (Abb. 11). Die „Fehlstellen“ von größeren celluloseartigen Sequenzen begren-

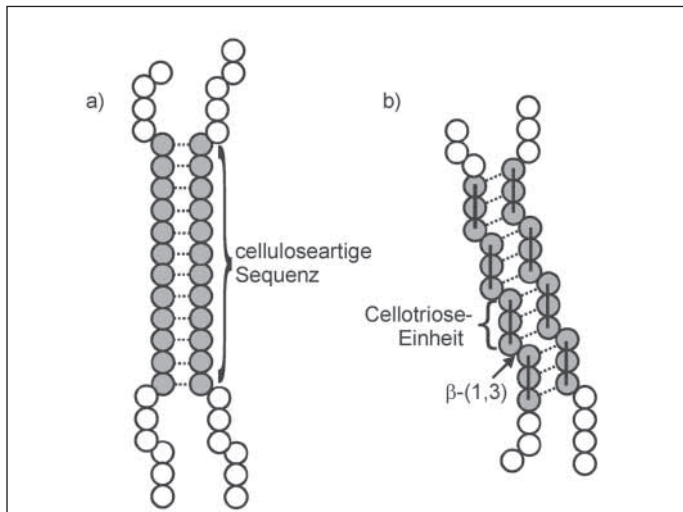


Abb. 11 a) In der Literatur häufig zitiertes Modell der Gelierung von (1→3)(1→4)-β-D-Glucan über lange Cellulosesequenzen. b) neues Modell der Assoziation über regelmäßige Abfolgen von β-(1→3)-verknüpften Cellotrioseeinheiten

zen danach die Assoziation, bewirken aber auch, dass das Molkül wasserlöslich bleibt, da eine molekülübergreifende Assoziation zum Ausfallen des Glucans aus der Lösung führen würde. Dieses Modell widerspricht dem von *Letters* aufgestellten [7] und seit dem in der Literatur weitverbreiteten Modell, dass die Assoziation über die bis zu 15 Glucoseeinheiten langen Cellulose-Sequenzen erfolgt (siehe Abb. 11). Gerade für Lichenan wurde aber ein besonders geringer Anteil an langen Cellulosesequenzen mit Polymerisationsgrad $P > 9$ im Lichenase-Abbau gefunden [17].

Weiter unterstützt wird das neue Modell für den Gelbildungsmechanismus von (1→3)(1→4)-β-D-Glucanen durch Transmissionsuntersuchungen von Glucangelkörpern. Nach *Böhm* et al. sind Haferglucanenge wesentlich transparenter als Gerstenglucan- und Lichenanenge [35]. Die mit der Clustergröße korrelierende Transparenz der Gele deutet danach auf wesentlich kürzere, assoziationsfähige Sequenzen in der Haferglucanstruktur hin, die in der unregelmäßigeren Kettenstruktur des Haferglucans mit den regelmäßigen Cellotriosesequenzen korrelieren.

4 Zusammenfassung

(1→3)(1→4)-β-D-Glucane zeigen zwei unterschiedliche Typen Gelierung. Die spontane Gelierung tritt oberhalb einer kritischen Glucankonzentration auf und folgt einer pseudo-athermischen Bildungskinetik mit einem mindestens zweidimensionalen Wachstum der Gelkeime. Die Bildung der Ausgangskeime über geeignete Kontaktstellen der Glucane erfolgt sehr viel schneller als die eigentliche Gelbildung. Die Gelkeimbildung erfolgt auch unterhalb der kritischen Glucankonzentration der spontanen Gelierung. Die Gelbildungsgeschwindigkeit wird allgemein durch die niedermolekularen Glucanfraktionen unterhalb 100 000 g/mol kontrolliert. Eine lösungsübergreifende Gelierung mit Bildung eines Gelkörpers wird durch die hochmolekularen Glucanfraktionen kontrolliert. Eine Gelierung aus verdünnten, bierähnlichen Lösungen ist auch bei hochmolekularen Glucanen nur durch zusätzliche Erhöhung der Assoziationskontakte u. a. durch Scherkräfteintrag möglich. Die Assoziation der Glucane erfolgt nicht wie bislang angenommen über lange celluloseartige Sequenzen, sondern über regelmäßige Abfolgen von Cellotrioseblöcken entlang der Glucankette.

Danksagung

Wir danken der Wissenschaftsförderung der deutschen Brauwirtschaft e.V. für die Förderung dieser Arbeit.

5 Summary / Résumé

Clasen, C. and Kulicke, W.-M.: The gelation of (1→3)(1→4)-β-D-glucans — Monatsschrift für Brauwissenschaft 56, No. 9/10, 161 – 170, 2003.

BC 03 Chemistry

The gelation of (1→3)(1→4)-β-D-glucans in non-filtrated beer leads to a clogging of the filter media during the beer-brewing process and an increased filter media usage, reduces the beer output and increases the production costs. New investigations of the gelation mechanism show different types of gelation. A spontaneous gelation occurs independent of the molar above a critical glucan concentration ($c = 1\%$) and follows an athermic kinetic with an at least two-dimensional seed growth. The formation of the gel seeds at suitable association points is much faster than the regular gelation. In general, the speed of gelation is controlled by the low molar mass fraction ($M_w < 100\,000\text{ g/mol}$) of the glucan. A gel seed formation occurs also below the critical concentration of the spontaneous gelation. However, below the critical concentration of 1% an overall gelation of the solution with the formation of a solid gel particles is only possible for high molar mass fractions of the glucan ($M_w > 100\,000\text{ g/mol}$) and an additional increase of the contact rate for example via shear forces. An analysis of the oligomeric composition of an enzymatic degradation of glucans allowed the formulation of a new gelation mechanism via regular cellotriose units along the glucan backbone in contrast to the widely assumed association via long cellulose-like units.

Clasen, C., et Kulicke, W.-M.: La gélification des (1→3)(1→4)-β-D-glucanes — Monatsschrift für Brauwissenschaft 56, No. 9/10, 161 – 170, 2003.

BC 03 Chimie

La gélification des (1→3)(1→4)-β-D-glucanes présents dans la bière filtrée conduit à la colmatation des dispositifs de filtration durant le brassage industriel de la bière. Ainsi les temps de filtrage sont réduits, la consommation de filtres est élevée, la production en bière est réduite et les coûts de production sont élevés. De récentes études sur le mécanisme de gélification mettent en évidence deux différents types de gélification. La gélification spontanée se produit indépendamment de la masse molaire, au-delà d'une concentration critique de glucane ($c = 1\%$) et suit une cinétique de formation athermique avec une croissance au moins bidimensionnelle de graines géliques. La formation de ces graines d'origine sur des locations appropriées du glucane est bien plus rapide qu'une cinétique de gélification homogène. La vitesse de gélification est, en général, contrôlée par les faibles masses moléculaires de glucane ($M_w < 100\,000\text{ g/mol}$). Une formation de graines géliques se produit également en dessous de la concentration critique de gélification spontanée. Néanmoins en dessous d'une concentration critique de 1% , la gélification globale de la solution avec formation de particules solides de gel n'est possible que pour des masses moléculaires élevées ($M_w > 100\,000\text{ g/mol}$) et une augmentation additionnelle des contacts d'association (par exemple par l'apport de forces de cisaillement). Par ailleurs, la dégradation enzymatique et l'analyse de la composition des polymères ont permis de mettre en évidence que l'association des glucanes ne se produit pas, comme assumé jusqu'ici, par l'intermédiaire de longues séquences de type cellulose, mais par des séquences régulières de blocs cellotrioses passant le long du squelette glucane.

6 Literatur

1. Bamforth, C. W.: β-Glucan and β-Glucanases in Malting and Brewing: Practical aspects, *Brewers Digest* **59**, 12-21, 1994.
2. Krüger, E., Wagner, N. and Lindemann, B.: Variables influencing beer filtration, *Brauwelt Int.* 24-35, 1991.

3. Narziß, L., Reicheneder, E. and Edney, M. J.: Studying a beer filtration with an accurate beta-glucan assay, *Monatsschr. Brauw.* **42**, 277-285, 1989.
4. Gjertsen, P.: Beta-glucans in malting and brewing. I. Influence of beta-glucans on the filtration of strong beers, *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 113-120, 1966.
5. Martin, H. L. and Bamforth, C. W.: The relationship between beta-glucan solubilase, barley autolysis and malting potential, *J. Inst. Brew.* **86**, 216-221, 1980.
6. Wagner, N., Esser, K. D. and Krüger, E.: Analytik und Bedeutung hochmolekularer β -Glucane in Bier, *Monatsschr. Brauw.* **41**, 384-395, 1988.
7. Letters, R.: β -Glucans in Brewing, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* **16th**, 211-224, 1977.
8. Krüger, E., Wagner, N. and Esser, K. D.: Analytik und rheologisches Verhalten der β -Glucane in Bier, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* **22nd**, 425-436, 1989.
9. Narziß, L.: β -Glucan und Filtrierbarkeit, *Brauwelt* **37**, 1696-1706, 1992.
10. Narziß, L., Reicheneder, E. and Edney, J.: Importance of Beta-Glucan size and concentration in malting, *Monatsschr. Brauw.* **42**, 430-437, 1989.
11. Esser, K. D.: Versuch einer kritischen Auswertung der Vorhersagemethoden für die Filtrierbarkeit des Bieres, *Brauwelt* **46/47**, 2508-2514, 1994.
12. Stewart, D. C., Hawthorne, D. and Evans, D. E.: Cold Sterile Filtration: A Small Scale Filtration Test and Investigation of Membrane Plugging, *J. Inst. Brewing* **104**, 321-326, 1998.
13. Wagner, N., He, G. and Krüger, E.: Bedeutung von β -Glucan-Gel für die Filtrierbarkeit von Bier, *Brauwelt* **12**, 426-434, 1991.
14. Sudarmana, D. L., Goldsmith, M. R., Hinh, A. H., Pecar, M. A., Hawthorne, D. B. and Kavanagh, T. E.: Microfiltration studies with a modified membrane filterability procedure, *Technical Quarterly – Master Brewers Association of the Americas* **33**, 63-72, 1996.
15. Woodward, J. R., Fincher, G. B. and Stone, B. A.: Water soluble (1,3),(1,4)-beta-D-glucans from barley endosperm.II. Fine structure., *Carbohydr. Polym.* **3**, 207-225, 1983.
16. Letters, R., Byrne, H. and Doherty, M.: The complexity of beer β -glucans, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* **20th**, 395-402, 1985.
17. Wood, P. J., Weisz, J. and Blackwell, B. A.: Structural studies of (1,3)(1,4)- β -D-glucans by ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase, *Cereal Chem.* **71**, 301-307, 1994.
18. Izawa, M., Kano, Y. and Koshino, S.: Relationship between structure and solubility of (1,3)(1,4)- β -D-glucan from barley, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**, 123-127, 1993.
19. Roessner, D. and Kulicke, W. M.: Online Coupling of Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Laser-Light Scattering, *Journal of Chromatography A* **687**, 249-258, 1994.
20. Kulicke, W. M., Otto, M. and Baar, A.: Improved Nmr Characterization of High-Molecular-Weight Polymers and Polyelectrolytes through the Use of Preliminary Ultrasonic Degradation, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **194**, 751-765, 1993.
21. Schittenhelm, N. and Kulicke, W. M.: Producing homologous series of molar masses for establishing structure-property relationships with the aid of ultrasonic degradation, *Macromolecular Chemistry and Physics* **201**, 1976-1984, 2000.
22. Clasen, C. and Kulicke, W.-M.: Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes (submitted), Springer, Heidelberg, 2003.
23. Kulicke, W.-M.: Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen, Hühlig und Wepf, Basel, Heidelberg, New York, 1986.
24. Clasen, C.: Neue Charakterisierungsmöglichkeiten von supramolekularen Strukturen in Biopolymerlösungen mit rheo-optischen Methoden, Shaker Verlag, Aachen, 2001.
25. Clasen, C. and Kulicke, W. M.: Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives, *Progress in Polymer Science* **26**, 1839-1919, 2001.
26. Baar, A., Kulicke, W.-M., Szablowski, K. and Kiesewetter, R.: NMR spectroscopic characterization of carboxymethylcellulose, *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 1483-1492, 1994.
27. Heins, D., Kulicke, W. M., Kauper, P. and Thielking, H.: Characterization of acetyl starch by means of NMR spectroscopy and SEC/MALLS in comparison with hydroxyethyl starch, *Starch-Starke* **50**, 431-437, 1998.
28. Kulicke, W.-M., Otto, M. and Baar, A.: Improved NMR characterization of high-molecular-weight polymers and polyelectrolytes through the use of preliminary ultrasonic degradation, *Makromol. Chem.* **194**, 751-765, 1993.
29. Woodward, J. R., Phillips, D. R. and Fincher, G. B.: Water soluble (1,3),(1,4)-beta-D-glucans from barley endosperm.I. Physicochemical properties, *Carbohydr. Polym.* **3**, 143-156, 1983.
30. Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B. and Stone, B. A.: An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides, *Carbohydr. Res.* **127**, 59-73, 1984.
31. Wood, P. J., Weisz, J. and Blackwell, B. A.: Molecular characterization of cereal- β -D-glucans. Structural analysis of oat β -D-glucan and rapid structural evaluation of β -D-glucans from different sources by high performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase, *Cereal chem.* **68**, 31-39, 1991.
32. Henriksson, K., Telemann, A., Suortti, T., Reinikainen, T., Jaskari, J., Telemann, O. and Poutanen, K.: Hydrolysis of barley (1,3)(1,4)- β -D-glucan by a cellobiohydrolase II preparation from *Trichoderma reesei*, *Carbohydr. Polym.* **26**, 109-119, 1995.
33. Staudte, R. G., Woodward, J. R., Fincher, G. B. and Stone, B. A.: Water soluble (1,3),(1,4)-beta-D-glucans from barley endosperm.III. Distribution of cellotriosyl and cellotetraosyl residues, *Carbohydr. Polym.* **3**, 299-312, 1983.
34. Buliga, G. S., Brant, D. A. and Fincher, G. B.: The sequence statistics and solution conformation of a barley (1,3)(1,4)- β -D-Glucan, *Carbohydr. Res.* **157**, 139-156, 1986.
35. Böhm, N.: Dissertation, Universität Hamburg, 1998, 114.
36. McCleary, B. C.: Purification of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan from barley flour, *Methods in Enzymology* **160**, 511-514, 1988.
37. Wagner, N., Esser, K. D. and Krüger, E.: Analytik und Bedeutung hochmolekularer β -Glucane im Bier, *Monatsschr. Brauw.* **40**, 384-395, 1990.
38. Macosko, C.: Rheology: Principles, Measurements, and Applications, VCH Publishers, New York, 1994.
39. Böhm, N. and Kulicke, W. M.: Rheological studies of barley (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-beta-glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation, *Carbohydrate Research* **315**, 302-311, 1999.
40. Barnes, H. A., Hutton, J. F. and Walters, K.: An Introduction to rheology, Elsevier, Amsterdam, 1989.
41. Clasen, C. and Kulicke, W. M.: A convenient way of interpreting steady shear rheo-optical data of semi-dilute polymer solutions, *Rheologica Acta* **40**, 74-85, 2001.
42. Whistler, R. L.: Hydrogels – synthetic and natural, *Tappi* **60**, 64-67, 1977.
43. Elias, H. G.: Makromoleküle: Physikalische Strukturen und Eigenschaften, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
44. McIver, R.G., Axford, D. W. E., Colwell, K. H. and Elton, G. A. H.: Kinetic study of the retrogradation of gelatinized starch, *J. Sci. Food Agric.* **19**, 560-563, 1968.
45. Fuller, G. G.: Optical Rheometry of Complex Fluids, Oxford University Press, London, 1995.
46. Clasen, C. and Kulicke, W. M.: Rheo-optical studies of barley (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-beta-glucan solution: Detection of the flow behavior of aggregates in the sol state, *Journal of Rheology* **47**, 321-335, 2003.
47. Vermant, J., Van Puyvelde, P., Moldenaers, P., Mewis, J. and Fuller, G. G.: Anisotropy and orientation of the microstructure in viscous emulsions during shear flow, *Langmuir* **14**, 1612-1617, 1998.
48. Yang, H., Zhang, H. J., Moldenaers, P. and Mewis, J.: Rheo-optical investigation of immiscible polymer blends, *Polymer* **39**, 5731-5737, 1998.
49. Woodward, J. R. and Fincher, G. B.: Substrate specificities and kinetic properties of two (1,3)(1,4)- β -D-glucanases from germinating barley, *Carbohydr. Res.* **106**, 111-122, 1982.
50. Perlman, A. S. and Suzuki, S.: The structure of lichenin: selective enzymolysis studies, *Can. J. Chem.* **40**, 50-56, 1962.
51. Edney, M. J., Marchylo, B. A. and MacGregor, A. W.: Structure of total barley beta-glucan, *J. Inst. Brew.* **97**, 39-44, 1991.